

# **Az endogén antioxidáns enzim, glutation S- transzferáz /GST/ szerepe szívizom-sejttenyészetben indukált oxidatív stressz állapotokban**

Ph.D. Tézis

**Dr. Balatonyi Borbála**



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2013

# **Az endogén antioxidáns enzim, glutation S-transzferáz /GST/ szerepe szívizom-sejtenyészetben indukált oxidatív stressz állapotokban**

Ph.D. Tézis

**Dr. Balatonyi Borbála**

Doktori Iskola vezetője:           Professzor Dr. Komoly Sámuel

Programvezetők:                   Professzor Dr. Róth Erzsébet

Dr. Jancsó Gábor

Témavezetők:                   Professzor Dr. Róth Erzsébet

Dr. Gasz Balázs



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2013

## TARTALOMJEGYZÉK

I.	Bevezetés	4
II.	Célkitűzések	5
III.	A glutation-s-transzferáz (GST) gátlásának hatása oxidatív stresszel károsított szívizomsejtekre	6
IV.	Szelektív MAPK inhibitorok hatása a szívizomsejtek apoptózisára GST gátlást követő oxidative stress állapotokban	11
V.	A GST szerepe az iszkémiás poszt kondicionálás folyamatában	14
VI.	Megbeszélés	17
VII.	Új eredmények	19
VIII.	Köszönetnyilvánítás	20

## 1. BEVEZETÉS

Az oxidatív stressz kialakulása bármilyen szerv 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 valamennyi biomolekula (zsírok, fehérjék, szénhidrátok) oxidatív károsodását idézik elő.

Az utóbbi évek irodalmi adatai felhívták a figyelmet arra, hogy a sejt szintű 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 poszt-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 fő kis molekulasúlyú tiol a citoszólban. A cisztein rész miatt a glutation a különböző elektrofil anyagok által glutation diszulfiddá (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 citoszoliális GST családnak további hét alcsoportját különböztetjük meg (Mú, Pi, Téta, Alfa, Szigma, Omega és Zéta), melyek genetikai polimorfizmusa összefüggésbe hozható az oxidatív stresszel, gyulladásos folyamatokkal szembeni sejt szintű védekezés károsodásával. Legújabb kutatások kimutatták, hogy az enzim bizonyos polimorfizmusai kapcsolatban állnak a tüdő transzplantációt követő rejekeciók incidenciájának növekedésével, tüdő adenokarcinóma előfordulási gyakoriságának emelkedésével, valamint különböző stimulusk által okozott akut tüdőkárosodás (acut 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 (reperfusion injury) 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 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.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

**Kísérleteink első sorozatában** a GST-enzim szerepét vizsgáltuk oxidatív stressznek, illetve iszkémia-reperfúzióknak kitett újszülött patkányból nyert szívizomsejteken. Kísérleteink célja elsősorban az volt, hogy meghatározzuk a farmakológiai GST-gátlás hatását a szívizomsejtek viabilitására, az apoptózis mértékére, valamint a mitogén aktivált protein (MAP) kináz jelátviteli utakra.

**Kísérleteink második sorozatának** fő célja volt, hogy a szelektív MAP kináz (JNK, p38, ERK/p42-44) gátlók hatását vizsgáljuk a sejttúlélésre és az apoptózisra, etakrinsavval (EA) létrehozott GST gátlás mellett.

**Kísérleteink harmadik sorozatában** az iszkémiás posztkondicionálás (IPoC) védő hatását vizsgáltuk izolált szívizomsejteken oxidatív stressz állapotokban egyidejű GST gátlással, meghatározva a pro- és antiapoptotikus MAPK jelátviteli utak (JNK, p38, ERK/p42-44 és GSK-3 $\beta$  protein kináz) aktiválódását.

### **3. A GLUTATION-S-TRANSZFERÁZ GÁTLÁSÁNAK HATÁSA OXIDATÍV STRESSZEL KÁROSÍTOTT SZÍVIZOMSEJTEKRE**

#### **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 szívizomsejtekben 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 izolált szívizomsejteken. Elsődleges célunk volt a farmakológiai GST gátlás (etakrinsavval – EA) hatásának vizsgálata a szívizomsejtek apoptózisára, valamint a MAP kináz jelátviteli utak változásának tanulmányozása.

#### **3.3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

##### **3.3.1. Szívizomsejtek izolálása újszülött patkányokból**

Vizsgálatainkat újszülött patkányból izolált primer szívizomsejt-tenyészetben végeztük korábban már leírt protokoll alapján. 2-4 napos Wistar-patkányokból kamrai szívizomsejteket nyertünk kollagenáz (Gibco™ Collagenase Type II, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) segítségével. Az izolált sejteket I-es típusú kollagénnel (Gibco™ Collagenase Type II, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) fedett tenyésztőedényekbe helyeztük 200.000/cm<sup>2</sup> sűrűségben. A sejteket 10% fetal bovine serum-mal (FBS, Gibco, USA) kiegészített DMEM/F12 (Sigma–Aldrich, USA) médiumban inkubáltuk. A következő napon, amikor a sejtek már szilárdan kitapadtak a tenyésztőedény aljához, a tápoldatot komplett szérumentes médiumra (CSFM: 2,5 mg/ml BSA, 1 µM inzulin, 5,64 µg/ml transferrin, 32 nM szelénium, 2,8 mM Na-piruvát, 0,1-1 nM T3, 100 IU/ml penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin, 200 mM L-Glutamin, DMEM/F-12) cseréltük. A kísérletet 24 órás inkubációt követően kezdtük, és a médiumot 24 óránként cseréltük.

##### **3.3.2. Etakrinsav, a GST potens gátlószere**

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 kötéssel keresztül.

### 3.3.3. Kísérleti protokoll

A szívizomsejteket random módon 6 csoportba osztottuk az alkalmazott kezelések szerint. (1. ábra) A nem kezelt sejteket a kísérlet teljes ideje alatt komplett szérummentes médiumban (CSFM) tartottuk, amelyek pozitív kontrollként szolgáltak (I. csoport). A II. csoportban a médiumhoz etakrinsavat (150  $\mu$ M EA, Sigma) adtunk a GST-enzim gátlására. A III. csoportban 1 mM-os hidrogén-peroxidot ( $H_2O_2$ ) alkalmaztunk az oxidatív stressz indukálására. A IV. csoportban együtt alkalmaztuk a 150  $\mu$ M etakrinsavas-gátlást és az 1 mM-os  $H_2O_2$ -kezelést. Az V. csoportban megfelelő médiumok cseréjével, a szívizomsejteket szimulált iszkémia-reperfúzió (I/R) tettük ki, míg a VI. csoportban 150  $\mu$ M etakrinsavat is hozzáadtunk a kezelt sejtekhez.

