DOI:10.14753/SE.2012.1740

Endothelin gén expresszió vizsgálata endothel- és szívizomsejteken

Doktori értekezés

Dr. Keltai Katalin

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Program: Szív- és érrendszeri betegségek élettana és klinikuma

Témavezetők: Dr. Merkely Béla egyetemi tanár, az MTA doktora és
Dr. Cervenak László tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Tóvári József tudományos osztályvezető, Ph.D.
Dr. Kempler Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Somogyi Anikó egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lőrincz István tanszékvezető egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Mózes Miklós egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest

2012

DOI:10.14753/SE.2012.1740

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
1. BEVEZETÉS 5
1.1. Az endothelinek 5
1.1.1. Az endothelin-1 szintézise 6
1.1.2. Az endothelin receptorok 9
1.1.3. Az endothelinek élettani és sejtélettani hatása 10
1.1.4. Az endothelin-1 kardiovaszkuláris hatásai 13
1.2. Cardiomyocyták 14
1.2.1. Ischaemia/reperfúzió 16
1.3. Endothelium 17
1.3.1. Endothel diszfunkció 18
1.3.2. Az endothel diszfunkció vizsgálata 19
1.4. Anthracyclin toxicitás 20
1.4.1. Endothelin-1 és anthracyclin kezelés 22
2. CÉLKITŰZÉSEK 24
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 26
3.1. Kutyaszív ischaemia/reperfúziós modell 26
3.1.1. Kísérleti felépítés 26
3.1.2. Biokémiai vizsgálatok 27
3.2. Endothelsejtkultúrán végzett kísérletek 28
3.2.1. HUVEC izolálás és sejtkultúra 28
3.2.2. Citotoxicitás vizsgálatok 29
3.2.3. SuperArray vizsgálat 29
3.2.4. Real-time qPCR vizsgálat 30
3.2.5. Microarray vizsgálatok 31
3.2.5.1.Agilent GE microarray 31
3.2.5.2.Affymetrix DNS chip 32
3.2.6. Endothelin-1 ELISA 34
3.3. Statisztikai módszerek 34
4. EREDMÉNYEK 35
4.1. Kutyaszív ischaemia/reperfúzió modell 35

DOI:10.14753/SE.2012.1740

4.2. Endothelsejtkultúra 38
4.2.1. A doxorubicin toxicitása endothelsejteken 38
4.2.2. Doxorubicin hatása az endothelsejtek mRNS expressziós mintázatára 39
4.2.3. Endothelin-1 mRNS expresszió doxorubicinnal kezelt endothelsejteken 40
4.2.4. A doxorubicin kezelés hatása az endothelin-1 expresszióra fehérjeszinten 42
4.2.5. Doxorubicin kezelés hatása az endothelsejt genomjára - Microarray eredmények kiértékelése 43
5. MEGBESZÉLÉS 49
6. KÖVETKEZTETÉSEK 54
7. ÖSSZEFOGLALÁS 55
8. IRODALOMJEGYZÉK 57
9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE 68
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 74

DOI:10.14753/SE.2012.1740

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE
(alfabetikus sorrendben)

ACE	– angiotenzin konvertáló enzim
ANP	– atrial natriuretic peptide / pitvari nátriuretikus peptid
Chk-1	– checkpoint kináz-1
CNP	– C-type natriuretic peptide / C-típusú natriuretikus peptid
COX	– ciklooxigenáz
DXR	– doxorubicin
ECE	– endothelin convertising enzyme / endothelin konvertáló enzim
EGF	– epidermal growth factor / epidermális növekedési faktor
ELISA	– Enzyme-linked immunosorbent assay
ET	– endothelin
GM-CSF	– Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
HeLa	– humán méhnyakrák sejtvonal
HUVEC	– humán umbilikális véna endothelsejt
ICAM-1	– Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IL	– interleukin
LAD	– left anterior descendent / bal elülső leszálló koronáriaág
LD50	– félletális dózis
LDL	– low density lipoprotein / alacsony denzitású lipoprotein
MCP-1	– monocyte chemotactic protein-1 / monocita kemotaktikus fehérje-1
NEP	– neutrális endopeptidáz
NO	– nitrogén monoxid
NOS	– nitric oxide synthase / nitrogén monoxid szintetizáló enzim
NYHA	– New York Heart Association
PAI	– plazminogén aktivátor inhibitor
PDGF	– platelet-derived growth factor
PKC	– protein kinase C / protein kináz C
qPCR	– quantitatív PCR
ROS	– reactive oxygen species
RT-PCR	– real time polymerase chain reaction / valós idejű polimeráz láncreakció
SA	– Superarray
SAPK/JNK	– stressz-aktivált protein kináz/c-Jun-Nterminal kináz
SEM	– standard error
SEP	– szolubilis endopeptidáz
SOD	– superoxide dismutase
TGF	– transforming growth factor
TNF	– tumornecrosis faktor
VCAM-1	– vascular cell adhesion molecule 1

DOI:10.14753/SE.2012.1740

1. BEVEZETÉS

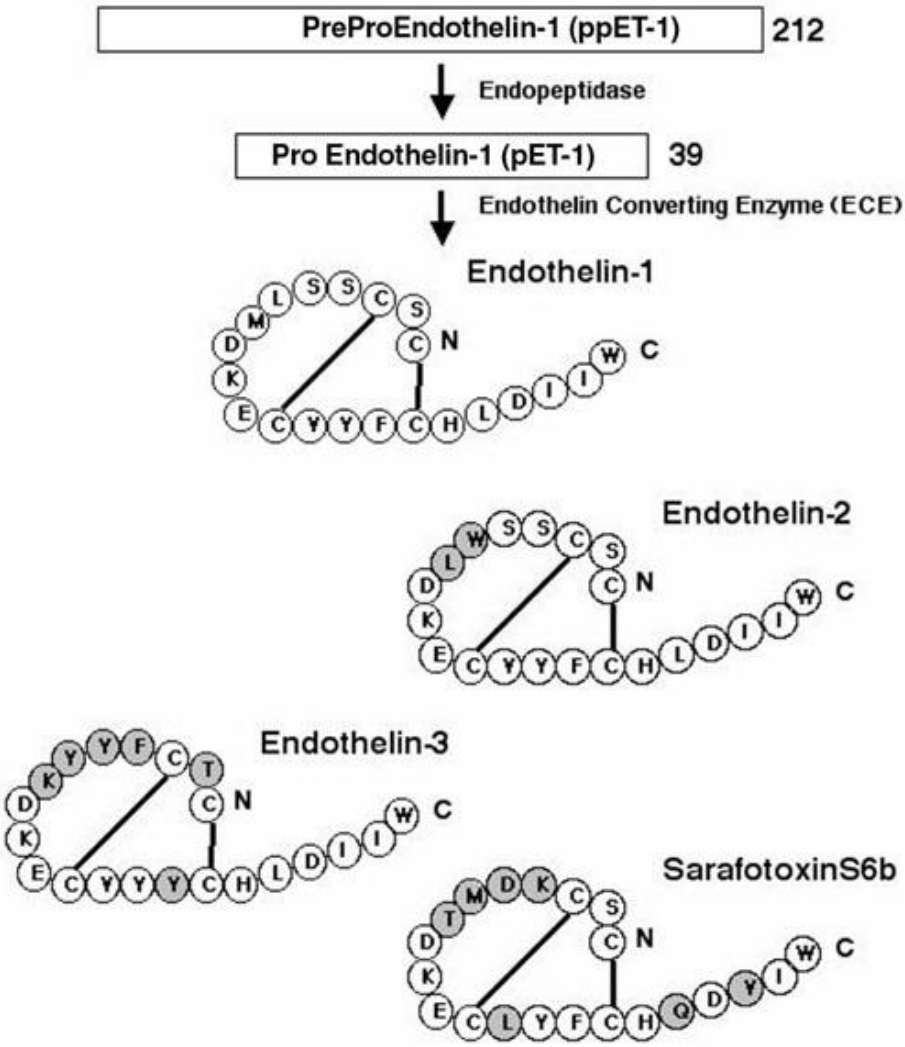
1.1 Az endothelinek

Yanagisawa és munkatársai 1988-ban írták le az endothelium által termelt vazokonstriktor peptidet, melyet endothelinnek neveztek el.[1] További kutatások hamarosan tisztázták, hogy nem egyetlen peptidről van szó, hanem egy fehérje családról, aminek eddigi ismereteink szerint három tagja van: az endothelin-1 (ET-1), az endothelin-2 (ET-2) és az endothelin-3 (ET-3).[2]

Az endothelinek fiziológiás és patológiás szerepe kiterjedt kutatások tárgya, de még nem minden részletében tisztázott. A szervezet számos szervében és szövetében képződnek; autokrin, parakrin és endokrin hatással rendelkeznek. Az endothelinek bioszintézisének legfontosabb helye a vaszkuláris endothelium. ET-1-et termelnek még a szív, a veseglomerulus mesangialis és epithel sejtjei, az agy, a gerincvelő és az aorta simaizomsejtjei is. A szív és az agy sejtjei szintetizálnak ET-2-t is, míg az ET-3 képzésében leginkább az endokrin rendszer, a gastrointestinalis rendszer és a központi idegrendszer vesz részt.[3, 4] A három - eddig izolált - endothelin közül bizonyítottan a legkifejezettebb kardiovaszkuláris hatással az ET-1 rendelkezik.

