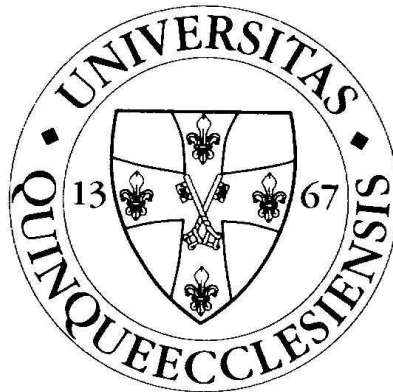


# **A glutation S-transzferáz szerepe a szívizom iszkémia-reperfúziós folyamataiban és az endogén adaptációs válaszok során**

Ph.D. Tézis

Kovács Viktória



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2015.

# **A glutation S-transzferáz szerepe a szívizom iszkémia-reperfúziós folyamataiban és az endogén adaptációs válaszok során**

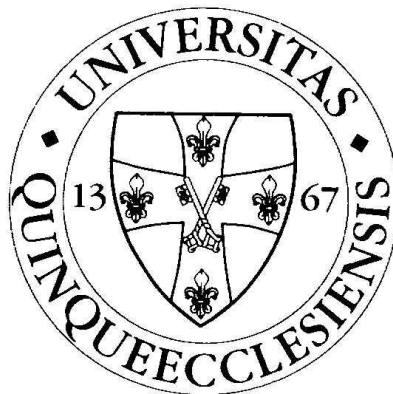
Ph.D. Tézis

Kovács Viktória

Doktori Iskola vezetője:            Professzor Dr. Kovács L. Gábor

Programvezetők:                    Dr. Jancsó Gábor  
  Dr. Gasz Balázs

Témavezető:                         Dr. Gasz Balázs



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2015.

## TARTALOMJEGYZÉK

I.	Bevezetés	4.
II.	Célkitűzések	5.
III.	A glutation S-transzferáz (GST) hatása in vivo akut miokardiális infarktuson átesett patkány modellben	6.
IV.	A GST polimorfizmusának kockázati tényezőként vállalt szerepe szív-műtétet követően bekövetkező akut miokardiális infarktus kialakulásának folyamatában	11.
V.	Új eredmények	16.
VI.	Köszönetnyilvánítás	17.

## 1. BEVEZETÉS

Az oxidatív stressz kialakulása a miokardium iszkémiás-reperfúziós károsodását követően, a sejtekben fellépő apoptotikus, nekrotikus elváltozások kialakulásához vezethet. Ezen állapotban a rendkívül agresszív reaktív oxigén-intermedierek (ROI) képződése meghaladja az endogén antioxidáns védelem kapacitását, s így a szervezet sejtalkotóinak oxidatív károsodását idézik elő.

Az utóbbi évek irodalmi adatai felhívták a figyelmet arra, hogy a sejszintű elváltozások mélyebb megismerése számos előnyt jelenthet a klinikai gyakorlatban is. Olyan esetekben, amikor a tervezett műtétek során (ér- és szívsebészet, szervtranszplantáció) elkerülhetetlen a rövidebb-hosszabb időre kialakuló iszkémia, majd a keringés helyreállítását követő reperfúzió, lehetőség van előre felkészíteni a szervezetet az endogén antioxidáns védelem indukálása révén. Ezen a területen ma „gold standardnak” tekinthető pre- és posztoperatív kondicionálás már a klinikai gyakorlatban is használt.

A reaktív gyökök elleni védelemben a máj által aminosavakból szintetizált glutationnak kiemelten fontos szerepet tulajdonítunk, hisz részben az antioxidáns glutation-peroxidáz szubsztrátjaként szerepel, miközben oxidált formává, GSSG-vé alakul át. A GSH/GSSG arány a plazmában jól mérhető és kóros állapotokban tükrözi a szervezetben kialakuló oxidatív folyamatok intenzitását. Ugyancsak a redukált glutationt használja szubsztrátként a glutation-S-transzferáz (GST) enzim az elektrofil vegyületek és toxikus anyagok közömbösítése során. Az utóbbi években mutatták ki a GST-jelátvitelben, génexpresszióban, apoptózisban, fehérje glutationilációban, a nitrogén-oxid metabolizmusban, valamint a gyulladásban betöltött fontos szerepét.

### 1.1. GLUTATION ÉS GLUTATION S-TRANSZFERÁZ

A glutation egy vízdékony tripeptid (glutamát, cisztein, glicin), ami a leggyakoribb kis molekulasúlyú tiol a citoszólban. A cisztein rész miatt a glutation a különböző elektrofil anyagok által glutation diszulfidá (GSSG) oxidálódik. Az optimalis GSH:GSSG arány fenntartása alapvető a sejt túlélése szempontjából. A GSH/GSSG a fő redox pár, ami meghatározza a sejt antioxidáns kapacitását. A GSH/GSSG arány eltolódása az oxidált állapot felé számos jelátviteli utat aktivál, ezáltal csökkentve a sejt proliferációt és növelve az apoptózist.

A GST legfőbb szerepe a toxikus anyagok, oxidatív stressz során keletkezett káros termékek redukált glutationnal történő konjugálása, így kevésbé toxikus termék létrehozása. Lokalizáció alapján a GST enzimek három fő csoportja különböztethető meg, melyek közül a citoszól sejtfrakcióban jelen lévő működése a legfontosabb. A citoszolális GST családnak további hét alcsoportját különböztetjük meg (Mú, Pi, Téta, Alfa, Szigma, Omega és Zéta), melyek genetikai polimorfizmusa összefüggésbe hozható az oxidatív stresszel, gyulladási folyamatokkal szembeni sejszintű védekezés károsodásával. Legújabb kutatások kimutatták, hogy az enzim bizonyos polimorfizmusai kapcsolatban állnak a tüdő transzplantációt követő reperfúzió incidenciájának növekedésével, tüdő adenokarcinóma előfordulási gyakoriságának emelkedésével, valamint különböző stimulusk által okozott akut tüdőkárosodás (acute lung injury, ARDS) kialakulásával. További vizsgálatok megállapították, hogy a GST gyógyszeres gátlása jelentősen csökkenti a tüdő epithel sejtek oxidatív stresszel szembeni ellenállását.