Azoknál a csoportoknál, ahol szimulált I/R-t alkalmaztunk, a sejteket 1,5 órás iszkémiának vetettük alá, amihez korábban leírt iszkémiás puffert használtunk (16), majd ezt követte 2,5 óra reperfúzió, ami az iszkémiás puffer CSFM-re cserélésével történt. A VI-os csoportnál, ahol a sejtek I/R- és EA-kezelést is kaptak, mind az iszkémiás mind a reperfúziós médium tartalmazta az etakrinsavat 150  $\mu$ M-os koncentrációban.

Az etakrinsav koncentrációját, megelőző kísérleteink alapján választottuk 150  $\mu$ M-nak, a kezelési időt pedig 4 órának.

A sejtek életképességének vizsgálatára a kezelés befejezése után azonnal sor került. Az apoptotikus jelátviteli markerek meghatározása szintén a kezelés végeztével kezdődött és a permeabilizációig tartott, majd a mintákat így tároltuk  $-20$  °C-on a további feldolgozásig.



1. ábra: Kísérleti csoportok. GST-gátló etakrinsav (EA), hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ), iszkémia (I), reperfúzió (R)

### 3.3.4. Sejtéletképesség vizsgálata

A sejtek életképességét MTT mérési módszerrel határoztuk meg (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma). A módszer alapja, hogy az élő sejtek működőképes mitokondriumai az MTT-t redukálják kék formazán festékké. Ennek abszorbanciáját ELISA-olvasóval mértük meg (Sirio microplate reader, Seac Corp. Florence, Italy), 570 nm-en és a kapott értékeket (arbitrary units; AU) ábrázoltuk. Az eredményeket százalékban fejeztük ki a kontrollértékekhez viszonyítva.

### 3.3.5. A sejtek apoptózis vizsgálata

Az élő és az apoptotikus sejtek arányát fluoreszcein izoticianát (FITC) jelölt annexin V (BD Biosciences, Pharmingen, USA) és propidium-jodid (BD Biosciences, Pharmingen, USA) kettős festést követően flow-citometriával határoztuk meg korábban leírtak alapján. A

mintákat BD FACS Calibur flow-citométerrel mértük (BD Biosciences, USA) és CellQuest szoftverrel analizáltuk. A sejteket minden csoportban az összes festődött sejt százaléka arányában adtuk meg.

### 3.3.6. Jelátviteli markerek vizsgálata

A GST-gátlás jelátviteli útvonalakra való hatását a proapoptotikus mitogén aktivált protein-kinázok (MAPK), mint a Jun N-terminális kináz (JNK), p38, és az antiapoptotikus extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK/p42-p44), valamint a protein-kináz-B (PKB/Akt) aktivitásának flow-citometriás mérésével vizsgáltuk. A minták analízisa az előbbieken említett flow-citométerrel történt. A sejteket minden csoportban az összes festődött sejt százaléka arányában adtuk meg.

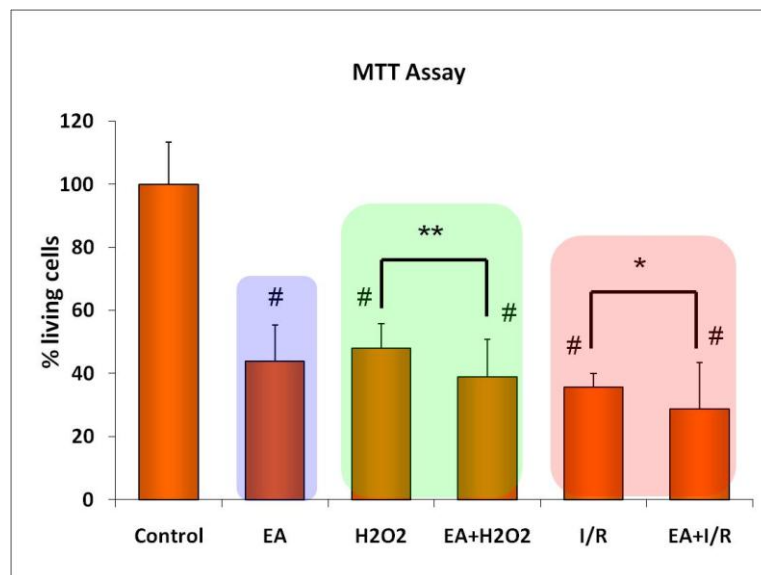
### 3.3.7. Statisztika

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

## 3.4. EREDMÉNYEK

### 3.4.1. MTT assay eredmények

A sejtek életképességét MTT-próbával meghatározva az élő sejtek mennyiségét 100%-nak vettük. Az etakrinsavas gátlás szignifikánsan csökkentette az élő sejtek százalékos arányát (43±11%). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel, előidézett oxidatív stressz és szimulált I/R hasonló mértékű károsodáshoz vezetett. A sejtpusztulás mértéke jelentősen fokozódott, ha a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezelt csoportok sejtjeihez a GST gátló etakrinsavat is hozzáadtuk. (2. ábra)

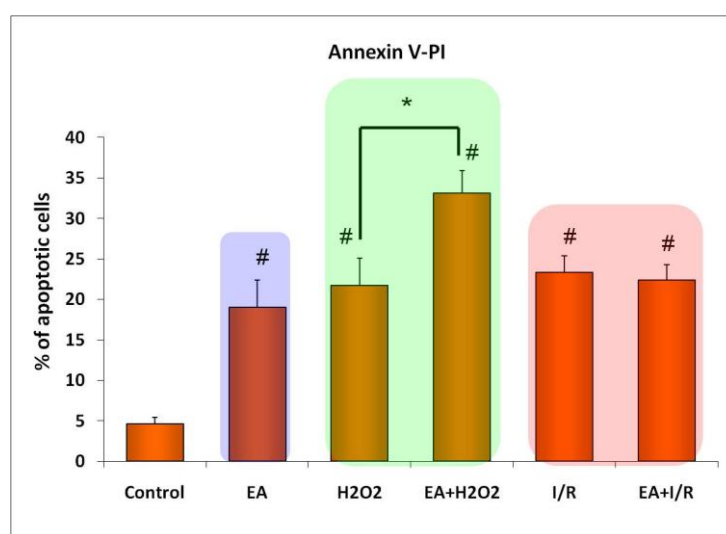


**2. ábra:** Sejt életképesség vizsgálata MTT assay módszerrel. #p<0,05 a kontroll csoporthoz hasonlítva. \*p<0,05; \*\*p<0,01 a jelölt csoportokat egymáshoz hasonlítva. Etakrinsav (EA); Iszkémia/reperfúzió (I/R)