Az ET-1 egy 21 aminosavból álló peptid, két intramolekuláris diszulfid híddal. Az ET-2-t és az ET-3-t, bár szerkezetileg hasonlóak az ET-1-hez, külön gének kódolják.[5, 6] Ezen túlmenően mindhárom endothelin típus jelentős strukturális és funkcionális hasonlóságot mutat a sarafotoxin izopeptid családdal, amelyet az izraeli ásóvipera (*Atractaspis engaddensis)* kígyómérgéből izoláltak[2, 4] *(1. ábra)*.

DOI:10.14753/SE.2012.1740



1. ábra. Az endothelin izoformok és a sarafotoxin S6b szerkezete. [7]

1.1.1. Az endothelin-1 szintézise

A humán ET-1 génje a 6-os kromoszómán, az aktív fehérjerészt a második exon kódolja. Az ET-2 gén az 1-es, az ET-3 gén pedig a 20-as kromoszómán található. Az ET-1 gén promoter régiója tipikus CAAT és TATA szekvenciákat tartalmaz, valamint GATA-2 transzkripciós proteinkötő helyet, a proteinkináz-C aktiválta (PKC) *c-fos, c-jun* kötő AP-1 helyet és számos egyéb, transzkripciót szabályozó szekvenciát, melyek által különböző növekedési faktorok, vazoaktív peptidek képesek modulálni az ET képződését.[8] Az ET-1 gén átírását az angiotenzin II, a katekolaminok, a növekedési faktorok, az inzulin, a thrombin, az oxidált LDL vagy a hypoxia serkentik pl. PKC-n

keresztül, míg az atrialis natriuretikus peptid (ANP), az ET-3 és a prosztanoidok a peptid szintézisére gátlóan hatnak (cGMP-szint növelés következtében kialakuló intracelluláris Ca^{2+}-szint csökkenés által).[9, 10 11 12] Az ET-1 erős vazokonstriktorként hat a simaizomsejteken, míg az endothelsejtekben az NO termelődés fokozása révén a vazodilatációt segíti elő.[13]

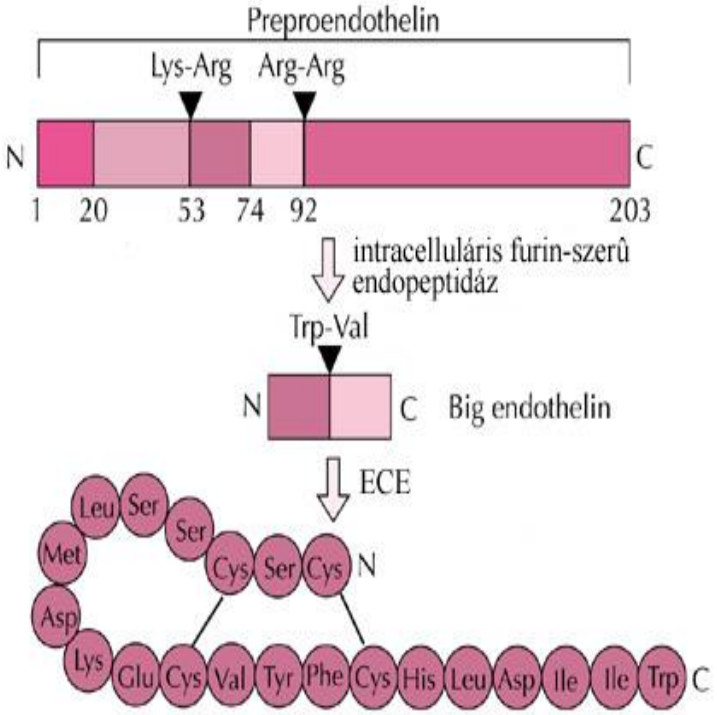
Különböző stimulusok, mint például az oxidatív stressz, a hypoxia, az ischaemia, a nyíróerők indukálják a peptid messenger-RNS (mRNS)-ének transzkripcióját, ezzel percek alatt szintetizálódik és szekretálódik az ET-1.

Az mRNS féléletideje 15-20 perc, a peptid féléletideje a plazmában 4-7 perc. Így az endothelsejtek gyors, azonnali hatást képesek közvetíteni. Az érett endothelin képzés létrejöhet intracellulárisan, pl. a Golgi apparátusban, valamint sejtmembrán szinten, pl. a simaizomsejtek felszínén, vagy az endothelsejtek felszínén, intravascularis szinten.
Az endothelin génből egy 209 aminosavból álló preproendothelin íródik át, melyről a szignálszekvencia lehasadásával proendothelin lesz. A proendothelinből intracellulárisan egy furin-szerű enzim hasítása által 38 aminosavas big-endothelin keletkezik. Ezt a molekulát hasítja egy metalloproteáz, az endothelin konvertáló enzim (ECE), és keletkezik az aktív endothelin *(2. ábra).* Az ECE cinkiont tartalmazó metalloproteáz enzim, mely a neutrális endopeptidáz család (NEP) tagja. Több izoformját írták le: ECE-1, ECE-2, melyeknek még külön legalább négy, illetve két alizoformjáról tudunk. Az ECE egyaránt elhelyezkedhet intracelluláris granulumokban, ahonnan szecernálódni képes, és a sejtfelszínen.
Az ECE-1 nagyon specifikus enzime az endothelin képződésnek, két transzmembrán glikoprotein dimerje van, melyek két diszulfid híddal kapcsolódnak egymáshoz. Az ECE-1a és ECE-1b izoformok azonos gén által kódoltak. A gén az 1-es kromoszómán helyezkedik el és 19 exont tartalmaz. Az ECE-1a promoter régió többek között nyíróerő reszponzív elemeket, az ECE-1b promotere glükokortikoid és akut-fázis fehérje kötő szekvenciákat is magába foglal. A két izoform expressziójának szabályozása egymástól eltér: az 1a izoform konstitutívan, alapszinten is expresszálódik, míg az 1b izoform expressziója különböző stimulusok válaszreakciójaként indukálódik. Lokalizáció szempontjából az 1a izoform az endothelsejtekre és a sejtmembrán felszínre jellemző, míg az 1b izoformot inkább a simaizomsejtek termelik, és a transz-Golgi-készülékekben

jelenik meg. Az ECE-2 egy másik gén terméke, körülbelül 50 %-os homológiát mutat az ECE-1-gyel. Jelenléte az agy szöveteire jellemző, egyéb szövetekben kisebb mértékben jelenik meg, mint az ECE-1.

A membránhoz kötött ECE kizárólagos szerepét megkérdőjelezi az a tény, hogy ECE-1 és ECE-2 hiányos (knock-out) egerekben csak 60 %-kal csökken a plazma ET-1 szint. A big-ET-1 hasításában más enzimek is részt vehetnek, mint például a KELL antigén, a szekretált egyéb neutrális endopeptidázok, az emberi hízósejt kimázok, az erek simaizom kimáza és a szolubilis endopeptidáz (SEP) is.[14]

A hízósejtekben a big ET-1-ből ECE-től függetlenül, egy szerin-proteáz enzim, a kimáz enzim hatására nem csak a 21 aminósavból álló ET-1 keletkezhet, hanem egy a közelmúltban leírt 31 aminósavas $ET\text{-}1_{(1\text{-}31)}$ is. Az enzim az angiotenzin-II termelődésében is szerepet játszik.[15] Az $ET\text{-}1_{(1\text{-}31)}$ ETAR receptoron keresztül fejti ki hatását, pl. vazokonstrikciót, simaizomproliferációt.[16] Klinikai jelentősége még nem ismert, szabályozó szerepet feltételeznek a peptidnek az adrenokortikális működésben is.[17]



2. ábra. Az endothelin-1 képződése és elsődleges peptid szerkezete[18]

Az ET-1 és ET-2 esetében a hidrolízis az N-terminális huszonegyedik triptofán és huszonkettedik valin között, az ET-3 esetében a huszonegyedik triptofán és huszonkettedik izoleucin között jön létre *(2. ábra).*[18] Az aktív endothelin képzés létrejöhet intracellulárisan, pl. a Golgi apparátusban, valamint sejtmembrán szinten, pl. a simaizomsejtek vagy az endothelsejtek felszínén. A keletkezett ET-1 több mint 75 %-a abluminálisan szecernálódik, ahol könnyen eléri a vaszkuláris media simaizomsejtjein található receptorait, tehát inkább tartható parakrin hatásúnak, mint endokrin hormonnak.[19-21]

Azt is megfigyelték, hogy a kismértékű nyíróerők ET-1 szintézis növekedést, míg a nagymértékű áramláskor keletkező nyíróerők NO szintézist indukálnak. Az endothelin szekréció összefügg a celluláris skeletalis elemekkel is, a csökkent F-aktin produkció csökkent ET-1 képzéssel jár.[19] Az endothelin géntranszkripciós sejtválasz integratív jellegű, ezáltal mindig az aktuális keringési státuszhoz alkalmazkodik.

1.1.2. Endothelin receptorok

Jelenleg két emlős ET receptort ismerünk. Az ET(A) és ET(B) receptorok 45-50 kDa nagyságú molekulák, 50 % körüli homológiát mutatnak egymással. A jól konzervált szekvenciák a transzmembrán szakaszok és az intracelluláris hélix hurkok. A receptorok különböző erősséggel kötik meg az endothelineket. Az ET(A) affinitásának sorrendje: ET-1 > ET-2 >> ET-3, az ET(B) receptorhoz viszont egyforma erősséggel kötődik az endothelin család minden tagja.[22-24]Az endothelinek nagy affinitással kötődnek (nM-os koncentráció tartományban) transzmembrán receptoraikhoz. Az ET receptor telítődés gyorsan eléri *steady-state* állapotát (10-20 perc alatt 37°C-on), de a receptorról való disszociálás nagyon lassú. A szinte irreverzibilis receptor kötődésnek tulajdonítható a hosszú tartamú simaizom-kontrakció.