## **1.2.ISZKÉMIÁS/REPERFÚZIÓS KÁROSODÁS**

Már régóta ismert a szövetek iszkémia-reperfúzió (I/R) okozta károsodása. A különböző módokon kialakuló és különböző ideig fennálló iszkémia után a szöveteket egy megnövekedett volumenű és nyomású keringés terheli meg, amely reperfúziós károsodást idézhet elő. A reperfúziós károsodás alapvető oka, hogy a korai reperfúzió alatt keletkező oxigén szabadgyökök, reaktív oxigén intermedierek (ROI) mennyisége meghaladja az endogén antioxidáns rendszer (EAR) (antioxidáns enzimek, szabadgyökfogó vegyületek, lipolitikus és proteolitikus enzimek, proteázok, foszfolipázok, hősokk fehérjék) kapacitását és ezáltal kialakul az oxidatív stressz.

## **1.3.ISZKÉMIÁS POSZTKONDITIONÁLÁS**

A szövetek iszkémia-reperfúzió (I/R) okozta károsodása mindmáig általános probléma a sebészetben. Jelentős kutatási eredmények azt mutatják, hogy a károsodást alapvetően olyan gyulladáshoz vezető válaszreakciók okozzák, melyek az iszkémiás szövet reoxigenálását követően triggerelődnek. Tervezett iszkémia-reperfúzióval járó beavatkozások esetében a prekondicionálás (IPC) a klinikum számára is meglepően hatékonyan bizonyult, azonban terápiás használhatóságát jelentősen beszűkíti, hogy akut érelzáródások (embólia, thrombózis, miokardiális infarktus) esetében nem kivitelezhető. Vinten-Johansen és munkacsoportja 2003-ban közölte meglepő eredményeit: a tartós iszkémiát követően alkalmazott rövid I/R ciklusok is hatékonyan csökkentik a reperfúziós károsodásokat. A jelenséget a prekondicionálástól megkülönböztetve posztkondicionálásnak (IPoC) nevezték el, és számos szerző különböző kísérletes modelleken igazolta a miokardium posztkondicionálása esetében az infarktus elleni védő hatását. Az iszkémiás posztkondicionálással kiváltható védelem a ma ismert leghatékonyabb celluláris endogén védelmi mechanizmus az I/R károsodásokkal szemben.

## **1.4.KOSZORÚÉR BYPASS MŰTÉT ÉS PERIOPERATÍV MIOKARDIÁLIS INFARKTUS**

Az elmúlt évtizedben az elektív koszorúér bypass graft műtét (CABG) bizonyult a fő revaszkularizációs eljárásnak a szívkoszorúér szűkületben (CAD) szenvedő betegek esetében, amely egy nagyon egységes és biztonságos sebészeti eljárássá vált alacsony mortalitási rátával, csökkent neurológiai és egyéb mellékhatásokkal.

A perioperatív miokardiális infarktus (PMI) a CABG műtétet követően előforduló legsúlyosabb szövődmény, amely napjainkban a morbiditás és mortalitás leggyakoribb okát jelenti.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

**Kísérleteink első sorozatában** a GST enzim biológiai szerepét vizsgáltuk. Kísérleteink célja elsősorban az volt, hogy meghatározzuk a farmakológiai GST gátlás hatását etakrinsav (EA) adását követően egy in vivo miokardiális infarktuson átesett patkány modellen.

- Célul tűztük ki a GST gátlás hatásának vizsgálatát a miokardium károsodásának és az oxidatív stressz paraméterek változásának tekintetében.
- Megfigyeltük a fehérjék, valamint a mitogén aktivált protein (MAP) kináz és RISK jelátviteli utak változásait, valamint a szívizomsejtek apoptózisának folyamatait miokardiális infarktus fennállása esetén.

- Vizsgáltuk az iszkémiás posztkondicionálás (IPoC) védő hatását egyidejű GST gátlással, meghatározva a pro- és antiapoptotikus MAPK és RISK jelátviteli utak aktiválódását.

**Kísérleteink második sorozatának** célkitűzése volt meghatározni a kapcsolatot a GSTP1, GSTM1 és GSTT1 metabolizáló gének polimorfizmusai és a perioperatív akut miokardiális infarktus előfordulásának gyakorisága között kardiopulmonáris bypass műtéten átesett betegek esetében.

A különböző GST allél variánsok megváltoztathatják a szervezet detoxifikáló erejét, ezáltal feltételezhetjük a kapcsolatot a GST enzim detoxifikációs aktivitásának változásai és a kardiovaszkuláris betegségek szövődésének előfordulása között (PMI).

### **3. A GLUTATION S-TRANSZFERÁZ (GST) HATÁSA IN VIVO AKUT MIOKARDIÁLIS INFARKTUSON ÁTESETT PATKÁNY MODELLBEN**

#### **3.1. BEVEZETÉS**

Az oxidatív stressz és az iszkémiás károsodás fontos szerepet játszik számos kardiovaszkuláris betegség patogenezisében, illetve gyakori velejárója lehet a különböző klinikai, többek között sebészeti beavatkozásoknak is. Számos védő mehanizmus között a glutation-S-transzferáz (GST) kulcsfontosságú szerepet tölt be az elektrofilek és az oxidatív stressz fellépése során keletkező káros anyagcsere termékek nagy kapacitású inaktivációjában valamint a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli utak szabályozásában és ezáltal a stresszre adott sejtválaszban, a sejtproliferáció és az apoptózis irányításában.

Habár in vivo körülmények között a GSH elhasználódásának hatása jól ismert különböző patológiai állapotokban, a GST aktivitásának pontos szerepe szívizomsejtek apoptózisára és a jelátviteli utak megváltozására még pontosan nem meghatározott.