### 3.4.2. Apoptózis mértéke

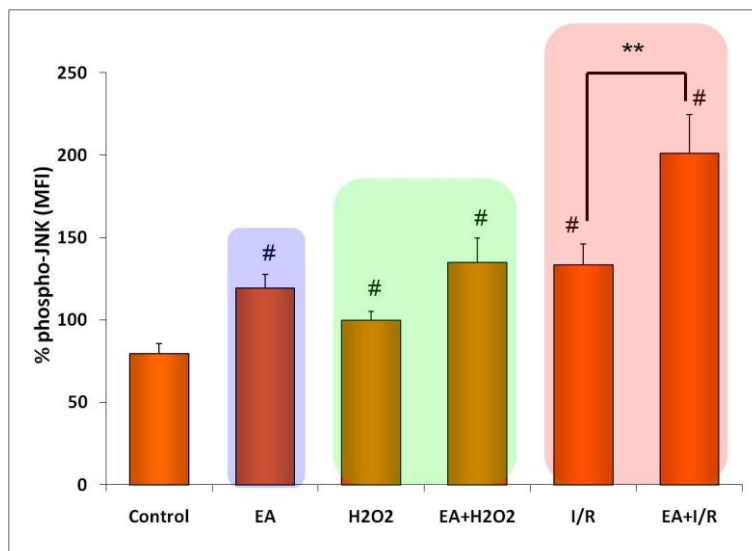
A sejt apoptózis kialakulását flow-citometriával mértük. A kontrollcsoportban  $86\pm 2\%$  volt az élő sejtek (annexin V és PI negatív) és  $5\pm 1\%$  volt az apoptózis korai szakaszában lévő sejtek (annexin V pozitív és PI negatív) aránya. EA adását követően, csökkent az élő és növekedett az apoptotikus sejtek százalékos aránya. Az apoptózis mértéke szignifikánsan megemelkedett mind a  $H_2O_2$ , mind a szimulált I/R-kezelt csoportokban, az élő sejtek alacsonyabb számával. Ha a vizsgált médiumhoz még EA-t is adtunk (kettős stresszhatás), az apoptotikus sejtek mennyisége tovább emelkedett, az élő sejtek mennyiségének csökkenésével. Az EA emelte a nekrotikus sejtek számát (annexin V negatív és PI pozitív) szimulált I/R során, ami csökkent élő sejt számmal járt együtt. (3. ábra)



**3. ábra:** Az apoptotikus sejtek %-os aránya. # $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.  
\* $p < 0,05$  a jelölt csoportokat egymáshoz hasonlítva. Etakrinsav (EA);  
Iszkémia/reperfúzió (I/R)

### 3.4.3. Mitogén aktivált protein kinázok foszforilációja

A szívizomsejtekhez adott GST gátló etakrinsav szignifikánsan emelte a JNK foszforilációját. Amennyiben az oxidatív stresszel egyidejűen GST gátlást is alkalmaztunk, a JNK aktivációja tovább emelkedett, szignifikáns mértékűvé a szimulált iszkémia/reperfúziós kezelést követően vált. (4. ábra) A GST gátlása, a  $H_2O_2$ -vel létrehozott oxidatív stressz és a szimulált iszkémia-reperfúzió a p38 MAPK szignifikáns aktivációjához vezetett a kontrollcsoporthoz képest. Ha a sejteket  $H_2O_2$  és EA-val együtt inkubáltuk, a foszforilált p38 szintje jelentősen nőtt a csak  $H_2O_2$ -vel kezelt csoporthoz képest. A legkifejezettebb változást a szimulált iszkémia-reperfúzióval együtt alkalmazott GST-gátlás hozta létre, ahol a p38 aktivitása  $358\pm 5\%$ -ra emelkedett a kontrollértékekhez képest. Az ERK/p42-p44 foszforilációja szignifikánsan megemelkedett a GST gátló csoportokban, ha a sejteket  $H_2O_2$ -dal kezeltük, vagy szimulált I/R-nek tettük ki. A szimulált I/R-nek kitett és az EA-val inkubált szimulált I/R-csoport között szignifikáns eltérés volt kimutatható. Mind az EA és a  $H_2O_2$  adása, mind a szimulált I/R kezelés a PKB/Akt mérsékelte, nem szignifikáns csökkenését okozta. Egyedül a  $H_2O_2$  kezeléssel együtt alkalmazott GST gátlás eredményezte a PKB/Akt foszforilációjának szignifikáns csökkenését.



**4. ábra:** c-Jun N-terminál kináz (JNK) foszforilációja. # $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz hasonlítva. \*\* $p < 0,01$  a jelölt csoportokat egymáshoz hasonlítva. Etakrinsav (EA); Iszkémia/reperfúzió (I/R); Átlagos fluoreszcens intenzitás (MFI)

### 3.5. KONKLÚZIÓ

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a GST farmakológiai gátlása erőteljesen megnöveli az oxidatív stressz indukálta apoptózis mértékét kardiomiocitákban. Ugyanakkor a GST gátlás a MAP-kinázok fokozott aktivációját okozta szimulált iszkémia-reperfúziót, illetve oxidatív stresszt követően.

Kimutattuk, hogy a GST a MAP-kináz jelátviteli utak szabályozásában fontos szerepet játszik. Irodalmi adatok szerint a GST fehérje-fehérje interakción keresztül endogén inhibitora a c-Jun N-terminális kináznak és ezáltal befolyásolja a stresszre adott sejtes választ és az apoptózist. A JNK szerepet játszik az apoptotikus jelátvitelben és citotoxicitást közvetít I/R és oxidatív, nitrozatív stresszel járó különböző állapotokban. Stresszmentes állapotokban, a sejtben az alacsony JNK-aktivitást a GST és a JNK által alkotott proteinkomplex tartja fenn. Oxidatív, vagy nitrozatív stressz esetén a GST és a JNK disszociál így aktiválódik a JNK, a GST pedig oligomerizáción megy keresztül. A szabaddá vált JNK, foszforilálódik, ezáltal visszanyeri aktivitását, és tovább foszforilálja a c-Jun fehérjét. Hasonló folyamat játszódik le a c-Jun-nal, ami a JNK hatását közvetíti. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a GST farmakológiai gátlása már önmagában fokozza a JNK aktivitását. Ez magyarázható a JNK GST-vel alkotott fehérje komplex kötés megszüntetésével és az S-glutathioniláció gátlásával. Másrészt a GST hatásos gátlása oxidatív károsodást okozhat, a JNK foszforilációjának eredményeként azáltal, hogy stresszmentes állapotban meggátolja a sejtben rendszeresen, kis mennyiségben termelődő oxidánsok és toxikus anyagok eliminációját.

A p38 MAPK-on keresztüli jelátviteli folyamat oxidatív stressz során aktiválódik és befolyásolja a sejt-károsodás mértékét, a stressz válasz közvetítését. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az oxidatív károsodás és szimulált I/R, a p38 aktivitás észrevehető emelkedését okozza szívizomsejtekben, amely tovább növelhető a GST gátlásával.

Eredményeink szerint az ERK/p42-p44 aktiválódott GST-gátlás során, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adása esetén és reperfúzió alatt. A foszforilált ERK/p42-p44 szintje a szimulált I/R-nek kitett, GST gátolt sejtek esetén meghaladta a foszfo-ERK/p42-p44 szintjét szemben a csak szimulált I/R-rel kezelt sejtekhez képest. Ezek az eredmények az ERK/p42-p44 és a GST közti összefüggést mutatják. Míg az etakrinsav nem befolyásolta a szimulált I/R apoptózist fokozó hatását,

szignifikánsan nőtt a JNK, p38 és az ERK/p42-p44 foszforilációja. Mivel az EA emelte a nekrotikus sejtek számát és csökkentette az élő sejt számot mindez arra utal, hogy az etakrinsav jelenlétében szimulált I/R hatására fokozódik a nekrotikus elhalás mértéke.