A receptorok eloszlása szövet- és sejtspecifikus. Az ET(A) receptorok nagy számban vannak jelen az erek simaizomsejtjein, a szívizomsejteken, a szív fibroblasztjaiban, az endothelsejteken azonban nem találhatók meg. Döntően a vazokonstrikció kialakulásában játszik szerepet. Az ET(B) receptorok inkább az endothelsejteket dominálják, és innen továbbítják az endothelin hatás negatív visszacsatolását.

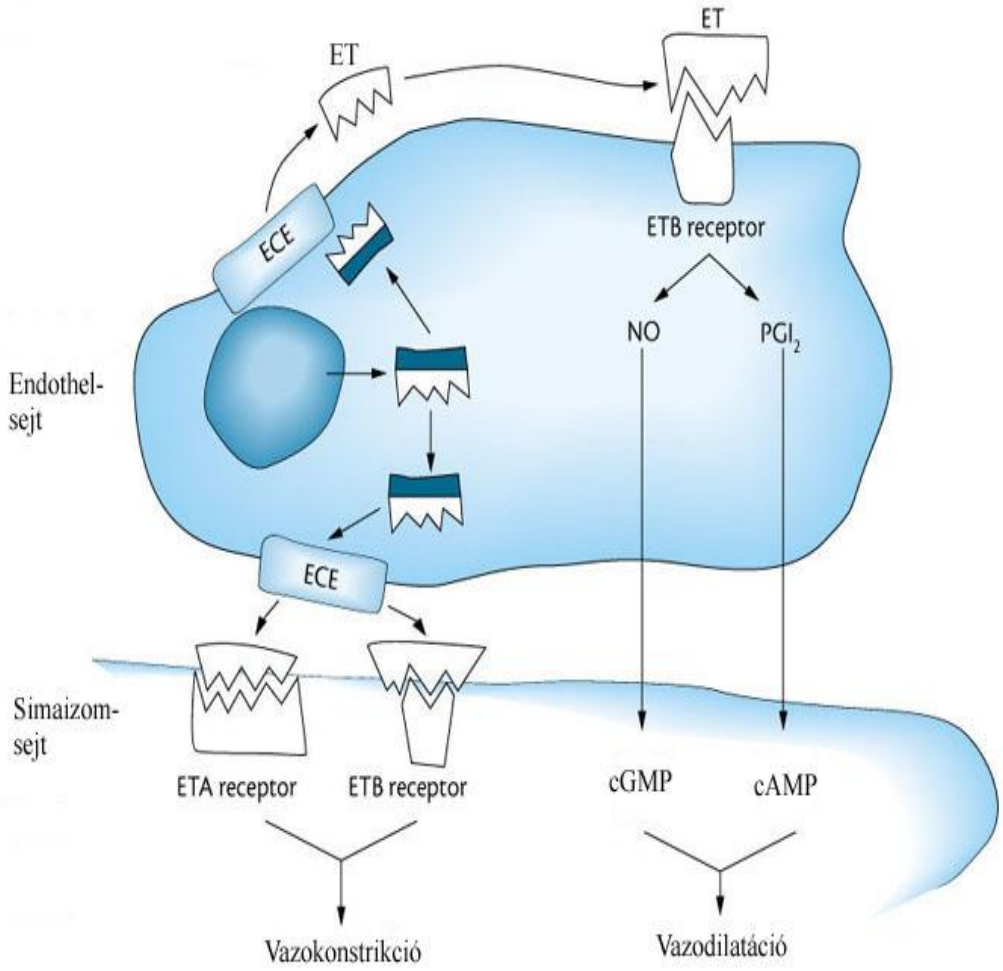
Fiziológiás esetben kisebb mértékben simaizomsejteken és a szíven is expresszálódnak, de jelentőségük és jelenlétük inkább patológiás állapotokban nő meg ezeken a helyeken, vazospazmust idézve elő. Atherosclerosisban és ischaemiás állapotokban mutattak ki kontrakciót közvetítő megnövekedett ET(B) szintet az erek falában és a szíven.[22]
A két receptor génátíródásának mértéke szervszintű mintázatot mutat. Northern-blot technikával az ET(A) receptor mRNS számottevő jelenlétét mutatták ki az erek falában, a szívben, az agyban és a tüdőben, az ET(B) receptor mRNS jelenléte pedig inkább a tüdőre és a vesére jellemző. A tüdő ET(B) receptorainak feladata az ET-1 clearence biztosítása.
Ezen kívül az angiotenzin II, PDGF, TGF és forbol-észterek (PKC stimuláló szerek) csökkenteni képesek, az EGF és az ösztrogén indukálják az ET(A) receptor átírását. A katekolaminok csökkentik, míg a CNP, angiotenzin II növelik az ET(B) expressziót.[19]
Az ET(A) receptornak fontos szerepe van az ET-1 lebontásában, az endothelin konvertáló enzim gátlásában és az endothelsejtek túlélésében. Az endothelialis és a simaizomsejtekben előforduló ET(B) receptorok ugyan molekulárisan azonosak, de farmakológiailag különbséget lehet tenni közöttük. Ezért külön jelölést is kaptak, ET(B1) receptor (endotheliumban) és ET(B2) receptor (simaizomban).[22]

Az ET receptorok jellemzően G-fehérje kötő transzmembrán receptorok. A két receptor extracelluláris N-terminális és intracelluláris C-terminális szekvenciái különböző szerkezetet mutatnak. A kötött G-fehérjék között vannak pertussis-toxin szenzitív és inszenzitív fehérjék is. Ilyen módon egy receptor több jelátviteli utat is képes elindítani.

1.1.3 Az endothelinek élettani és sejtélettani hatásai

Az endothelinek komplex, magasan szabályozott sejten belüli jelátviteli rendszereket aktiválnak. Következményként rövid távú hatások, mint például a simaizomsejt-kontrakció vagy vazoaktív anyagok elválasztását serkentő hatás, illetve hosszú távon kialakuló hatások, mint például a proliferáció és migráció alakulnak ki.
Az ET-1 a ma ismert egyik legerősebb vazokonstriktor. Mind a három endothelin egy átmeneti, endothelium-függő vazodilatációt okoz, még a vazokonstriktív hatás kifejlődése előtt. Ez az ET-3 esetében a legkifejezettebb. A vazokonstrikciót az ET-1-

nek a simaizomsejtek ET(A) receptoraihoz való kötődése okozza. Az ET(B) receptorok aktivációja indirekt módon, vazoaktív anyagok (pl. NO) felszabadulása által hozza létre dilatatív hatását. Emellett egyre több bizonyíték támasztja alá azt a feltételezést, hogy az ET(B) receptoroknak is van vazokonstriktív hatásuk[3] *(3. ábra)*.



3. ábra. Az endothelin vaszkuláris tónust szabályzó funkciója[3]

Az ET-1-et a bigET-1-ből az ECE (endothelin konvertáló enzim) hasítja le. Döntően a simaizomsejtek ET(A) receptorain hatva alakul ki a vazokonstrikció. Az endothelsejtek ET(B) receptoraihoz kapcsolódva NO (nitrogén monoxid) termelődik, ami a simaizomsejteken vazodilatációt hoz létre.

Állatkísérletek bizonyítják, hogy az ET-1 növeli a vérnyomást *in vivo* beadást követően egy órán belül és fiziológiás szerepet játszik az erek bazális tónusának fenntartásában és a fiziológiás vérnyomás beállításában.[25] Az emberi szervezetben a szív mellett a vese erei a legérzékenyebbek az endothelin vazokonstriktív hatására. Az ET-1 az ET(B)

receptorokon keresztül befolyásolja a víz- és a nátriumforgalmat a nefron terminális részében, azaz csökkenti a nátrium kiválasztását, csökkenti a glomerulus filtrációs rátát és növeli az efferens veseartéria vazokonstrikcióját. Ezáltal nő az intravaszkuláris volumen, mely a veseerek szintén fokozott proliferációjával együtt hypertonia kialakulását idézi elő.[26] A mezenteriális ereken, illetve a vázizom erein ez a hatás kevésbé érvényesül. Proliferációt serkentő, mitogén hatása van az érfal media simaizomsejtjein és szívizomsejteken valamint a vese glomeruláris mesangialis sejtjein. A kardiális fibroblasztok kollagéntermelését és Ca^{2+}-raktározását is elősegíti. A *c-fos* és a *c-myc*, e két növekedést serkentő protoonkogén mRNS szintézisét növeli.[27] Az endothelin hatásosan serkenti a monocyták migrációját, fagocitózisát és citokintermelését (TNF, IL, GM-CSF), ami a makrofágok aktiválásán keresztül gyulladásos sejtválaszt vált ki.[28, 29]

Hatása van egyéb keringést szabályozó faktorok, rendszerek működésére, mint például a renin–angiotenzin–aldoszteron rendszerre, a szimpatikus rendszerre, a vazopresszinre, a natriuretikus peptidek aktivitására.[30] Az ET-1 gátolja a renin felszabadulását és serkenti az endothelialis angiotenzin konvertáló enzim (ACE) aktivitást. Az angiotenzin II viszont növeli az ET-1 szintet és az endothelin konvertáló enzim aktivitást. Az ET-1 fokozza továbbá az aldoszteron és az adrenalin felszabadulását. Az ANP-nek viszont nemcsak a felszabadulását, de már a termelését is serkenti, így befolyásolja a vérvolument, a vérnyomást, a véráramlást és a vérviszkozitást.