#### **3.2. CÉLKITŰZÉS**

Kísérleteink célja a glutation S-transzferáz (GST) biológiai szerepének vizsgálata indukált oxidatív stressz állapotokban akut miokardiális infarktuson átesett patkány modellben. Elsődleges célunk volt a posztkondicionálás jótékony, védő hatásának vizsgálata, valamint farmakológiai GST gátlás (etakrinsavval – EA) hatásának vizsgálata a szívizomsejtek apoptózisára, továbbá a MAP kináz jelátviteli utak változásának tanulmányozása miokardiális I/R, illetve PC alkalmazása esetén.

#### **3.3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

##### **3.3.1. Állatmodell és sebészi protokoll**

70 db Whistar patkányt (200-250 g) használtunk fel a vizsgálat sorozathoz. Az altatott állatokon tracheotómia után lélegeztetés mellett sternotomiát végeztünk, izoláltuk a bal koronária elülső leszálló ágát (LAD), melynek lekötése zártuk a sebet. A 40 perc iszkémiát követően a leszorítás felengedésével 120 perces reperfüziót alkalmaztunk.

### 3.3.2. Az etakrinsav hatása és adagolása

Jelen vizsgálatainkban a GST szerepének tisztázására az enzim etakrinsavval előidézett farmakológiai gátlását használtuk fel. Az EA a GST izoenzimek többségének szubsztrátja. Az etakrinsav GSH-val való nem enzimátikus konjugálása révén keletkező termék (EA-SG) a GST-enzimek gátlószere, sőt nagyobb aktivitással kapcsolódik az enzimhez, mint az EA, ami maga is gátolja a GST-t reverzibilis kovalens kötések keresztül.

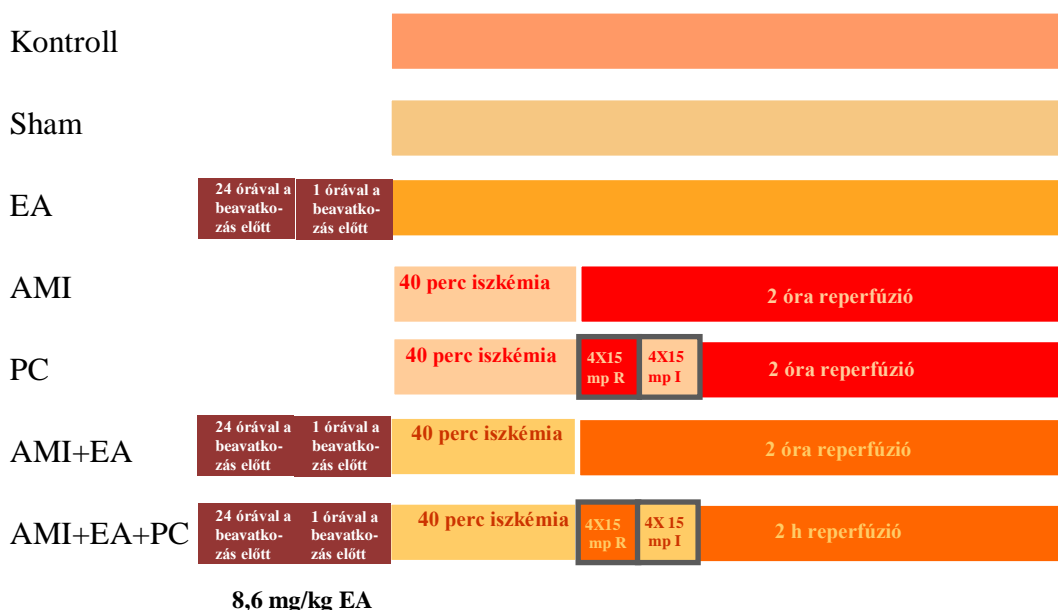
A humán diuretikus dózisnak megfelelően 86 mg etakrinsavat 2 ml 96%-os etanolban oldottunk, majd fiziológias sóoldattal 10 ml végtérfogatra egészítettük ki, így kaptuk meg a kívánt 8,6 mg/ml-es koncentrációt, melyet 24 órával, illetve 1 órával a beavatkozás megkezdése előtt intraperitoneális injekció formájában alkalmaztunk.

### 3.3.3. A szívizom iszkémiás poszt kondicionálása

A poszt kondicionált csoportokban ( EA, AMI+EA, AMI+EA+PC ) a 40 perces iszkémiás periódus lejárta után 15 másodperces reperfüziós, majd ezt követve 15 másodperces iszkémiás fázisokat alkalmaztunk négy ciklusban. A mindösszesen így 2 perces poszt kondicionálás lejárta után a protokoll szerinti 120 perc reperfüziót kezdtük meg.

### 3.3.4. Kísérleti protokoll

Az állatokat hét csoportra osztottuk. Az első csoport a nem operált csoport (kontroll), a második egy operált, de iszkémiát nem szenvedett csoport (sham), a harmadik egy etakrinsavat kapott csoport (EA), egy infarktusz csoport volt a negyedik (AMI), az ötödik a poszt kondicionált csoport volt (PC), a hatodik etakrinsavat kapott infarktusz csoport (AMI+EA) és a hetedik pedig az etakrinsavat és poszt kondicionálást is kapott (AMI+EA+PC) csoport. (1.ábra)



1. ábra Kísérleti csoportok és protokoll

A reperfüzió végén az állatoktól vért vettünk a vena cava-n keresztül, a kinyert szérum mintákat fagyasztottuk, majd a további biokémiai vizsgálatok elvégzéséig -80 C°-on tároltuk.

A szív kimetszése után az iszkémiás területet kivágtuk és először folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd a továbbiakban -80 C°-on tároltuk.