Kimutatható kapcsolat áll fenn a GST és a PKB/Akt között is. A GST-gátlás hatása a PKB/Akt közvetítette sejtes válaszban nem teljesen tisztázott. Az PKB/Akt-aktivitás szignifikánsan csökkent azokban a csoportokban, amelyek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és GST-gátló EA-kezelésben is részesültek, a kontrollértékekhez képest. Az EA-val kezelt sejtek esetén a legátolt antioxidáns, antitoxikus védelem magyarázhatja az általunk kapott eredményeket.

Mindent összevetve, jelen vizsgálataink azt mutatják, hogy a GST gátlása etakrinsavval, súlyosbítja az oxidatív károsodást, és bár a szimulált I/R következtében kialakuló apoptózis mértékét nem fokozza, a nekrotikus sejtpusztulás mértékét tovább növeli. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-re és szimulált I/R-re a JNK, p38 és ERK/p42-p44 MAPK jelátviteli utak aktiválódtak, amelyet azután az EA szignifikánsan tovább erősített. Eredményeink rámutatnak a GST meghatározó szerepére az oxidatív stressz mértékének kialakításában, és a GST gátlás további vizsgálatának fontosságára *in vivo* állatmodellben is.

## **4. SZELEKTÍV MAPK INHIBITOROK HATÁSA A SZÍVIZOMSEJTEK APOPTÓZISÁRA GST GÁTLÁST KÖVETŐ OXIDATIVE STRESS ÁLLAPOTOKBAN**

### **4.1. BEVEZETÉS**

A GST mint antioxidáns enzim, fontos szerepet játszik a MAPK jelátviteli utak szabályozásában. A GST feladata, hogy komplexben tartsa a MAPK-okat, megakadályozva azok kötődését célmolekuláikhoz. Számos tanulmány támasztja alá, hogy a MAPK-ok fontos szabályozói az apoptózisnak, a miokardiális iszkémia/reperfúzióra adott válaszban.

Három fő MAPK, nevezetesen a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminális kinase (JNK), a p38 és az extracelluláris szignál-szabályozott kinase (ERK/p42-44) aktiválódnak válaszul számos ingerre, mint például növekedési faktorok, G protein-kötött receptorok, környezeti stresszek, ezáltal játsszva kiemelt szerepet a különböző szignálok közvetítésében a sejtfelszíni receptoroktól a sejtmagig. A JNK és p38 által szabályozott utak az apoptózisban vesznek részt, míg az ERK/p42-44 aktivációja véd az apoptotikus sejthalállal szemben.

### **4.2. CÉLKITŰZÉS**

Kísérleteink fő célja, hogy meghatározzuk a szelektív MAP kináz gátlók (JNK, p38, ERK) hatását a sejttúlélésre és az apoptózisra, szívizom sejtenyészeten, az etakrinsavval létrehozott GST gátlás során, pro- és antiapoptotikus jelátviteli utakat befolyásoló inhibitorok alkalmazásával. Választ kívántunk kapni arra, hogy a MAPK jelátviteli utak befolyásolása milyen szerepet játszik az oxidatív stresszre adott sejtes válaszban.

### **4.3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **4.3.1. MAPK inhibitors**

JNK inhibitor:	SP600125	Sigma-Aldrich (S5567)
p38 inhibitor:	SB239063	Sigma-Aldrich (S0569)
ERK/p42-44 inhibitor:	U0126	Sigma-Aldrich (U120)

### 4.3.2. Kísérleti protokoll

Vizsgálatainkat 2-4 napos újszülött Wistar patkányokból izolált primer kamrai szívizomsejteken végeztük, melyet az alkalmazott kezelések szerint 6 csoportra osztottunk. A nem kezelt sejteket a kísérlet teljes ideje alatt komplett szérummentes médiumban (CSFM) tartottuk (I. csop.). A többi csoportban a sejteket, a GST enzim gátlására, 150  $\mu$ M etakrinsavval (II. csoport) kezeltük, az oxidatív stressz indukálására 1 mM hydrogenperoxiddal ( $H_2O_2$ ) (III. csoport),  $H_2O_2$  és etakrinsav kombinációjával (IV. csoport), az iszkémiás/reperfúziós károsodások szimulálására iszkémiás puffer (V. csoport), valamint iszkémiás puffer és etakrinsav kombinációjával (VI. csoport). Ezen kívül minden csoportot külön kezeltünk JNK, p38 vagy ERK inhibitorral is. (5. ábra)

Kísérleti csoportok	Kezelés nélkül	JNK inhibitor	p38 inhibitor	ERK/p42-44 inhibitor
<b>I. Kontroll</b> (Kezeletlen sejtek, CSFM-ban inkubálva)	+			
		+		
			+	
				+
<b>II. EA</b> (Sejtek 150 $\mu$ M Etakrinsavval kezelve)	+			
		+		
			+	
				+
<b>III. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> (Sejtek 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -dal kezelve)	+			
		+		
			+	
				+
<b>IV. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EA</b> (Oxidative stress + GST gátlás – dupla stressz)	+			
		+		
			+	
				+
<b>V. I/R</b> (1,5 h iszkémia majd 2,5 h reperfúzió)	+			
		+		
			+	
				+
<b>VI. I/R+EA</b> (Szimulált I/R + GST gátlás – double stress)	+			
		+		
			+	
				+

**5. ábra:** Kísérleti csoportjaink a MAPK inhibitorok használata során.

### 4.3.3. Az apoptózis mértékének meghatározása

A szívizomsejtek életképességét kolorimetriás MTT próbával mértük, az apoptózis arányát annexin V/propidium jodid kettős festést követő flow citometriás méréssel határoztuk meg.

### 4.3.4. Statisztika

Az összes adatot az  $\bar{x} \pm \text{átlag standard hibájaként (S.E.M)}$  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.

## 4.4. EREDMÉNYEK

### 4.4.1. MTT assay eredmények

A kezelés mentes csoportban az élő sejtek arányát 100 %-nak vettük. A JNK, p38, illetve ERK/p42-44 gátló kezelés nem okozott szignifikáns változást a stresszmentes kontroll csoportokban az inhibitorral nem kezelt kontroll csoporthoz képest. A GST gátló EA, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-os ill. a I/R-ös kezelés már önmagában szignifikánsan csökkentette az élő sejtek százalékos arányát a csak MAPK gátlószerezrel kezelt kontroll csoporthoz képest. Csak a p38 MAPK gátló kezelés tudta szignifikánsan fokozni a sejtek életképességét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al kezelt csoportban. Az EA adása szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-os vagy sI/R-ös kezelés esetén az illető csoportnak megfelelő MAPK gátolt kontroll csoporthoz képest, és a MAPK gátlószerek egyike sem volt képes szignifikánsan megemelni az élő sejtek százalékos arányát.