Az endothelineknek a fentieken túl patogenetikai szerepet tulajdonítanak a csontmetasztázis-képzésben, az angiogenezisben, az apoptózis szabályozásában és az oxigéngyökök termelődésében.[3, 4, 18]

Az ET-1 szerepet játszik ezen kívül mind a centrális, mind a perifériás idegrendszer szabályozásában. Hatása van az agyi neurotranszmisszióra, a vérnyomás emelését a központi szimpatikus kiáramlás révén is növeli.[4]

A fentieken kívül hatása van a pajzsmirigyre, a mellékpajzsmirigyre, a csontmetabolizmusra, a bélrendszerben vazoaktív intesztinális konstriktor fehérje, és szerepe van a köldökérben a vena umbilica zárásában, valamint a menstruáció szabályozásában.[31]

1.1.4. Az endothelin-1 kardiovaszkuláris hatásai

Kardiovaszkuláris hatásai közül fontos a bazális koronáriatónus beállítása, melyben egyéb, keringő ágensek, pl. katekolaminok és lokális idegi hatások is befolyással bírnak. A koronária véráramlása annak a dinamikus egyensúlynak az eredménye, amit az endogén vazodilatátorok (NO, prosztaciklin) és vazokonstriktorok (endothelin) hatásának együttese alakít ki. Az ET-1 a koronária ereket szűkíti, aminek következménye lehet miokardiális ischaemia vagy fatális aritmia (kamrafibrilláció).[32] Alacsony dózisú ET-1 infúziót követően, a súlyos kamrai ritmuszavarok megjelenése megelőzi a miokardium ischaemiás jeleit, az akciós potenciál jellemzően megnyúlik, ami növeli a korai utódepolarizáció kialakulásának esélyét.[33] Mivel ez a folyamat Ca^{2+}-antagonistákkal részlegesen gátolható, valószínűsíthető az intracelluláris kálciumnövekedés kóroki szerepe.[34] Az endothelin receptorok hatással vannak a sejtmembránban elhelyezkedő ioncsatornákra, így azokon keresztül okoznak például sejten belüli kálciumszint-emelkedést. Megjelenési formáit és kialakulásának időrendiségét figyelembe véve, a súlyos szívelégtelenségben szenvedő betegek életét kioltó ritmuszavarok nagy része meglepő hasonlóságot mutat az ET-1-gyel előidézhető kísérleti aritmiákkal.[33, 35]

Az endothelinnek in vitro direkt pozitív inotróp és ritkábban kronotróp hatása is van.[36] A pozitív inotróp hatás a PKC-n és a Na^+/H^+ cserélő ioncsatornán keresztül valósul meg, melynek következtében a myofilamentumok Ca^{2+} érzékenysége megnő.[20] *In vivo* hatása kettős; kis dózisban pozitív inotróp, nagyobb dózisnál csökkenti a perctérfogatot, esetleg kamrai aritmiát vagy ischaemiát idéz elő.[37] Humán vizsgálatokban a fiziológiás endothelin mennyiség csökkentette a perctérfogatot. A pontos mechanizmus nem ismert, de szerepet játszhat benne a baroreceptor mediálta szívfrekvencia-csökkenés vagy az utóterhelés-növekedés.

Számos adat bizonyítja, hogy az ET-1 komoly szerepet játszik az atheroscleroticus lézió kialakulásában és progrediálásában is.[29, 38-40] Az ET-1 mitotikus hatását valószínűleg az ET(A) receptoron keresztül fejti ki, a receptor blokkolása az atherosclerotikus lézió csökkenését eredményezi.[41] Humán vizsgálatok azt igazolják, hogy a magas endothelin szint gyorsítja a koronáriák atheroscleroticus elváltozását. Az atherosclerosisos

léziókban magasabb szöveti endothelin szintet lehet mérni, mint a normál koronáriákban. Az ET-1 nemcsak növeli az atherosclerosisos erekben az értónust, de felerősíti az egyéb hatásokra kialakuló vazospazmust is. Így megmagyarázható az instabil anginában tapasztalható szegmentális koronária hiperreaktivitás is.[42] Az emelkedett koleszterinszint nemcsak a keringő endothelinszintet emeli, de a szöveti ET-1 és az ECE aktivitását is fokozza. Adatok vannak arra is, hogy statin kezelés a koleszterinszint ill. az atherosclerotikus elváltozások mértékének csökkentése mellett az ET-1 és a gyulladásos markerek szintjét is csökkenti[43]. Az endothelin vazokonstriktív szerepe mellett hat a monocitákra, a vérlemezkékre, a fibroblaszt sejtekre, a simaizomsejtekre és az endothelsejtekre. Az ET(B) receptoron keresztül kemotaktikus hatása van, a gyulladásos sejtek aktiválásán keresztül gyorsítja az atherosclerosis folyamatát. Az ET-1-nek szerepe van az érfal kalcifikálódásában is, elősegíti a kálcium lerakódását az érfalba.[44]

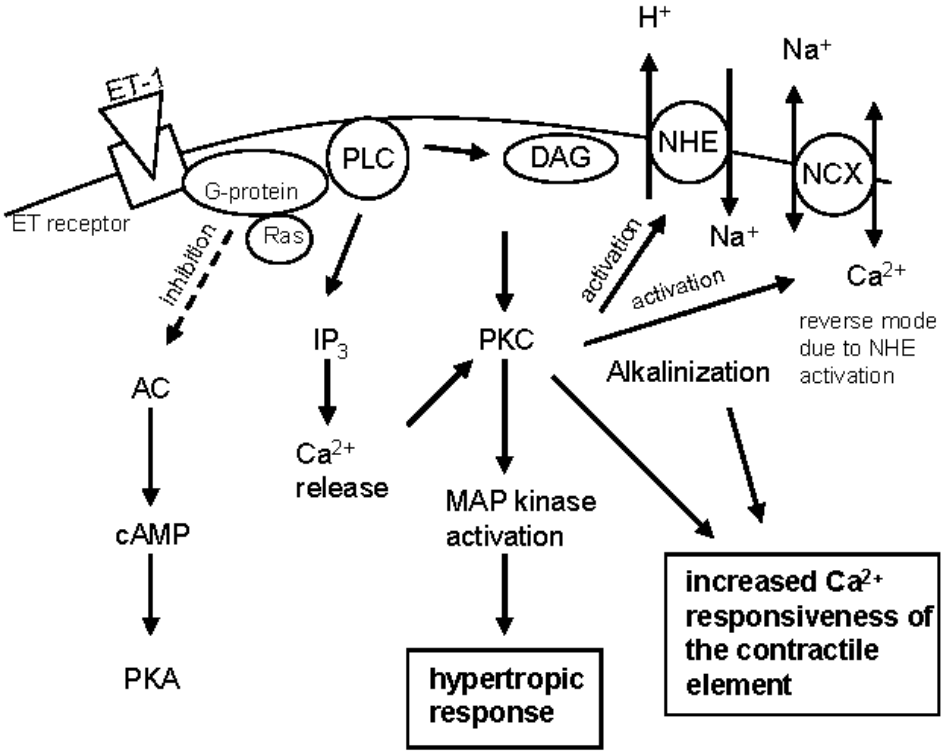
Primer pulmonális hypertoniában az ET-1 mitotikus és vazokonstriktor hatása egyértelműen hozzájárul a pulmonális hypertensio létrejöttéhez. A pulmonális erek endotheliuma több ET-1-et termel, mint amennyi a keringésből kivonható, ezért az ET-1 plazmaszintje a primer pulmonalis hypertoniásokban lényegesen magasabb, mint egészségesekben.[45] A normálisnál kétszer magasabb ET-1 plazmaszint mérhető szekunder pulmonális hypertoniában is.[46] Hipoxia hatására egerekben hatszoros ET-1 génexpresszió fokozódást figyeltek meg a pulmonális erekben.[47]

1.2. Cardiomyocyták

Az ET-1 hatására a szívizomsejtek hipertrofizálnak.[48] Patkány szívizomsejteken terhelés hatására az ET-1 gén expressziójának fokozódását mutatták ki, melynek így szerepe lehet a terhelés ill. tréning hatására létrejövő adaptív hipertrófia kialakulásában.[49]

Az ET1 cardiomyocyta hipertrófiát okozó hatása az ET(A) receptoron keresztül valósul meg, és mértéke attól függ, hogy milyen az endothelin receptorok megoszlása. A fiziológiás arány a különböző szívbetegségek következtében megváltozik. Különböző elváltozásokban, mint ischaemia-reperfúzió esetén, krónikus szívelégtelenségben, magas vérnyomásban vagy atherosclerosisban ez az egyensúly megbomlik a vazokonstriktorok javára, az endothelin termelés és lebontás között aránytalanság lép

fel. Az ET-1 az ET(A) receptorokhoz kapcsolódva a PKC rendszert aktiválja, fokozza a c-jun transzkripciós faktor gén expresszióját, a c-Jun fehérje mennyiségét és foszforilációját. A c-Jun expresszió és foszforiláció igen fontos számos egyéb gén átírásának szabályozásában[50] *(4. ábra)*.