Az elvégzett mérések a következők voltak: ECG, pulzusszám és szisztémás vérnyomás monitorozása és 10 percenkénti rögzítése a teljes kísérlet alatt, tetrazólium-módszer az infarktusos terület kimutatására, plazma GST és további oxidatív stressz paraméterek: malondialdehid (MDA), glutation (GSH) and plazma thiol (SH) csoportok, szuperoxid dizmutáz (SOD), szérum mieloperoxidáz, serum TNF-alpha és IL-1 meghatározása és western-blot analízis a pro/antiapoptotikus (p38, ERK, Bad, GSK3β) szignalizációs útvonalak meghatározására.

### **3.3.5. Statisztika**

Az összes adatot az átlag±az átlag standard hibájaként (S.E.M) adtuk meg. A csoportok közötti különbségeket egyirányú ANOVA és Student t-teszttel értékeltük ki. A p-értékét szignifikánsnak tekintettük, ha kisebb volt, mint 0,05.

## **3.4. EREDMÉNYEK**

### **3.4.1. Hemodinamika**

Hemodinamikai különbségek nem voltak a csoportok között.

### **3.4.2. Infarktus terület kimutatása tetrazólium módszerrel**

Az infarktus terület nagysága minden vizsgált csoportban (PC, AMI+EA, AMI+EA+PC) szignifikáns különbséget mutatott az AMI csoporthoz viszonyítva. A PC csökkentette az infarktus terület nagyságát a PC és AMI+EA+PC csoportokban az AMI-hoz és AMI+EA-hoz viszonyítva. A károsodás mértéke szignifikánsan magasabb volt EA jelenlétében az AMI+EA+PC csoportban a PC-hez viszonyítva.

### **3.4.3. Plazma GST koncentráció meghatározása**

A plazma GST koncentrációja a kontrollhoz képest az AMI+EA és az EA csoportokban szignifikáns csökkenést mutatott. A PC csoportban szignifikáns emelkedést figyeltünk meg az AMI csoporthoz viszonyítva. A PC és AMI+EA+PC csoportokat összehasonlítva a GST szintje az EA jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb volt.

### **3.4.4. Malondialdehid és plazma malondialdehid szintek összehasonlítása**

A malondialdehid koncentrációja a kontrollhoz képest öt csoportban (EA, AMI, PC, AMI+EA, AMI+EA+PC) mutatott szignifikáns emelkedést. A PC és AMI+EA+PC csoportokat összehasonlítva az utóbbi csoport MDA szintje szignifikánsan emelkedett. Ha ugyanezt a csoportot az AMI+EA csoporttal vetjük össze, itt szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

A plazma malondialdehid szintjeinek összehasonlítása során ugyanezen összefüggéseket figyeltük meg.



### **3.4.5. Redukált glutation (GSH)**

A GSH koncentrációja a kontrollhoz képest két csoportban ( PC, AMI+EA ) mutatott szignifikáns csökkenést. Az AMI+EA+PC csoportban szignifikánsan magasabb volt a GSH koncentrációja, mint a PC nélküli (AMI+EA) csoportban.

### **3.4.6. Plazma thiol (SH) csoportok kimutatása**

Az SH koncentrációja a kontroll vagy az AMI+EA+PC csoportokhoz képest az AMI+EA csoportban mutatott szignifikáns csökkenést. Az AMI+EA és AMI+EA+PC csoportokban az EA-t nem tartalmazó csoportokhoz képest (AMI, PC) az SH koncentrációja lecsökkent.

### **3.4.7. Szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitásának meghatározása**

A SOD koncentrációja a kontrollhoz képest két csoportban ( EA, AMI+EA ) mutatott szignifikáns csökkenést és két csoportban (sham, AMI+EA+PC) szignifikáns emelkedést. Az AMI és AMI+EA csoportok között EA jelenlétében a SOD szignifikánsan csökkent. Az AMI+EA és AMI+EA+PC csoportokat összehasonlítva PC jelenlétében a SOD értéke szignifikánsan megnőtt.

### **3.4.8. Szérum mieloperoxidáz (MPO) koncentrációk összehasonlítása**

Az MPO koncentrációja a kontroll csoporthoz képest minden csoportban szignifikáns emelkedést mutatott. A PC csoportban szignifikánsan csökkent, az AMI+EA csoportban szignifikánsan nőtt az MPO koncentrációja az AMI csoportéhoz viszonyítva. Az EA kezelés szignifikánsan csökkentette az MPO koncentrációját az AMI+EA+PC csoportban a PC csoporthoz viszonyítva.

### **3.4.9. Szérum TNF-alpha értékek**

A szérum TNF-alpha koncentrációja a kontroll csoporthoz képest öt csoportban mutatott szignifikáns emelkedést (EA, AMI, PC, AMI+EA, AMI+EA+PC). Az EA kezelés már önmagában káros hatást mutatott, továbbá a PC védő hatását sem tudtuk EA jelenlétében igazolni.

### **3.4.10. Szérum interleukin-1 (IL-1)**

A szérum IL-1 koncentrációja a kontroll csoporthoz képest a három EA-kezelt csoportban mutatott szignifikáns emelkedést (EA, AMI+EA, AMI+EA+PC). Ha az EA kezelést AMI-val kombináltuk, a változás még kimagaslóbbá vált, míg a PC nem hozott szembevető változást az értékekben, még az EA-val kombinált PC csoportban sem.

### **3.4.11. Pro/antiapoptotikus szignalizációs útvonalak analízise**

A p38 MAPK foszforilációja a kontroll a csoporthoz képest a négy csoportban mutatott szignifikáns emelkedést (AMI, EA, AMI+EA, AMI+EA+PC). A PC-val kezelt csoportokban a p38 MAPK foszforilációja mérséklődött (PC vs. AMI, AMI+EA vs. AMI+EA+PC). Az EA kezelés jelentősen megnövelte az aktivált p38 mennyiségét az EA nélküli csoportokhoz viszonyítva (AMI+EA vs. AMI, AMI+EA+PC vs. PC).