### 4.4.2. Az apoptózis mértéke

A különböző MAPK inhibitorokkal kezelt kontroll csoportoknál nem volt szignifikáns eltérés a nem kezelt kontroll csoporthoz képest. A GST gátló EA, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-os ill. a I/R-ös kezelés már önmagában szignifikánsan csökkentette a sejt túlélést és fokozta az apoptózis mértékét a MAPK gátlószerez nélküli csoportokban. A proapoptotikus JNK és p38 gátlása esetén szignifikánsan növekedett a sejtéletképesség és csökkent az apoptózis mértéke az EA-al, ill. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al kezelt csoportokban, az illető MAPK inhibitorral nem kezelt csoporthoz képest. Más részről ezekben a csoportokban az antiapoptotikus ERK/p42-44 gátlása szignifikánsan csökkentette az élő sejtek százalékos arányát, és növelte az apoptotikus sejtek mennyiségét. A szimulált I/R-val kezelt csoportban csak a p38 MAPK gátló volt képes szignifikánsan emelni az élő sejtek százalékos arányát, és gyengíteni az apoptózis mértékét. Dupla stressz esetén (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EA vagy sI/R+EA) szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az apoptotikus sejtek arányában az élő sejtek alacsonyabb számával, a nem kezelt vagy csak oxidatív stressznek ill. szimulált I/R-nak kitett csoportokhoz képest. Ezekben az esetekben a JNK és p38 gátló kezelés emelte az élő sejtek arányát és csökkentette az apoptózis mértékét, de nem szignifikánsan. Ha az antiapoptotikus ERK/p42-44 MAPK-t gátoltuk, dupla stressz esetén, az élő sejtek aránya tovább csökkent, és az apoptotikus sejtek mennyisége tovább nőtt.

## 4.5. KONKLÚZIÓ

Annak vizsgálatára, hogy meghatározzuk a JNK, a p38 és az ERK/p42-44 jelentőségét és lehetséges kapcsolatát a GST-vel oxidatív stressz állapotokban, három specifikus gátlószert (JNK gátló SP600125-öt, p38 gátló SB239063-at és ERK/p42-44 gátló U0126-ot) használtunk egyenként a különböző csoportokban.

Szívizom-sejttenyészetben a reoxygenizáció alatti, és in vivo szívekben a reperfüzió alatti oxidatív stressz által előidézett apoptotikus sejthalál kapcsolatban áll a JNK és p38 MAPK megnövekedett expressziójával. Kimutattuk, hogy a proapoptotikus JNK és p38 MAPK farmakológiai gátlása szignifikánsan fokozta a sejt életképességet és csökkentette az apoptózis mértékét a GST gátolt, illetve oxidatív stressznek kitett csoportokban a JNK illetve p38 gátlószerezrel nem kezelt csoportokhoz képest. Továbbá a dupla stressz esetén (GST gátlás együtt oxidatív stresszel, vagy I/R-val) a JNK és p38 inhibitor ezen védő hatása elvész. Eredményeink a JNK, illetve a p38 és GST közötti kapcsolatot támasztják alá.

Eredményeink szerint az antiapoptotikus ERK/p42-44 gátlása szignifikánsan csökkentette a sejt életképességet, és növelte az apoptózis az ERK/p42-44 gátlószerezrel nem kezelt csoportokhoz képest. Azon csoportjainkban ahol csak GST gátlást végeztünk, vagy ahol oxidatív stresszt indukáltunk (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), illetve ahol szimulált I/R-nak tettük ki a sejteket, az

ERK/p42-44 gátlószert használatát követően, az élő sejtek aránya a GST gátolt csoportban volt a legmagasabb. Ezen eredmények alátámasztják a feltételezett kapcsolatot az ERK/p42-44 és a GST között. Dupla stressz esetén (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EA vagy sI/R+EA) szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az apoptotikus sejtek számában, alacsonyabb élő sejtszámmal, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy sI/R-val kezelt csoportokhoz képest szelektív ERK/p42-44 gátlást követően.

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a proapoptotikus JNK, és p38 farmakológiai gátlása szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz indukálta apoptózist, míg az antiapoptotikus ERK/p42-44 gátlása jelentősen csökkentette a kardiomiociták életképességét. Ezen hatása az említett MAPK gátlóknak nem volt megfigyelhető dupla stressz (oxidatív stressz + GST gátlás) esetén.

## **5. A GST SZEREPE AZ ISZKÉMIÁS POSZTKONDITIONÁLÁS FOLYAMATÁBAN**

### **5.1. BEVEZETÉS**

Bármely szervben az oxidatív stressz apoptotikus, nekrotikus elváltozásokhoz vezethet a sejtekben iszkémia/reperfúziós károsodást követően. Az oxigén szabadgyökök erősen reaktív molekulák, külső elektronhéjukon páratlan elektronnal, az iszkémia/reperfúziós károsodások kiváltásában meghatározó szerepet játszanak. Ekkor ugyanis ezen nagymértékben felszaporodott reaktív molekulák közömbösítéséhez az endogén antioxidáns rendszer kapacitása elégtelenné válik és kialakul az oxidatív stressz állapota.

Számos klinikai beavatkozásnál (kardiológiai intervenció, általános sebészet, érsebészet, transzplantáció) a beteg szempontjából sikeres gyógyulást az akutan fellépő reperfúziós károsodások akadályozzák meg, szövet- és sejtpusztulást okozva.

A szívsebészeti és az intervenciók kardiológiai beavatkozások széleskörű elterjedésével, a legszélesebben kutatott területté a kardioprotekció vált. Több mint két évtizede az experimentális kardiológia kiemelten kutatott területe a reperfúzióval szemben az endogén adaptáció kiváltásának lehetőségei, kezdetben az ún. prekondicionálás (Murray 1986), majd a Vinten-Johansen és mtsai által 2003-ban leírt iszkémiás posztkondicionálás. Ez a koronária artéria okklúzióját követő rövid, ismétlődő reperfúziós és reokklúziós ciklusainak sorozata, melyet közvetlenül a reperfúzió elején szükséges alkalmazni. A kialakuló védelmi mechanizmus hátterében mechanikai és molekuláris jelátviteli mechanizmusok egyaránt kimutathatók.

### **5.2. CÉLKITŰZÉS**

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a GST farmakológiai gátlása hogyan befolyásolja az iszkémiás posztkondicionálás jótékony, védő hatását, meghatározva a szívizomsejtek viabilitását és az apoptózis mértékét, továbbá az iszkémiás posztkondicionálásban meghatározó szerepet játszó pro- és antiapoptotikus MAPK jelátviteli utak (JNK, p38, ERK/p42-44 és GSK-3 $\beta$  protein kináz) aktivitásának megváltozását.