4. ábra. Endothelin-1 hatás intracelluláris szignáltranszdukciós útja szívizomsejtekben. A fokozott kontraktilitás és a hipertófiás válasz kialakulásában szerepet játszó folyamatok. AC, adenylyl cyclase; DAG, diacylglycerol; IP_3, inositol-1,4,5-triphosphate; MAP kinase, mitogen activated protein kinase; NCX, Na^+-Ca^{2+} exchanger; NHE, Na^+-H^+ exchanger; PKA, protein kinase A; PKC , protein kinase C; PLC, phospholipase C.[50, 51] *(From* Sugden PH, Clerk A. Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. Curr Vasc Pharmacol 2005;3:343-51.)

Kísérleti körülmények között, az eNOS termelésre képtelen egerekben diastolés diszfunkció alakult ki, melyet a fokozott ET-1 termelődés képes volt kivédeni. Az ET-1 túltermelődés hatására az oxidatív stresszért felelős gének fokozott expressziója is megfigyelhető volt, melyek tartós hatását a bal kamra funkcióra azonban már nem vizsgálták.[52] Újszülött patkányszíven tartós ET-1 hatásra az intracelluláris kálcium áram csökkenését tapasztalták, mely a kardiális funkció csökkenésével járt. A hatás az ET(A) receptoron keresztül valósult meg, a receptor blokkolásával kivédhető volt.[53] Egér

szívizomsejt (HL-1) protein expressziójának és szignál transzdukciós útjainak vizsgálatakor azt találták, hogy az ET-1 döntően a mitogén-aktivált protein kináz és a phosphatidylinositol-3-kináz/AKT útvonalon aktiválja a sejteket.[54] Cardiomyocyták és fibroblasztok közös sejttenyészetében azt figyelték meg, hogy a lokálisan termelődött ET-1 autokrin stimulátora volt a fibroblaszt proliferációnak ill. hogy a környező myocyták által termelt ANP parakrin módon gátolta ezt a proliferációt. Ez utóbbi hatás a GATA4 foszforiláció csökkenése útján valósult meg.[55]

1.2.1 Ischaemia/reperfúzió

Az ET-1 szerepe miokardiális infarktusban kettős, egyrészt oki szerepe lehet az infarktus kialakulásában az atherosclerosis, endothel diszfunkció útján, másrészt az infarktus bekövetkeztével stabilizáló hatása van, elősegíti a hegképződést. Kemotaktikus hatására neutrofil sejtek és makrofágok jelennek meg. Miokardiális infarktus után az ET-1 hatására fokozódik a fibroblaszt proliferáció, az adhéziós molekulák expressziója és az extracelluláris mátrix depozíció, melyek összessége a miokardium fibrózisát okozza, a posztinfarktusos remodelling és hegképződés részeként. Ugyanakkor az ET-1 magas szintje kedvezőtlen a koronária keringésre, mert direkt vazokonstrikciót, növekedési faktorok aktiválásával simaizomsejt proliferációt okoz, stimulálja a trombociták aggregációját, intima hiperpláziát, fokozott kollagén-1 szintézist idéz elő.

Az ET-1 koncentráció növekedésének ütemével megegyezően súlyosbodnak az anginás panaszok, az instabil angina előfordulása nő.[56] Az ET-1 miokardiális infarktusban az egy éves túlélés prognosztikai faktora, posztinfarktusos betegekben minél nagyobb az ET-1 szint, annál gyakoribb a halálozás.[57-59] Mind klinikai, mind kísérletes acut ischaemiás vizsgálatok során kimutatták, hogy az ET-1 szerepet játszhat a szívizomkárosodás, a bal kamrai remodelling kialakulásában és a malignus kamrai ritmuszavarok előfordulásában.[32, 60-62] Emelkedett plazma ET-1 szintet mutattak ki akut miokardiális infarktus korai szakaszában, mely a csúcsot kb. 6 óra után éri el és 24 óra után visszatér a kiindulási értékre.[63] Szövődményes esetekben, szívelégtelenség, kardiogén shock kialakulása esetén az ET-1 plazma szint tartósan magas marad.[64, 65]

Az akut miokardiális infarktus korai szakaszában minél rövidebb idő alatt sikerül elérni a reperfúziót, annál nagyobb mértékben csökken a sejt és szövetszintű károsodás. Sok esetben azonban az infarktusért felelős artéria korai és megfelelő megnyitása ellenére sem megfelelő a reperfúzió, hatékonyságát csökkenti a mikrovaszkuláris keringés csökkenése és az elvileg életképes endothel és szívizomsejtek reperfúziós károsodása.[66] Ennek az ún. *no-reflow* jelenségnek a kialakulásában az ET-1 patogenetikai szerepét valószínűsítik.[67, 68] Kutyákon végzett kísérlet során a bal koronária 90 perces lekötését követően az intrakoronáriásan adott ET-A antagonista hatására a no-reflow jelenség kiterjedése harmadára, a tényleges infarktus terület a felére csökkent.[67] Nem teljesen tisztázott azonban, hogy a tapasztalt ET-1 plazmaszint emelkedés az ischaemiás miokardium fokozott termelésének következménye-e. Kutya modellben *Miyauchi és munkatársai* nem találtak jelentős ET-1 plazmaszint változást az ischaemia alatt.[69] Patkányszív modellen a prepro-ET-1 mRNS fokozott expressziója mutatható ki szívizomsejtekben, mely stimulált lokális produkcióra utal. Egy másik kísérletben az ischaemia alatt megemelkedett plazma ET-1 szint a reperfúzió során tovább nőtt, ami a reperfúzió kiváltotta kimosási jelenségnek tudható be.[70] Szintén patkány szívizomsejteken mutatták ki hipoxia ill. acidózis hatására mind az ET-1, mind a receptorok expressziójának növekedését. A jelenség NO adásával részben gátolható volt.[71] Kutyaszív ischaemia/reperfúziós modelleken a sinus coronariusból vett mintákból az ET-1 fokozott kibocsátását mutatták ki reperfúzió alatt.[68] Egy másik kutyákon végzett vizsgálatban viszont nem sikerült ET-1 emelkedést kimutatni ischaemia/reperfúzió során.[69, 72]

Bizonyítást nyert, hogy perkután transzluminális koronáriaplasztikát követően megnő az endothelin plazmaszintje.[73] Vizsgálatokkal igazolták, hogy ez nem az ischaemia hatására jön létre, hanem az endothelium sérülése váltja ki a peptid szintjének emelkedését.[74] A sérült endotheliumnak magasabb az ET-1, az ET-3, az ECE és az ET(A) receptor expressziója. Ez a sérülést követő 14 napon keresztül áll fenn, létrehozva ezzel az ET-1 elnyújtott és aktív hiperpláziás hatását.[75]

1.3 Endothelium

Az ereket az egy sejtsor vastagságú vaszkuláris endothelium béleli. Fizikai barrier funkciója mellett aktív hemodinamikai és biokémiai feladatai vannak. Ide tartozik a vaszkuláris tónus és struktúra fenntartása[76], a vaszkuláris sejtek növekedésének, a trombotikus és a fibrinolítikus folyamatoknak, a gyulladásos és immunfolyamatoknak, a fehérvérsejtek és a trombociták adhéziójának, a vaszkuláris permeabilitásnak, az oxidációs - redukciós folyamatoknak a szabályozása, a lipidoxidáció befolyásolása. Mivel a keringő vérrel direkt kapcsolata van, az endothelium károsodhat az intravénásan adott anyagok, pl. kemoterápiás szerek által. Az endothel károsodás ebben az esetben kétélű: egyrészt elősegíti a tumorellenes kezelést a daganat ereinek károsítása és hipoxia kialakítása révén, másrészt az egészséges szövetekben létrejövő endothelkárosodás következtében kialakuló, akár súlyos endothel diszfunkció miatt nemkívánatos kardiovaszkuláris mellékhatások jelentkeznek.[77-79] Az endotheliumnak kiemelt szerepe van a vaszkuláris homeosztázis szabályozásában. Az endothelt érintő hatások, az érfal és az endothel funkciójának károsodásán keresztül kardiovaszkuláris betegségek, pl. atherosclerosis, hypertonia kialakulásához vezetnek. Mivel ez utóbbi számos kardiovaszkuláris betegségben megfigyelhető, nem meglepő, hogy számos daganatellenes szernek van kardiovaszkuláris mellékhatása. Az endothelsejtek parakrin úton szabályozzák a környezetükben levő sejtek működését, tartják fenn az érfal tónusát. Ezért az utóbbi évek kutatásainak fő célpontja az endothelium által elválasztott anyagok – többek között az ET-1 - és ezek szerepe különböző patofiziológiai állapotokban.[76]