Az ERK foszforilációja a kontroll a csoporthoz képest az áloperált csoport kivételével minden csoportban erős szignifikáns emelkedést mutatott. Az áloperált csoportban gyenge emelkedést láttunk. Az AMI csoporthoz viszonyítva a PC és AMI+EA csoportokban az ERK aktivációjának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk. Az AMI, PC és AMI+EA csoportokban az ERK aktív, foszforilált formája szignifikánsan magasabb volt, mint az AMI+EA+PC csoportban.

A Bad proapoptotikus aktivitásának gátlása foszforilációja útján valósul meg. A p-Bad koncentrációja a kontroll a csoporthoz képest öt csoportban mutatott szignifikáns változást (AMI, PC, AMI+EA, EA, AMI+EA+PC). Eredményeink szignifikáns különbségeket mutattak az AMI és AMI+EA, illetve az AMI és AMI+EA+PC csoportok között. EA jelenlétében a Bad csökkent foszforilációja mutatkozott, amely rontotta a sejt túlélését. Ezzel ellentétben a PC növelte a p-Bad értékét AMI csoportéhoz viszonyítva. Az AMI+EA+PC csoportban alacsonyabb p-Bad értéket találtunk a PC csoporthoz képest. A PC protektív hatását tehát gyengébbnek tapasztaltuk EA kezelés jelenlétében.

A GSK-3 $\beta$  koncentrációja a kontroll a csoporthoz képest öt csoportban mutatott szignifikáns emelkedést (EA, AMI, PC, AMI+EA, AMI+EA+PC). Az AMI+EA+PC csoportban az AMI+EA csoporttal összevetve a GSK-3 $\beta$  szignifikáns csökkenését tapasztaltuk.

### **3.5. KONKLÚZIÓ**

A plazma GST szintjének változásából nyert eredményeink azt mutatják, hogy az EA a GST farmakológiai gátlásának hatásos szerepe, amely súlyosbítja az oxidatív károsodás mértékét akut miokardiális infarktuson átesett patkány modellben. Eredményeinket megerősítette az infarktus terület nagyságának analízise, amely emelkedett volt EA jelenlétében, míg a PC mérsékelni tudta a miokardiális I/R okozta károsodás nagyságát. A GST gátlásával a PC jótékony hatása elmaradni látszott.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a GST farmakológiai gátlása tovább növeli az erőteljesen megemelkedett oxidatív stressz mértékét miokardiális I/R fennállása alatt. Az iszkémiás PC jótékony hatása megmutatkozik az oxidatív stressz paraméterek csökkenésén keresztül, amely hatás az EA jelenlétében sem tűnik el. Eredményeink alapján elmondható, hogy a GST gátlása önmagában megnöveli a proinflammatorikus citokinek nagyságát, melyen a PC hatása nem változtat.

A GST mint antioxidáns enzim, fontos szerepet játszik a MAPK és RISK jelátviteli utak szabályozásában. Számos tanulmány támasztja alá, hogy a MAPK-ok fontos szabályozói az apoptózisnak, a miokardiális iszkémia/reperfúzióra adott válaszban. A MAPK aktiválódnak válaszul számos ingerre, ezáltal játsszva kiemelt szerepet a különböző szignálok közvetítésében a sejtfelszíni receptoroktól a sejtmagig.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a GST farmakológiai gátlása már önmagában változást jelent a MAPK és RISK útvonalak aktivitására miokardiális I/R alatt, megnöveli a proapoptotikus p38, az antiapoptotikus ERK szignalizációs proteinek mennyiségét, megnöveli továbbá a GSK-3 $\beta$  és lecsökkenti a p-Bad aktivációját, továbbá képes megszüntetni a PC védő hatását.

Eredményeink rámutatnak a GST meghatározó szerepére az oxidatív stressz mértékének kialakításában, és a GST gátlás további vizsgálatának fontosságára.

## **4. A GST POLIMORFIZMUSÁNAK KOCKÁZATI TÉNYEZŐKÉNT VÁLLALT SZEREPE SZÍVMŰTÉTET KÖVETŐEN BEKÖVETKEZŐ AKUT MIOKARDIÁLIS INFARKTUS KIALAKULÁSÁNAK FOLYAMATÁBAN**

### **4.1. BEVEZETÉS**

A GST antioxidáns enzim aktivitása nagyban meghatározza a sejtek oxidatív stresszre adott gyulladáshoz és adaptív válaszára. Legfőbb szerepe az oxidatív stressz során keletkezett káros termékek valamint hidrofób, elektrofil komponensek redukált glutationnal történő konjugálása, így kevésbé toxicus termékek létrehozása. A citoszolikus GST családnak mai ismereteink szerint hét alcsoportja különböztethető meg (Mú, Pi, Téta, Alfa, Szigma, Omega és Zéta), melyek genetikai polimorfizmusa szerepet játszik különböző betegségek kialakulásában. Allélváriánsuk összefüggésbe hozható a műtétet követő oxidatív stressz súlyosságával, a gyulladáshoz folyamattal szembeni sejt szintű védelemmel, befolyásolják a tumoros és a cardiovascularis betegségekre való hajlamot. Minden enzimet külön gén vagy gén család kódol. A genotípus összefüggésbe hozható az oxidatív stresszel és gyulladáshoz folyamattal szembeni sejt szintű védekezés károsodásával. A GST polimorfizmusok valószínűleg közreműködnek az egyéni különbségek kialakításában a xenobiotikumokra adott válasz és az oxidatív stressz termékeinek közönbösítése terén. A GSTP1 izoforma az egyik leggyakrabban vizsgált izoenzim, mely miokardiumban való kifejeződése erős. Génje a 11. kromoszómán található, vad alléljának genotípusa: GSTP1\*A→105 kodon ATC (ile) és 114 kodon GCG (ala). Két további allél váriánsa ismert: GSTP1\*B→105 kodon GTC (val) és 114 kodon GCG (ala); GSTP1\*C→105 kodon GTC (val) és 114 kodon GTG (val). A gén különböző homozigóta és heterozigóta kombinációkban fejeződik ki. A GSTM1 és GSTT1 gének esetében homozigóta allél esetén teljes enzim aktivitást, heterozigótaság esetén csökkent enzim aktivitást, míg aktív allél hiányában „null” enzim aktivitás figyelhető meg. A perioperatív miokardiális infarktus (PMI) 2,5- 30 % közötti gyakorisággal jelentkezik felnőtt szívsebészeti műtétet követően a különböző vizsgálatokban és különböző diagnosztikai kritériumok alapján. Egyértelmű összefüggést mutat a mortalitás, morbiditás emelkedésével. Irodalmi adatok alapján meghatározott rizikófaktorok: preoperatív iszkémia, elhúzódó aorta lefogás, inkomplett revaszkularizáció.