### **5.3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

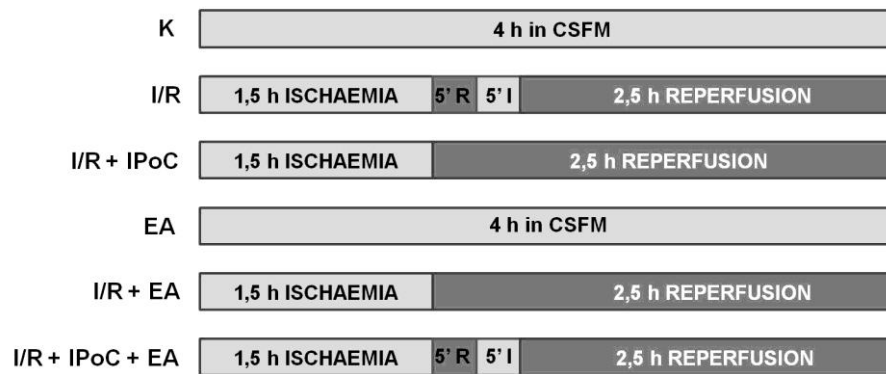
#### **5.3.1. Kísérleti protokoll**

Vizsgálatainkat újszülött patkányokból izolált primer szívizom sejtenyészetben végeztük, melyeket az alkalmazott kezelések alapján 6 csoportba osztottunk. A nem kezelt sejtek

kontrollként szolgáltak (I). A többi csoportban a sejteket, szimulált I/R-val (sI/R) (II), sI/R és IPoC-al (III), EA-val (IV), sI/R és EA-val (V), valamint sI/R, IPoC és EA kombinációjával (VI) kezeltük. A sejtek életképességét MTT próbával, az apoptotikus sejtek mennyiségét annexin V-FITC/propidium jodid kettős festést követő flow citometriás méréssel határoztuk meg. A JNK, p38, ERK/p42-p44 MAPK-ok és GSK-3 $\beta$  protein kináz aktivitásának változását szintén flow citometriával vizsgáltuk.

### 5.3.2. A szívizom iszkémiás poszt kondicionálása

A szívizomsejteket 1,5 órán keresztül iszkémiás pufferrel kezeltük melyet 5 perc reperfúzió majd 5 perc iszkémiás inzultus követett a hosszú 2,5 órás reperfúzió elején. Amíg a szívizomsejteket iszkémiás pufferrel kezeltük, a kontroll sejteket komplett szérumentes médiumban (CSFM) tartottuk csak úgy mint a reperfúziós periódus alatt.



6. ábra: Kísérleti protokoll az iszkémiás poszt kondicionálás során.

## 5.4. EREDMÉNYEK

### 5.4.1. MTT assay eredmények

Mind az EA, mind a szimulált I/R már önmagában szignifikáns csökkenést eredményezett az élő sejtek számában. A sejthalál mértéke szignifikánsan tovább fokozódott, ha szimulált I/R mellett EA-val is kezeltük a sejteket. Az iszkémiás poszt kondicionálás szignifikánsan emelte az élő sejtek százalékos arányát, de ez a változás nem volt megfigyelhető ha GST gátló etakrinsavval is kezeltük a szimulált I/R-nak kitett sejteket.

### 5.4.2. Az apoptózis mértéke

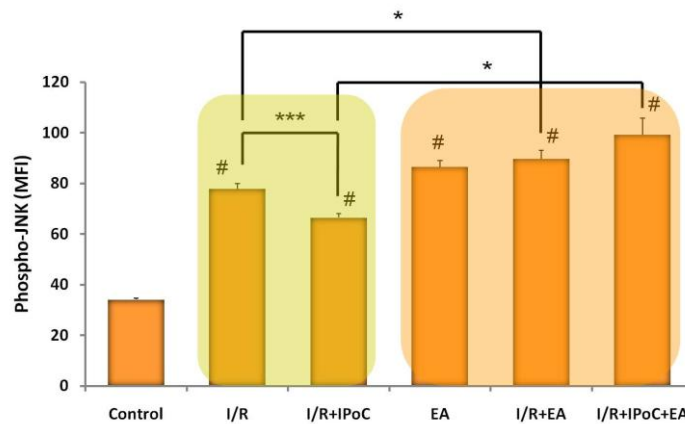
Az élő sejtek aránya szignifikánsan csökkent, az apoptotikus sejtek mennyisége pedig szignifikánsan megemelkedett EA kezelés, illetve szimulált I/R hatására. Ha a szimulált I/R-val kezelt csoporthoz EA-at adtunk az apoptotikus sejtek mennyisége tovább növekedett, míg az élő sejtek aránya tovább csökkent. Az iszkémiás poszt kondicionálás szignifikáns emelkedést eredményezett az élő sejtek százalékos arányában és szignifikáns csökkenést az apoptotikus sejtek arányában, míg hasonló védő hatást nem sikerült kimutatni, ha GST gátló EA-at adtunk a médiumhoz a szimulált I/R-val kezelt és IPoC-on átesett csoportban.

### 5.4.3. Mitogén aktivált protein kinázok foszforilációja

A GST gátlás, valamint a szimulált I/R már önmagában szignifikánsan megemelte a proapoptotikus JNK és p38 aktivációját. Ha EA-at is adtunk a szimulált I/R-val kezelt



sejtekhez a JNK és a p38 aktivációja is tovább fokozódott. Az iszkémiás poszt kondicionálás (IPoC) szignifikánsan csökkentette a JNK és a p38 foszforilációját a sI/R-n átesett csoportban, amennyiben a GST-t is gátoljuk ez a kedvező változás nem jött létre. (7. ábra)



**7. ábra:** c-Jun N-terminál kináz (JNK) foszforilációja.  $p^{\#} < 0,05$  a kontroll csoporthoz hasonlítva.  $p^{***} < 0,001$  a jelölt csoportokat egymáshoz hasonlítva. Etakrinsav (EA); Iszkémia/reperfúzió (I/R); – Iszkémiás poszt kondicionálás (IPoC); Átlagos fluorescens intenzitás (MFI)

Az ERK/p42-44 foszforilációja szignifikánsan megemelkedett sI/R kezelés illetve GST gátlás következtében. Ha a szívizomsejteket sI/R-val és EA-val is kezeltük további emelkedést találtunk a foszforilált ERK/p42-44 szintjében a csak EA-val kezelt csoporthoz képest. Az IPoC szignifikánsan fokozta az ERK/p42-44 aktivációját sI/R-t követően, azonban dupla stressz esetén (sI/R+EA) IPoC-t alkalmazva hasonló eltérést nem találtunk. A foszfo-ERK/p42-44 szintje szignifikánsan magasabb volt a poszt kondicionált csoportok közül a GST gátló kezelés esetén.

A GSK-3 $\beta$  protein kináz foszforiláció által inaktíválódik és ezáltal megakadályozza a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusok (mPTP) kinyílását, ami egy védelmi mechanizmust jelent az apoptotikus sejthalállal szemben. A GSK-3 $\beta$  foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb volt a sI/R-nak kitett csoportban a kontroll csoporthoz képest. IPoC esetén szignifikánsan megemelkedett GSK-3 $\beta$  foszforilációt tapasztaltunk a sI/R-val kezelt csoporthoz képest. A foszfo-GSK-3 $\beta$  foszforilációs szintje tovább csökkent dupla stressznek (sI/R+EA) kitett sejtek esetén. Dupla stressz esetén (sI/R+EA) alkalmazott IPoC-t követően nem találtunk szignifikáns emelkedést a foszfo-GSK-3 $\beta$  szintjében. A GSK-3 $\beta$  foszforilációja és ezáltal inaktívációja szignifikánsan alacsonyabb volt GST gátló EA adása esetén a poszt kondicionált csoportokat összehasonlítva.