1.3.1. Endothel diszfunkció

A különböző kémiai és fizikai változásokra az endothelium vazoaktív anyagok és szignáltranszdukciós molekulák - nitrogén-monoxid, prosztaciklinek, endothelinek, interleukinok, adhéziós molekulák és fibrinolitikus faktorok - szintézisével és kibocsátásával reagál.[80] Az endothelium biokémiai vagy mechanikai sérülése a különböző hatású molekulák egyensúlyának felborulásához vezet. Megszűnik az egyensúly a relaxáló és a vazokonstriktor faktorok között, az anti- és a prokoaguláns tényezők és a növekedést serkentő és gátló anyagok között. Funkcionális megközelítésben azt az állapotot nevezik endothel diszfunkciónak, amikor egy adott

noxára nem a fiziológiás válaszreakció vagy nem a fiziológiás mértékű válaszreakció jön létre.[81] Mára elterjedt az a nézet, hogy számos kardiovaszkuláris rizikótényező, mint például az oxidatív stresszt okozó dohányzás, cukorbetegség vagy elhízás tulajdonképpen az endothelium diszfunkcióját előidézve fejti ki kártékony hatását.[82] Patológiás állapotokban a szabadgyök-képződés is jelentősen megnő. Az emelkedett szabadgyök-koncentráció önmagában is felelőssé tehető az endothel diszfunkcióért, mivel a szuperoxid szabadgyökök az endotheliumhoz közvetlenül kapcsolódva, direkt módon képesek azt károsítani.[83, 84] Jelentősen növekvő számú publikáció bizonyítja, hogy az ET-1 részt vesz a daganatos megbetegedések patogenezisében is.[2, 85] A kardiovaszkuláris és az onkológiai betegségekben gyakran kimutatható endothel diszfunkció. A különböző daganatokban [86-88] és kardiovaszkuláris betegségekben, mint pl. krónikus szívelégtelenség, ischemiás szívbetegség, hypertonia, atherosclerosis és pulmonális hypertonia[2] kimutatható emelkedett ET-1 szint feltehetően az endothel diszfunkció következménye. Másrészről az ET-1-nek szerepe lehet az endothel diszfunkció kialakulásában, mivel parakrin és autokrin hatása van az endothelsejtekre.[2, 13, 89] *Salani és munkatársai*[90] megfigyelték, hogy exogén ET-1 angiogenezist indukált HUVEC-en. *Knowles és munkatársai*[91] közlése szerint az ET-1-nek direkt angiogenikus hatása van az endothelsejtekre és indirekt módon fokozza az angiogenezist a fibroblasztok és a tumorsejtek pro-angiogenikus faktorainak termelésén keresztül.

1.3.2. Az endothel diszfunkció vizsgálata

Az endothel diszfunkció komplex folyamat, különböző aspektusainak megítélésére többféle vizsgálómódszer áll rendelkezésre. A módszerek egy része a keringő vazoaktív anyagok (például az ET-1, von Willebrand faktor, adhéziós molekulák) meghatározásán alapul, de léteznek egyéb, az endothelium működését vizsgáló invazív, szemi-invazív és non-invazív vizsgálatok is.[79, 82]

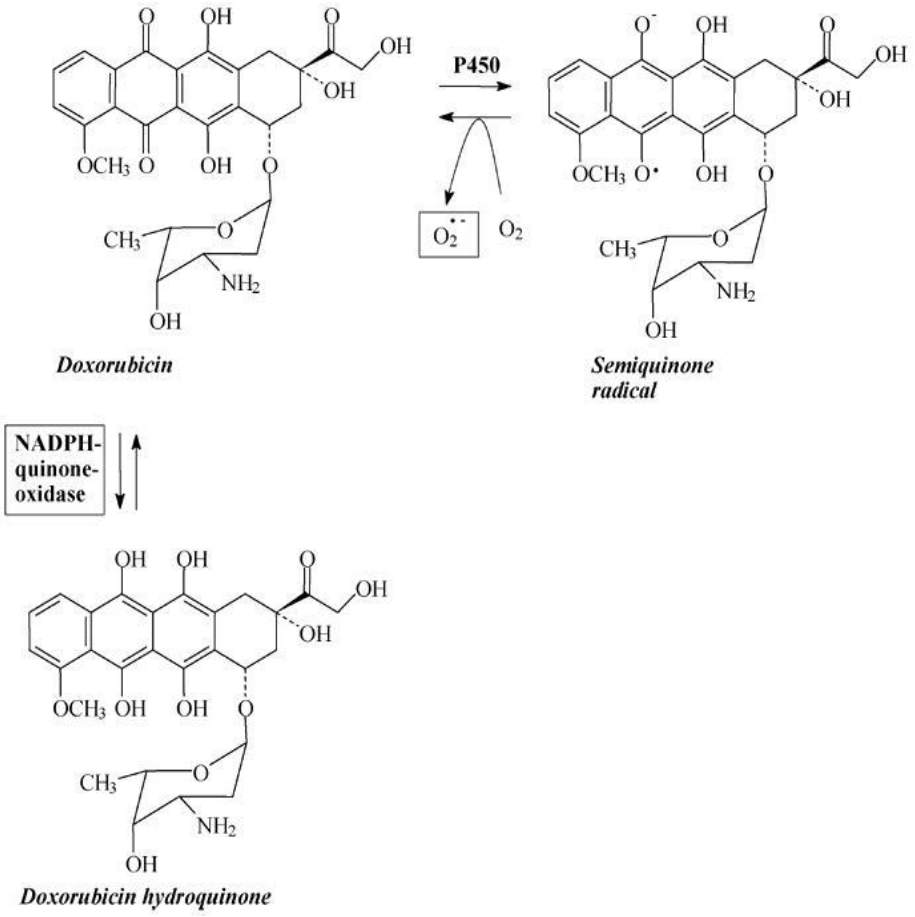
Az invazív eljárások közé tartozik a kvantitatív koronarográfia, amikor az epikardiális erekbe adott vazoaktív anyag (acetilkolin) határára a normális koronáriaerekben a fokozott NO-elválasztás révén vazodilatáció lép fel. Endothel diszfunkció esetén paradox vazokonstrikció látható.

A legelterjedtebben alkalmazott non-invazív vizsgálat az artéria brachialis ultrahang vizsgálata, az áramlás-mediált vazodilatáció regisztrálása. Ebben az esetben a *shear-stress* (falfeszülés) hatására kialakuló endothel-függő vazodilatációt és áramlásfokozódást mérik. A dilatáció mértéke arányos az endothel nitrogén-monoxid termelésével, és korrelál a koronáriaerek endothel-dependens vazodilatációjával. Az endothel funkciójának vizsgálatára használják még a carotis intima-média távolság mérését, a pulzushullám terjedési sebesség meghatározását ill. újabban a koronária erek MRI vizsgálatát is. [92, 93]

1.4. Anthracyclin toxicitás

Az anthracyclinek (doxorubicin (DXR)) kardiovaszkuláris toxikus hatása széles körben ismert. A szívet érintik a szer alkalmazása után közvetlenül jelentkező szupraventrikuláris, ventrikuláris tachikardiák, az extrasziszto lék, a miokarditisz, perikarditisz. Ezek klinikailag jól befolyásolhatók. Veszélyesebb és súlyosabb problémát jelentő következmény a fokozatosan kialakuló kardiomiopátia, melynek talaján krónikus szívelégtelenség alakulhat ki.[94] Kevés ismerettel rendelkezünk az anthracyclinek vaszkuláris károsodást, endothel diszfunkciót okozó hatásáról, melyek részben akutan, részben krónikusan jelentkeznek. Az anthracyclinek toxicitásának pontos mechanizmusa teljes részletességében még nem tisztázott, mai ismereteink szerint valószínűleg multifaktoriális. Részben direkt DNS-károsító hatása (interkaláció, alkylálás, cross linking), részben direkt membránhatások, részben szabadgyök-képződés ill. apoptózis indukció ismertek.[95-98] A tumorellenes hatás a DNS-kötődés mértékével és a következményes DNS-károsodással függ össze[99]. A doxorubicin quinon formájából a citokróm P450 hatására semiquinon szabadgyök képződik *(5. ábra),* mely oxidáció útján vissza tud alakulni az eredeti molekulává, miközben szuperoxid anion keletkezik. A szuperoxid lipidperoxidáción keresztül az endoplazmás reticulum, a mitokondrium és a nukleinsav károsodását okozza. A DXR-nak a Ca^{2+}-csatornákra gyakorolt hatása miatt nő az intracelluláris Ca^{2+}-szint, a sarcoplasmás reticulumból kiürül a Ca^{2+}-raktár.