Vizsgálataink során célul tűztük ki nyitott szív műtéten (koronária-bypass, billentyű rekonstrukció) átesett betegek GSTP1, GSTM1, GSTT1 gén polimorfizmusának meghatározását, különös tekintettel a posztoperatív szövődményekre.

### **4.2. BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK**

#### **4.2.1. Beteganyag**

Zala Megyei Kórház Szívsebészeti Osztályán 2010 január és július között, illetve a PTE-ÁOK Szívgyógyászati Klinikán 2010. április és szeptember között nyitott szív műtéten átesett betegek (758 beteg) kerültek vizsgálatra előzetes szelekciót követően. Kizárási kritériumok a következők voltak: preoperatív iszkémia, instabil angina, 6 hónapon belüli akut miokardiális infarktus, dekompenzáció, csökkent ejekciós frakció (EF <40%), LVESD>40mm, jelentős hypertrophia (IVS, PW>15mm, LVmassI>130g), veseelégtelenség, elhúzódó aortalefogás, extrakorporális keringés (90, illetve 120 perc), postoperatív elhúzódó hipotenzió, 2 E vvt-t meghaladó transzfúzió, regionális iszkémiára utaló EKG eltérés, posztoperatív echocardiográfián észlelt regionális falmozgászavar, coronarographián jelzett graft okklúzió.

A betegektől a műtét előtti, közvetlenül műtét utáni, majd 8 és 24 óra elteltével vérvétel történt, melynek során a plazmából keratin-kináz (CKMB) és troponin I (TI) meghatározása zajlott.

A kizárási kritériumok alapján végül 132 minta genetikai feldolgozása történt meg az előzetes anamnézis alapján (89 férfi és 43 nő), átlag életkor 59.8 év.

1. csoport: Kontroll csoport (n=78): PMI nélküli posztoperatív időszak, CKMB érték a műtétet követő 24 órában nem haladja meg a normál érték 2,5-szeresét.
2. csoport: Szövődményes csoport (n=54): Ezen időszakban a szívmarkerek értékei meghaladják a normál tartomány ötszörösét.

A beteg szelekció alapját képező klinikai vizsgálatok a következők voltak: a szív-tüdő motoridő (PT), az aorta leszorítás ideje (ACCT), a műtét során vesztett vér mennyisége, a műtétet végző orvos, a plazma CK-MB szintje a műtét előtti, majd műtét utáni első és harmadik napokon, ST elevációs eltérések, az ejekciós frakció változása, a társbetegségek jelenléte, a kórházban töltött napok száma.

#### **4.2.2. Genetikai vizsgálatok**

Vérből DNS izolálás után a GSTP1 gén polimorfizmus vizsgálatát az általunk tervezett RT-PCR módszer segítségével végeztük. Real-time PCR módszer alkalmazásával a GSTP1 gén 3 polimorfikus alléljának azonosítása, allél frekvencia meghatározása történt. A Taqman SNP genotipizálás standard PCR kondíciókkal végeztük. A GSTM1 és GSTT1 géneket Taqman CNV assay alkalmazásával vizsgáltuk. A GSTM1 esetében ez a Chr.1:110231516 kromoszóma régiót, míg a GSTT1 esetében a Chr.22:24376493 régiót érintette. A GSTP1, GSTM1 és GSTT1 gének analízisét elvégeztük az általunk a vizsgálatba bevont 54 szövődményes és 78 szövődménymentes beteg esetében. A GSTP1 gén esetében megállapítottuk a 3 polimorfikus allél (GSTP1\*A, GSTP1\*B és GSTP1\*C) előfordulásának gyakoriságát. A GSTM1 és GSTT1 gének esetében a null fenotípus a gén deléciójának felel meg (két null allél, -/-), míg egy allél deléciója esetén (+/-) az enzim csökkent működését, míg mindkét allél megléte (++) esetén az allél teljes működését jelenti. Feltételezésünk szerint összefüggés lehet az allélek megléte, ezáltal a védő funkciójú GST enzimek működése és a PMI előfordulási gyakorisága között.

#### **4.2.3. Statisztikai analízis**

Az összes klinikai adatot az átlag±az átlag standard hibájaként (S.E.M) adtuk meg. A csoportok közötti különbségeket khi-négyzet ( $\chi^2$ ) és Mann-Whitney -teszttel értékeltük ki. Az odds értékeket (ORs) a többszörös regressziós analízis eredményeként állapítottuk meg. A 95 %-os konfidencia intervallum (95% CI) értékét az összes ORs eredményre az SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) program segítségével számoltuk ki. A p-értékét szignifikánsnak tekintettük, ha kisebb volt, mint 0,05.

### **4.3.EREDMÉNYEK**

Nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között a nem, az életkor, a preoperative rizikó faktorok és a posztoperatív vérvesztés tekintetében. Az intraoperatív faktorok (ACCT-, CPB idő, operáció időtartalma) tekintetében szintén nem volt különbség a csoportok között.