## 5.5. KONKLÚZIÓ

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a GST enzim gátlása jelentősen gyengítette az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatását, megemelve az apoptózis mértékét szívizom-sejtenyészetben. A GST enzim gátlása a MAPK és GSK-3 $\beta$  protein kináz jelátviteli utak aktivációjának befolyásolása révén játszik szerepet az iszkémiás poszt kondicionálás folyamatában.

Kísérletünkben, a GST gátló EA adása szignifikánsan megemelte az apoptotikus sejtek számát, különösen, ha a sejteket szimulált I/R-val is kezeltük. Az IPoC szignifikánsan csökkentette az apoptózis mértékét a sI/R-s csoportban, míg hasonló védő hatást nem tudtunk



megfigyelni poszt kondicionálást követően, ha sI/R mellett EA-val is kezeltük a sejteket. A reaktív oxigén intermedierek megnövekedett mennyisége és a kedvezőtlen glutation státusz fokozhatja a behatás erősségét és magyarázhatja a megnövekedett apoptotikus sejt számot a szimulált I/R-val kezelt és GST gátolt csoportban, IPoC-t követően.

Kimutatták, hogy a GST, fehérje-fehérje kölcsönhatásokat alakít ki a mitogen aktivált protein (MAP) kináz út tagjaival. A MAP kinázokkal való direkt interakció révén, beleértve a c-Jun N-terminál kináz 1-et (JNK1), a GST lekötö a ligandot egy komplexben, megelőzve a kapcsolódást a további célmolekulákkal. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a GST enzim farmakológiai gátlása már önmagában fokozta a JNK aktivációját és megszüntette az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatását. Ezen eredményeink magyarázhatják a GST és a JNK közötti kapcsolatot és a GST-JNK protein komplex felbomlását.

A p38 MAPK fontos jelátviteli fehérje, amely lényeges szerepet játszik a stresszre adott sejt válaszban, beleértve az oxidatív stresszt, amit a reaktív oxigén szabadgyökök megnövekedett szintje eredményez. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a sI/R-s kezelés jelentős p38 aktivációhoz vezetett a szívizomsejtekben, ami tovább fokozódott EA adása esetén. Az iszkémiás poszt kondicionálás szignifikánsan csökkentette a p38 foszforilációját a sI/R-s csoportban, míg hasonló szignifikáns csökkenést nem tudtunk kimutatni ha EA-at is adunk a sejtekhez. Eszerint kapcsolat feltételezhető a GST és a p38 MAPK között, ami az IPoC hatásának megszűnéséhez vezet.

Eredményeink szerint az ERK/p42-44 aktivációja szignifikánsan megemelkedett GST gátlás következtében, ami a sejt ezen védelmi útjának aktiválódását feltételezi. Kísérleteinkben az antiapoptotikus foszfo- ERK/p42-44 szintje szignifikánsan magasabb volt IPoC-t követően, de GST gátló EA jelenlétében hasonló változást nem találtunk. Bár az ERK/p42-44 aktivációja megemelkedett GST gátlás, illetve IPoC következtében, dupla stressz esetén az foszfo-ERK/p42-44 szintjének hasonló emelkedése elmaradt, valószínűleg a megnövekedett stressz hatás miatt.

A glikogén szintáz kináz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) egy protein kináz, ami különböző sejt funkciók szabályozásában vesz részt, mint például a glikogén metabolizmus, gén expresszió, sejt túlélés, és ezen funkcióit a RISK jelátviteli utak fontos tagjaként látja el. Eredményeink szerint a foszfo-GSK-3 $\beta$  szintje szignifikánsan lecsökkent szimulált I/R-t követően, mutatva az I/R káros hatását, míg az irodalommal egyetértésben IPoC hatására a GSK-3 $\beta$  foszforilációja szignifikánsan megemelkedett. Dupla stressz esetén (sI/R+EA) szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a GSK-3 $\beta$  foszforilációjában, továbbá az IPoC nem volt képes szignifikánsan fokozni a GSK-3 $\beta$  inaktivációját. Ezen eredményeink feltételezik a kapcsolatot a GST és a GSK-3 $\beta$  protein kináz között.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A glutation a citoszólban lévő meghatározó kis molekulású tiol. Ha a sejteket megnövekedett szintű oxidatív stressz éri, az oxidált glutation (GSSG) felhalmozódik, és a GSH/GSSG arány lecsökken, ezért a GSH/GSSG arány meghatározása hasznos mutatója az oxidatív stressz mértékének. A glutation S-transzferáz (GST) katalizálja a redukált glutation konjugációját elektrofil vegyületekkel, ezáltal inaktíválja azokat és elősegíti kiürülésüket a szervezetből. Általában a GST által katalizált reakciók a méregtelenítésben vesznek részt és megvédik a makromolekulákat az oxidatív stressz és citotoxikus anyagok által okozott károsodásoktól.

**Kísérleteink első sorozatában** azt találtuk, hogy az EA, a sI/R és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelés már önmagában szignifikánsan csökkentette az élő sejtek mennyiségét és szignifikánsan emelte az

apoptotikus sejtek százalékos arányát. A GST gátlása EA-val szignifikánsan tovább csökkentette az élő sejtek arányát és szignifikánsan tovább emelte az apoptotikus sejtek százalékos arányát, oxidative stressznek ( $H_2O_2$ ), illetve sI/R-nak kitett csoportokban.

Az antioxidáns enzim, glutation S-transzferáz fontos szerepet játszik a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli utak módosításában, és ezen keresztül felügyeli a sejt proliferációt és az apoptotikus sejthalált. A GST beköti a kinázt egy komplexbe, megelőzve a citotoxikus ligandok kapcsolódását azok célmolekuláihoz. Ezáltal szabályozza a jelátviteli utakat, és az I/R-ra adott stressz választ. A GST $\pi$  volt az első izoenzim, amiről azt találták, hogy direkt protein-protein kölcsönhatás révén gátolja a JNK-t, ezáltal befolyásolva a stressz választ és az apoptózist.

Kísérleteinkben a szívizomsejtekhez adott etakrinsav hatására a JNK aktivációja jelentősen megemelkedett, és az oxidative stressznek kitett vagy sI/R-val kezelt csoportokhoz képest szignifikánsan erősítette a JNK aktivációját. A GST gátlás szignifikánsan megemelkedett p38 aktivációhoz vezetett a kontroll csoporthoz képest. Mind a  $H_2O_2$  mind a sI/R kezelés, a p38 MAPK aktivációjának szignifikáns emelkedéséhez vezetett. A  $H_2O_2$  vagy sI/R kezelés alatti EA adása további szignifikáns emelkedést okozott a foszforilált p38 szintjében. Az ERK/p42-44 foszforilációja szignifikánsan megemelkedett GST gátlás esetén a  $H_2O_2$ -al kezelt, illetve szimulált I/R-nak kitett csoportokban. Az Akt foszforilációja szignifikánsan csökkent a  $H_2O_2$ -dal kezelt csoportban, ha a GST enzimet gátoltuk.