DOI:10.14753/SE.2012.1740



5. ábra. A doxorubicin szerkezete és biokémiai átalakulása[100]

A szuperoxidok redukcióját a szuperoxid-dizmutáz nevű enzim végzi. A keletkezett hidrogén-peroxid másik két enzim segítségével alakul tovább. A kataláz egyenlő mennyiségben bontja a hidrogén-peroxidot vízzé és oxigénné, a glutation-peroxidáz pedig vízzé és oxidált glutationná konvertálja a képződött szabadgyököket. A miokardium nem tartalmaz katalázt, így ez a szövet különösen szenzitív a DXR károsító hatására, hiszen a kialakuló reaktív oxigénvegyületeket csak egyetlen, gyorsan kimerülő enzimrendszerrel képes eliminálni.[99] Vaszkuláris endothelsejtekben kimutatták, hogy a DXR triggerelte a reaktív oxigén vegyületek termelődését, melynek eredményeként oxidatív DNS károsodások (pl. DNS törések) jöttek létre. A DXR növelte a p53 expresszióját, fokozta a checkpoint kináz (Chk-1) és a stressz-aktivált protein kináz/c-Jun-Nterminal kináz (SAPK/JNK) aktivitását is humán véna umbilikális endothelsejtekben (HUVEC).[101, 102] Az oxidatív stressz mellett a DXR-nak számos más hatása is van az endothelre, melyeknek szerepe lehet a káros kardiovaszkuláris

hatásokban. Például DXR kezelésnek kitett endothelsejtekben az endothel felszínéhez kötött protein C-nek mind a mennyisége, mind az expressziója csökkent, és annak ellenére, hogy ezzel párhuzamosan a thrombomodulin expressziója nőtt, a két antikoagulációt szabályozó fehérje arányának megváltozása még így is a trombózis kockázatának növekedését eredményezte.[103]

A keringő proinflammatorikus citokineknek szintén szerepük lehet a toxicitás kialakításában. A doxorubicin növeli a makrofágok hisztamin és tumornecrosis faktor-α (TNF-α) elválasztását és a monociták interleukin-2 képzését.[28] Ezen citokinek a szívizomsejten elhelyezkedő saját receptoraikon keresztül okozhatnak dilatatív kardiomiopátiát, az endothelen pedig endothel diszfunkciót.[104]

1.4.1. ET-1 és anthracyclin kezelés

Csak néhány közlemény foglalkozik az ET-1 szintjével anthracyclin kezelés kapcsán. Ezek többségében az anthracyclin akut hatását vizsgálták emlőkarcinómás betegekben.[105] Kevés olyan közleményt találtunk, melyekben az anthracyclin krónikus hatását (a kezelés után egy évvel is) vizsgálták volna az ET-1 szintre. Azokban a betegekben, akikben progresszív szívelégtelenség alakult ki, emelkedett ET-1 szint volt észlelhető, mely az állatkísérletes modellek szerint a szívizomsejtek károsodása következtében kialakuló kompenzáló reakciónak tudható be.[106]

Ezekkel a megfigyelésekkel szemben, munkacsoportunk DXR-rel kezelt limfómás betegek vizsgálata során eltérő eredményre jutott.[107] Az anthracyclin kezelést követően az ET-1 plazma szint szignifikáns csökkenését találtuk. Az ET-1 szint csökkenés az anthracyclin direkt citotoxikus hatásának következménye lehet, részben az endothelialis m-RNS szintézis gátlása, részben az endothel diszfunkciót okozó szuperoxid ágensek keletkezése révén. Az anthracyclinek ezen hatása független terápiás hatásuktól.

Az ET-1 szint emelkedésének hiányában szerepet játszhat az is, hogy betegeink közül csak néhány beteg volt NYHA II. illetve III stádiumban, klinikailag jelentős szívelégtelenség pedig csak 1 esetben fordult elő. Irodalmi adatok szerint az ET-1 plazmaszint emelkedés döntően csak a NYHA III.-IV. stádiumban figyelhető

meg.[108, 109] Az ET-1 szint csökkenése következtében az ET-1 esetleges citoprotektív hatása is eliminálódik, így az anthracyclin kardiotoxikus hatása könnyebben kifejlődik.[110]

Az eredmények alapján munkacsoportunk in vitro vizsgálatokat tervezett az anthracyclinek direkt citotoxikus hatásának vizsgálatára az ET-1 szintézisére.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

2. CÉLKITŰZÉSEK

Mint a bevezetőben részletezettek mutatják, az ET-1 patogenetikai szerepét a kardiovaszkuláris betegségekben széleskörben tanulmányozták. A következtetéseket állatkísérletes modellekből illetve humán plazmaszint meghatározásokból vonták le. A plazmában mérhető értékek a peptid gyors lebomlása ill. abluminalis szekréciója miatt nem minden esetben tükrözik a valós helyzetet. Vizsgálataink során munkacsoportunk korábbi, DXR-rel kezelt limfómás betegekből származó eredményei nyomán az ET-1 szerepét kívántuk direkt módon vizsgálni szívizomsejteken. Ehhez először kutyában kialakított ischaemia/reperfúzió modellt használtunk. Az ET-1-ről ismert, hogy mértékével arányos az infarktus nagysága és az ischaemia indukálta kamrai aritmiák előfordulása, de a cardiomyocyták apoptózisának gátlásával szerepe van a szöveti regenerációban is.[111]
A kutya modellt az emberhez igen hasonló koronáriarendszer miatt választottuk.

Az alábbi célokat tűztük ki:

1. Pontos és érzékeny RT-PCR módszer kidolgozása az ET-1 mRNS képződés detektálására.
2. A plazma ET-1 és big ET-1 szintjének változásának vizsgálata ischaemia ill. reperfúzió hatására.
3. A szívizomsejtek ET-1 mRNS szint változásának vizsgálata ischaemia ill. reperfúzió hatására.

Második kísérleti rendszerünkben DXR-rel kezelt limfómás betegpopuláción kapott eredmények alapján a DXR direkt hatását vizsgáltuk az ET-1 és egyéb, a kardiovaszkuláris betegségekben érintett gének expressziójára endothelsejtekben. Az endothelsejteket, mint a toxikus károsító hatással első vonalban találkozó sejteket választottuk ki.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

Az alábbi célokat tűztük ki:

1. DXR citotoxicitásának meghatározása endothelsejteken különböző időpontokban, a DXR direkt hatásának vizsgálatára alkalmas kezelési idő és koncentráció kiválasztására
2. Az endothelsejtek DXR-indukálta, a kardiovaszkuláris rendszerre jellemző, számos kardiovaszkuláris betegség által befolyásolt génjeinek expressziós mintázatának meghatározása cDNS array segítségével.
3. ET-1 mRNS expresszió vizsgálata DXR-rel kezelt endothelsejteken qPCR módszerrel.
4. A metodika validálása ugyanolyan körülmények között DXR-rel kezelt HeLa sejtek vizsgálatával.
5. A DXR endothelsejtekre kifejtett hatásának szélesebb körű vizsgálatára Microarray rendszerrel a teljes genetikai állomány expressziós profiljának meghatározása. Az ET-1-gyel kapcsolatban álló, DXR kezelésre hasonló változást mutató gének feltérképezése.
6. Az eredmények validálása a hatásért végeredményben felelős termék, a bigET-1 fehérje változásának meghatározásával DXR-rel kezelt endothelsejtekben.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kutyaszív ischaemia/reperfúziós modell

3.1.1.Kísérleti felépítés

Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Ér- és Szívsebészeti Klinika (jelenleg SE Kardiológiai Központ) Kísérleti és Kutató Laboratóriumában, a Semmelweis Egyetem állatvédelmi szabályzatában foglaltak betartásával és a Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (US NIH Publication No. 86-23, revised 1996) laboratóriumi állatok tartására vonatkozó nemzetközi szabályoknak megfelelően végeztük.

A vizsgálatot 9, mindkét nembeli keverék kutyán végeztük. (súly: 22,7±1,9 kg). Az általános anesztéziát Na-pentobarbitállal (30 mg/kg iv.) hoztuk létre és szükség szerint további anesztetikumot adagoltunk. Endotrachealis intubálást követően az állatokat szobalevegőn lélegeztettük. Thoracotomiát végeztünk a bal V. bordaközben és megnyitottuk a perikardiumot. Izoláltuk a bal elülső leszálló artériát (LAD). A LAD II. diagonális ága alá egy hurkot helyeztünk el a későbbi lefogáshoz. Az artériás vérnyomást, a koronária áramlást és az EKG-t folyamatosan regisztráltuk. A LAD 30 perces lefogása után további 90 perces reperfúziós időszakot figyeltünk meg. Vér- és szívizommintát vettünk a LAD lefogása előtt, közvetlenül a felengedés után és a reperfúzió 90. percében. Az ET-1 és big-ET plazmaszintek meghatározásához az a. femoralisba és a sinus coronariusba katétereket vezettünk be, és mintát vettünk a következő időpontokban: kontroll, ischaemia 30. perc, reperfúzió 90. perc. A miokardium biopsziát az ischaemiás terület epikardiális felszínéről vettük Johnson és Johnson biopsziás eszközzel. Az endocardialis mintavétel bonyolultabb metodikát igényelt volna és a komplex kísérlet egyéb vizsgálandó paramétereit, nevezetesen a kamrai ritmuszavarok spontán előfordulását ischaemia/reperfúzió során az intraventricularis manipuláció zavarta volna, ezért történt a mintavétel az epicardialis felszínről.

3.1.2. Biokémiai vizsgálatok

Az ET-1 és big-ET-1 szintek meghatározása az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán történt.

Az ET-1-t és big-ET-1-t a plazmából immunprecipitációval tisztítottuk, a plazmaszinteket Western blot módszerrel határoztuk meg. 50 µl EDTA-s plazmát az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk, majd Protein A-Agarose segítségével kicsaptuk. A precipitátumot glicerin és merkaptoetanol tartalmú loading pufferrel denaturáltuk és 15%-os SDS-PAGE (Biorad Protean II xi Cell készüléken) technikával molekulasúly szerint szeparáltuk. Az elválasztott fehérjéket Nova blot készüléken PVDF membránra vittük át. A membránhoz kötött fehérjék identifikálására anti-ET-1, anti-big ET-1 és szekunderként alkalikus foszfatáz konjugált anti-nyúl antitesteket (Biomedica GmBH, Vienna, Austria) használtunk, majd NBT-BCIP előhívó rendszerrel festettük meg. Denzitometriát Fluorochem 8900 (Alpha Innotec) készülékkel és annak szofverével végeztük.