### 4.3.1. A GSTP1 gén genotípus analízise

Az allél frekvenciák tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a homozigóta AA, illetve a heterozigóta AB és BC allélek megoszlásában a csoportok között, míg a heterozigóta AC allélkombináció esetében majdnem háromszoros emelkedést tapasztaltunk a PMI-t elszenvedett csoportban. A kontroll csoport esetében 14 %-os allélfrekvenciát észleltünk a homozigóta BB allél kombináció előfordulásában, míg a szövődményes PMI csoportban erre egyetlen példát sem találtunk. (1. Táblázat)

Megállapíthatjuk tehát, hogy az A allél jelenléte szignifikáns különbséget mutat a csoportok között. Ez a különbség a többszörös regressziós analízist a nem és életkor tekintetében alkalmazva méginkább egyértelmű (14.905 (1.859–119.495);  $p = 0.011$ ). Az A allél jelenléte tehát egyértelműen hajlamoító faktort jelent a PMI előfordulásának tekintetében. A B allél védő hatását statisztikailag nem sikerült ugyan igazolni (0.610 (0.293–1.269);  $p = 0.186$ ), (2. Táblázat), azt megállapíthatjuk, hogy az A allél jelenléte kockázatot jelent a PMI előfordulása szempontjából.

#### 1. Táblázat Allél frekvenciák megoszlása a PMI és a kontroll csoportok között

<b>PMI csoport (n=54)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>A</b>	26 (48.1%)	17 (31.5%)	10 (18.5%)
<b>B</b>	-	-	1 (1.9%)
<b>C</b>	-	-	-

<b>kontroll group (n=78)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>A</b>	37 (47.4%)	20 (25.6%)	6 (7.7%)
<b>B</b>	-	11 (14.1%)	3 (3.8%)
<b>C</b>	-	-	1 (1.3%)

**2. Táblázat** Többszörös regressziós analízis a PMI előfordulásának rizikófaktor meghatározására a GSTP1 gén haplotípus hordozásának tekintetében

<b>Korrigált OR* frekvencia</b>		
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>(AA+AB+AC)</b>	<b>(AB+BB+BC)</b>	<b>(AC+BC+CC)</b>
<b>14.905*</b>	0.610	1.755
<b>(1.859-119.495)</b>	(0.293-1.269)	(0.681-4.520)
<b>p= 0.011</b>	p=0.186	p=0.244

P<0.05 vs. kontroll

OR\*- Nemre és korra korrigált OR érték

A 95% konfidencia intervallum (95% CI) az összes OR értékre.

#### **4.3.2. A GSTM1 gén genotípus analízise**

A GSTM1 gén genetikai analízise során megállapítottuk, hogy a PMI csoportban az 54 beteg közül 8 esetében (14,8%) hordozza a “null” genotípust, míg a fennmaradó 85,2% (54 betegből 46) hordozza a GSTM1 gén egyik vagy mindkét allélját. A kontroll csoport esetében hasonló eredményeket tapasztaltunk, miszerint a 78 betegből 7 esetében (9,0%) találtunk “null” allélt, és 71 beteg esetében (91,0%) található meg a gén egyik vagy mindkét allélja. Statisztikailag nem találtunk különbséget a két csoport között a GSTM1 gén esetében. (P = 0.303).

#### **4.3.3. A GSTT1 gén genotípus analízise**

A 78 kontroll betegből 21 esetben (26,9%) találtunk homozigóta “null” genotípust a GSTT1 tekintetében. 57 beteg hordozta a gén egyik vagy mindkét allélját (73,1 %). A PMI csoportban az 54 betegből 6 (11,1%) esetben találtunk “null” allélt, míg 46 beteg esetében (85,2%) egy- vagy mindkét allél megléte bebizonyosodott. Ezen kívül 2 esetben (3,7%) mérési elégtelenségből adódóan nem tudtuk a genotípust megállapítani. Az eredmények alapján felvetődött a kérdés, hogy esetlegesen kapcsolat lehet a GSTT1 null genotípus és a PMI be nem következése között, amely statisztikailag is bebizonyosodott (P=0,039) (3.Táblázat). A többszörös regressziós analízis eredményeként azt az eredményt kaptuk, hogy bizonyítható kapcsolat van a teljes gén deléciója és a PMI bekövetkezése között, amely védő faktorként játszhat szerepet egy szívműtétet követő perioperatív időszakban (OR = 0,354 [0,132–0,950]; 95% CI).

**3. Táblázat** Többszörös regressziós analízis a PMI előfordulásának rizikófaktor meghatározására a GSTT1 gén tekintetében

Nem korrigált OR frekvencia	Korrigált OR* frekvencia
<b>GSTT1</b>	<b>GSTT1</b>
0.354*	0.317*
(0.132-0.950)	(0.116-0.869)
p=0.039	p=0.026

P<0.05 vs. kontroll

OR\*- Nemre és korra korrigált OR érték

A 95% konfidencia intervallum (95% CI) az összes OR értékre.