Három fő MAPK, nevezetesen a JNK, p38 és az ERK/p42-44 játszik kulcsszerepet a jelátvitelben. Habár ellentmondások vannak a MAPK-ok stresszt követő sejthalál vagy sejttúlélésben betöltött szerepét illetően, megállapítható, hogy számos sejt típusban a JNK és a p38 MAPK proapoptotikus, míg az ERK/p42-44 a reperfüziót követő sejttúlélésben játszik szerepet.

**Kísérleteink második sorozatában** azt találtuk, hogy a proapoptotikus JNK és p38 farmakológiai gátlása szignifikánsan csökkentette az apoptózist, míg az antiapoptotikus ERK/p42-44 gátlása szignifikánsan növelte az apoptotikus sejtek számát a GST gátlás esetén, csak úgy mint az oxidatív stresszel ( $H_2O_2$ ) vagy szimulált I/R-val kezelt csoportokban. Így kísérleteinkben az apoptotikus jelátvitel valószínűleg a JNK, p38 és ERK/p42-44 MAPK utakon keresztül valósul meg. A proapoptotikus JNK és p38 MAPK-ok gátlásának védő hatása dupla stressz esetén (GST gátlás oxidatív stresszel vagy szimulált I/R-val) elvész, tehát úgy tűnik, hogy a GST aktivitása szükséges a sejttúléléshez szívizom-sejtenyészeten, különböző oxidatív stressz állapotokban.

A szívizom iszkémia-reperfüzióval szemben védelem egyik ígéretes módszerét Vinten-Johansen és mtsai írták le és nevezték el iszkémiás posztkondicionálásnak (IPOC). Ez a coronaria artéria rövid, ciklikusan ismétlődő reperfüziós és reokklúziós sorozatából áll, közvetlenül a keringés helyreállítás kezdetén, ami hatásos lehet a reperfüziós károsodásokkal szemben. Kimutatták, hogy a posztkondicionálással kifejlesztett védelem kialakulásáért felelős mechanizmus a reperfüzió első perceiben játszódik le.

**Kísérleteink harmadik sorozatában** az iszkémiás posztkondicionálás sejtenyészeten kimutatott védő hatását a GST gátlás szignifikánsan csökkentette, ami növekvő mértékű apoptózist és csökkenő mértékű kardiomiocita sejttúlélést eredményezett. Az iszkémiás posztkondicionált csoportokban a GST gátlást követően sem a proapoptotikus JNK sem a p38 aktivációját nem lehetett kivédeni. Hasonló kísérleti körülmények között az IPOC szignifikánsan fokozta az antiapoptotikus ERK/p42-44, illetve a GSK-3 $\beta$  aktivációját a sI/R-ós csoportban, azonban dupla stressz esetén az IPOC védő hatását nem tudtuk kimutatni.

Összefoglalóan jelen tanulmány azt mutatja, hogy a GST gátlása etakrinsavval fokozta az apoptózist, aláhúzva az enzim kulcsfontosságú szerepét a szívizomsejtek túlélésében. A GST gátlás megszüntette az iszkémiás posztkondicionálás védő hatását, ami valószínűleg a JNK, p38, ERK/p42-44 MAPK és a GSK-3 $\beta$  protein kináz jelátviteli utakon keresztül valósul meg,

mivel ezen kinázok aktivitása ennek megfelelően változik az IPoC során. Eredményeink alátámasztják a GST kiemelkedően fontos szerepét az oxidatív stressz elleni védelemben, valószínűleg nem csak kísérleti körülmények között, hanem különböző patológiai állapotokban is.

## **7. ÚJ EREDMÉNYEK**

- 1) A GST farmakológiai gátlása, etakrinsavval, már önmagában jelentős oxidatív stresszt okozott, csökkentve a sejtek életképességét és fokozva az apoptotikus sejthalál mértékét. A szimulált iszkémia/reperfúzió és a GST gátlás együttesen tovább súlyosbította az oxidatív stressz következményeit, növelve az apoptotikus sejtek számát. Eredményeink igazolták a GST kulcsfontosságú szerepét a szívizomsejtek túlélésében.
- 2) Szelektív MAPK gátlószereket alkalmazva igazoltuk, hogy a GST kiemelkedő szerepet játszik a pro- és antiapoptotikus MAPK jelátviteli utak szabályozásában az oxidatív stressz indukálta apoptózis folyamatában szívizom-sejttenyészetben.
- 3) Elsőként írtuk le, hogy habár az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatása szimulált iszkémia-reperfúziót követően kimutatható, ezen védő hatást a GST enzim gátlása szignifikánsan csökkentette, növelve az apoptotikus szívizomsejtek számát. Eredményeink szerint az iszkémiás poszt kondicionálás védő hatásának csökkenése a GST gátlás MAPK jelátviteli utakra kifejtett hatásával magyarázható, mely a klinikai alkalmazhatóság szempontjából további vizsgálatok szükségességét veti fel.

## 8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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 másik témavezetőmnek, **Dr. Gasz Baláznak** rengeteg támogatásáért, vezetéséért és tanításáért munkám során.

Őszintén köszönöm barátaimnak, régi és új munkatársaimnak a Sebészeti Oktató és Kutató Intézetben, nevezetesen, **Kovács Viktóriának, Dr. Lantos Jánosnak, Dr. Takács Ildikónak, Dr. Jávor Szaniszlónak, Dr. Horváth Szabolcsnak, Dr. Ferencz Sándornak, Dr. Borsiczky Baláznak, Dr. Jancsó Gábornak, Dr. Kürthy Máriának, Tóthné Fajtik Csillának, Karádiné Sztárai Máriának, Pintéerné Henrich Évának, Bakainé Matus Ilonának, Kathleen De Roo-nak, Búza Nikolettának, Tamás Zoltánnak** és a Központi Állatkísérletes Laboratórium valamennyi munkatársának, nélkülözhetetlen segítségükért, munkámhoz biztosított kellemes és baráti környezetért.

Köszönet **Dr. Marczin Nándornak** kinek tudása és segítése nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönet **Dr. Szokodi Istvánnak, Dr. Cserepes Barbarának, Dr. Ghosh Subhamay-nak** és **Dr. Jávor-Hocsák Enikőnek** irányításukért, ötleteikért és rengeteg segítségükért.

Köszönet **Professzor Wéber Györgynek, Professzor Horváth Örs Péternek** és **Professzor Vereczkei Andrásnak** végtelen türelmükért és támogatásukért.

Külön hálával tartozom **Wenczler Máriának**, 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.