#### 4.4. KONKLÚZIÓ

A perioperatív miokardiális infarktus a szívműtétek során leggyakrabban előforduló és legsúlyosabb szövődmény. Előfordulása összefüggésben áll a coronaria bypass graft műtét során fellépő miokardiális károsodás mértékével. A korai graft diszfunkciók okozta károsodás az esetek 1-3 %-ában jelenik meg. Ezek okai lehetnek a korai graft trombózis, az anasztomózis szűkülete, a bypass megtörése, túlfeszítése, spazmusból adódó feszülése vagy inkomplett revaszkularizáció. Grafttól függetlenül rizikófaktorot jelenthet a szívizom nem megfelelő védelme a műtét során, a hosszadalmas műtéti eljárás, amely hosszú aorta lefogási idővel és szív-tüdő motor idővel jár, a műtét közbeni defibrilláció, levegő- vagy plakk embolizáció vagy akár a genetikai eltérések. További rizikó faktort rejthet magában a beteg kora, különböző koszorúér betegségek, háromér-betegség fennállása, csökkent bal kamrai funkció, instabil angina, korábban előforduló miokardiális infarktus, illetve a már elszenvedett műtétek száma. A PMI előfordulása megnövekedett mortalitást és morbiditást mutat. A szövődmény előfordulásában megfigyelhető betegek közötti különbségek és az egymástól függetlenül előforduló rizikó faktorai miatt előfordulásában genetikai tényezők is szerepet játszhatnak. Vizsgálataink során 750 tervezett szívműtéten átesett beteget vontunk be a vizsgálatba, melynek során a már jól ismert PMI előfordulását nagyban meghatározó rizikó faktorról rendelkezőket kizártuk, így egy 132 főből álló, a PMI előfordulásának vizsgálatára alkalmas "homogén" beteganyagot kaptunk. Vizsgálataink során a GSTP1, GSTM1 és GSTT1 gének genetikai összefüggéseit kutattuk a PMI megjelenésének tükrében. Eredményink alapján megállapítottuk, hogy a GSTP1 gén genetikai polimorfizmusai és a PMI megjelenése összefüggést mutat. A homozigóta BB allél megjelenése szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportban, míg az A allél jelenléte rizikó faktort jelent a PMI bekövetkezésének tekintetében. A GSTM1 gén tekintetében nem találtunk összefüggést, miszerint beteganyagunkban a gén megjelenése, vagy csökkent működése, hiánya szerepet játszana a PMI bekövetkezésében. Ennek egyik oka az lehet, hogy ezen gén expressziója csak gyenge kifejeződést mutat a szívizom szöveteiben. Vizsgálataink során a GSTT1 null genotípust, mint védő faktort azonosítottuk a PMI tekintetében (OR:0.354, p=0.039). További kutatásaink során szükséges lehet a betegszám emelése, így a szignifikanciák, statisztikai eredmények megerősítése, illetve a betegek utánkövetése, az esetlegesen később előforduló komplikációk és a GST genetikai polimorfizmusai közötti összefüggések feltárása.

## 5. ÚJ EREDMÉNYEK

- 1) In vivo állatkísérletben a GST farmakológiai gátlása emeli az oxidatív stressz paramétereit és növeli az apoptózis mértékét. Az infarktus terület nagyságának mérései alapján megállapítottuk, hogy szignifikánsan nagyobb méretű volt az AMI kiterjedése etakrinsav mellett, a poszt kondicionálás viszont csökkentette az AMI mértékét, míg az etakrinsavas előkezelés a poszt kondicionálás protektív hatását eltünteti.
- 2) A GST gátlás a MAPK és RISK kinázok aktivációját regulálja miokardiális stressz állapotokban. Eredményeink szerint a GST-nek fontos szerepe van a pro- és antiapoptotikus MAPK és RISK kinázok működésében oxidatív stressz okozta apoptózis fennállásakor in vivo patkány modellben.
- 3) Kimutattuk, hogy patkány modellben a GST gátlás csökkenti a poszt kondicionálás protektív hatását és növeli az apoptózis mértékét miokardiális iszkémia fennállásakor, valamint hogy ebben a folyamatban szerepük van a különböző MAPK és RISK kinázoknak.
- 4) Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a GSTP1 gén genetikai polimorfizmusa összefüggésben áll a perioperatív miokardiális infarktus kialakulásával. A homozigóta BB allél kombináció szignifikánsan nagyobb arányban található a perioperatív AMI-t nem szenvedett, tehát szövődménymentes csoportban, míg az A allél jelenléte kockázatot jelent a PMI kialakulásának szempontjából. A GSTM1 gén genotípusa és a PMI előfordulása között nem találtunk összefüggést, míg a GSTT1 null genotípus protektív lehet a PMI kialakulásával szemben.



## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte és mély hálámat témavezetőmnek, **Dr. Róth Erzsébet Professzor Asszonynak**, az önzetlen támogatásért és hogy a Ph.D. hallgatója lehettem. Köszönöm az elmúlt években nyújtott felbecsülhetetlen segítségét, iránymutatását és vezetését.

Köszönettel tartozom további témavezetőimnek, **Dr. Gasz Baláznak** és **Dr. Jancsó Gábornak** rengeteg támogatásáért, vezetéséért és tanításáért munkám során.

Őszintén köszönöm barátaimnak, régi és új munkatársaimnak a Sebészeti Oktató és Kutató Intézetben, nevezetesen, **Dr. Lantos Jánosnak**, **Dr. Borsiczky Baláznak**, **Dr. Balatonyi Borbálának**, **Dr. Nagy Tibornak**, **Dr. Takács Ildikónak**, **Dr. Jávor Szaniszlónak**, **Dr. Hardi Péternek**, **Dr. Kürthy Máriaának**, **Tóthné Fajtik Csillának**, **Karádiné Sztárai Máriaának**, **Pintérné Henrich Évának**, **Jakabovics Adriennek**, **Vörös Katalinnak**, **Bakainé Matus Ilonának**, **Kathleen De Roo-nak**, **Búza Nikolettának**, **Mák Gábornak**, **Tamás Zoltánnak** és a Központi Állatkísérletes Laboratórium valamennyi munkatársának, nélkülözhetetlen segítségükért, munkámhoz biztosított kellemes és baráti környezetért.

Köszönet **Dr. Járomi Lucának**, **Dr. Kisfali Péternek**, **Dr. Szokodi Istvánnak**, **Dr. Alotti Nasrinak**, **Dr. Sétáló Györgynek** és **Vecsernyés Mónikának** és **Dr. Jávor-Hocsák Enikőnek** irányításukért, ötleteikért és rengeteg segítségükért.

Köszönet **Professzor Wéber Györgynek**, **Professzor Szabados Sándornak** és **Professzor Melegh Bélának** türelmükért és támogatásukért. Köszönet **Professzor Sáry Gyulának**, **Dr. Domoki Ferencnek** és **Tóth-Szúki Valériának** támogatásukért és végtelen türelmükért.

Külön hálával tartozom **Wenczler Máriaának**, Ph.D. munkám elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítségéért, kedvességéért.

Köszönet Mindenkinek, aki a fentiekben nem került felsorolásra, de segítséget nyújtott munkámban.

Hálásan köszönöm **Családomnak** munkám során mindvégig nyújtott szeretetüket, türelmüket és folyamatos támogatásukat.