Az ET-1 mRNS szöveti szintjének meghatározása RT-PCR-ral történt. Az ischaemiás szívizomszövetből biopsziával nyert anyagból TRI reagens (Sigma, Steinheim, Germany) és kloroform segítségével izoláltuk az RNS-t. A vizes fázisban az mRNS-cDNS átírást oligodT_{23} és Enhanced Avian HS RT-PCR kittel végeztük. A cDNS mennyiségi meghatározásához specifikus primereket és Light Cycler FastStartDNA Master SYBR Green I kit (Roche, Mannheim, Germany) kitet használtunk Light Cycler készüléken. Az alkalmazott primereket Primer 3 Design szoftver segítségével online terveztük. A PCR termék azonosítását először molekulasúly alapján 0,8%-os horizontális agaróz gél elektroforézissel végeztük, hogy meggyőződjünk a specificitásról, majd szekvenálással ellenőriztük (ABI 310 készülék, Applied Biosystems, Lincoln CA, USA).

3.2. Endothelsejtkultúrán végzett kísérletek

3.2.1. HUVEC izolálás és sejtkultúra

Az endothelsejtek preparálását és tenyésztését munkacsoportunk által korábban leírt módszer szerint végeztük a SE III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában.[112] A kísérletek tervezésekor fontos szempont volt számunkra, hogy humán sejteken vizsgálódjunk ill. hogy a vizsgált sejtek ún. „primer" sejtek legyenek, vagyis ne egy immortalizált sejtvonalból származzanak. Technikai okokból (hozzáférhetőség, mennyiségi igény) is a HUVEC alkalmazása volt a megfelelő választás, de azon okból is, hogy a humán endothelsejtekre vonatkozó vizsgálatok döntő hányada ezen a sejtvonalon történt. Az endothelsejteket humán köldökzsinór vénából kollagenáz (1 mg ml−1, Gibco/Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) segítségével emésztettük. A sejteket 0,5% zselatinnal (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) fedett sejttenyésztő flaskába helyeztük M199 (Gibco/Invitrogen) médiumban, és 10% magzati borjú szérummal (FCS) (Gibco/Invitrogen), 100 IU/ml penicillinnel (Sigma), 100 μg/ml streptomycinnel (Sigma), 7.5 IU/ml heparinnal (Sigma), 2 ng/ml epidermalis növekedési faktorral (EGF) (R&D, Abington, UK) és 250 pg/ml β-endothelsejt növekedési faktorral (β-ECGF) (BioSource, Camarillo, USA) kezeltük. A sejteket 2-4 alkalommal passzáltuk. A sejtkultúra minőségét rendszeresen ellenőriztük morfológiai szempontok (utcakő rajzolat) és a von Willebrand faktor pozitivitás alapján.
A SuperArray és a real-time PCR (RT-PCR) kísérletekhez a sejteket 80 cm^2-es szövetkultúrákban ill. 24-lyukú lemezen (mindkettő Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA, USA) tenyésztettük és akkor használtuk fel, ha a konfluencia 90%-ot elérte.
A HeLa sejteket DMEM médiumon (Gibco/Invitrogen) tenyésztettük, melyet 10% FCS-sel (Gibco/Invitrogen), 100 IU/ml penicillinnel (Sigma), 100 μg/ml streptomycinnel (Sigma) egészítettünk ki.

3.2.2. Citotoxicitás vizsgálatok

Jelentős, nem specifikus mRNS lebomlás figyelhető meg mind apoptózis, mind nekrózis során, mely a gén expresszió változásának téves értelmezését vonhatja maga

után. Ennek elkerülése érdekében szükségesnek tartottuk a DXR citotoxicitásának meghatározását különböző időpontokban. Az endothelialis citotoxicitást Herczenik és munkatársai által leírt módszer szerint értékeltük.[77] A sejteket 96-lyukú lemezre helyeztük és 24 órás inkubációt követően DXR-t (Teva) adtunk 5 párhuzamos mintába különböző koncentrációkban (20 000 - 39 ng/ml, 1:2 sorozatos higítás). További 2, 6, 24 és 48 h inkubációt követően a citotoxicitást (mind a nekrózis, mind az apoptózis jeleit figyelembe véve) a morfológia pontozásával (gyakorlott vizsgáló által meghatározott értékek 4-től 0-ig terjedtek, ahol a 4-es érték megfelel a 100%-os konfluenciának, a 0-s az élő sejtek hiányának, az ezek közé eső értékek a konfluenciától és a sejtek morfológiájától függően 1-2-3), valamint SYBRGreen (Molecular Probes/Invitrogen) magfluoreszcenciával értékeltük. Ennél a módszernél a DXR kezelést követően a sejteket mostuk, aceton-metanollal fixáltuk és Sybr-Green nukleinsav festékkel festettük. Az élő sejtek számával arányos fluoreszcencia kontrollhoz viszonyított arányát vetettük össze a DXR koncentrációval. Az endothelsejtek igen magas apoptózis aránya miatt 48 h-nál hosszabb ideig nem tudtuk a DXR kezelést folytatni. A daganatos sejtvonal, a HeLa sokkal kevésbé volt érzékeny és hosszabb DXR kezelés is kivitelezhető volt. Megjegyzendő továbbá, hogy a DXR elhanyagolhatóan alacsony fluoreszcens jelet bocsát ki a detektálásra használt 485 nm gerjesztési és 535 nm emissziós hullámhosszon-en, ezért nem befolyásolta a SYBR-Green vizsgálatot. A fél halálos dózist (LD50) a két értékelés összevetéséből számítottuk ki, a kezeletlen sejtek koncentráció grádiensének (10 000 – 1000 sejt) standard görbéje segítségével.

3.2.3. SuperArray vizsgálat

A SuperArray teszthez (SABiosciences, Frederick, MD, USA, GEArray Q Series, Human Cardiovascular Diseases I: HS037 kit) a sejteket TRI® reagensben (Sigma) homogenizáltuk és tároltuk. Kloroformos extrakció után a teljes RNS tartalmú vizes fázist NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) rendszerrel tisztítottuk. 4 µg totál RNS-ből kiindulva oligo d(T)23 primer hozzáadásával és Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim, Germany, Cat. No. 1-093-070) beépítésével az mRNS szálakat jelölt komplementerekké szintetizáltattuk M-MLV reverz transzkriptáz

enzimmel (Promega, Madison, USA). A jelzett cDNS-t egy éjszakán át hibridizáltuk 60 °C-on, folyamatos keverés mellett (5-10 rpm, Roller-Blot Hybridiser-en) HB-3D (TECHNEInc., Burlington NJ, USA) GEArray® Q Series Human Cardiovascular Disease I: Biomarkers (Cat.: HS-037) membránon. A hibridizálódott, jelölt molekulákat mosásokat követően dt-reptanidin-alkalikus foszfatáz konjugátummal felismertettük, majd az enzimatikus vég segítségével kemilumineszcens jeleket generáltattunk. A kemilumineszcenciát ChemiImager 8900 (Alpha Innotech, San Leandro CA, USA) készülékkel detektáltuk. A kemilumineszcens adatokat Genesis 1.5.0 szoftver (TUG, Graz, Austria) segítségével elemeztük. Az mRNS szinteket a belső standardként használt GAPDH gén kifejeződésének arányában fejeztük ki.
A használt SuperArray technikát TNFα-val kezelt HUVEC sejteken teszteltük, és az irodalmi adatoknak megfelelően az IL-8, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 és E-Selectin mRNS-k szignifikáns emelkedését találtuk.[113]

3.2.4. Real-time qPCR vizsgálat

Mivel korábbi vizsgálataink során kutyán bizonyítottuk, hogy az ET-1 fehérje szintje jól korrelál az ET-1 mRNS expressziójával, ebben a kísérletsorozatban elsődlegesen az ET-1 mRNS expresszióját vizsgáltuk és fehérjemeghatározást csak kontrollként alkalmaztunk. A LightCycler analízishez az RNS-t a fent leírt módon izoláltuk. Az RNS–cDNS transzkripcióhoz M-MLV Reverse Transcriptase-t (Promega. Madison, USA) használtunk. A cDNS quantifikációjához LightCycler FastStartDNA Master SYBR Green I kitet (Roche) alkalmaztunk LightCycler® 1.5 (Roche) készüléken. A β-actin és a GAPDH gén specifikus primereket a publikált cDNS szekvenciák alapján szintetizáltattuk.[114, 115]
Az alábbi szekvenciákat használtuk:
β-actin: 5′-ggcatcctcaccctgaagta-3′, 5′-ggggtgttgaaggtctcaaa-3′
gapdh: 5′-tgaaccatgagaagtatgacaaca-3′, 5′-agtccttccacgataccaaa-3′
et-1: 5′-gagaaacccactcccagtcc-3′, 5′-gatgtccaggtggcagaagt-3′

A GAPDH-val párhuzamosan a β-actin mRNS expresszióját is meghatároztuk. A β-actin és a GAPDH expresszió hányadosa minden mintában állandó volt, ezért mindkettő

alkalmas volt belső standardnak. Mi a GAPDH-t választottuk housekeeping génnek, hogy a mérések összevethetőek legyenek a SA mérésekkel, ahol a gyártó által alkalmazott rendszerek is ezt a gént használják.
Az általunk alkalmazott qPCR metodika további validálására pozitív kontrollként HeLa sejteket alkalmaztunk, mivel ezen sejtek ismerten fokozott ET-1 mRNS expresszióval válaszolnak a DXR hatásra.[116]

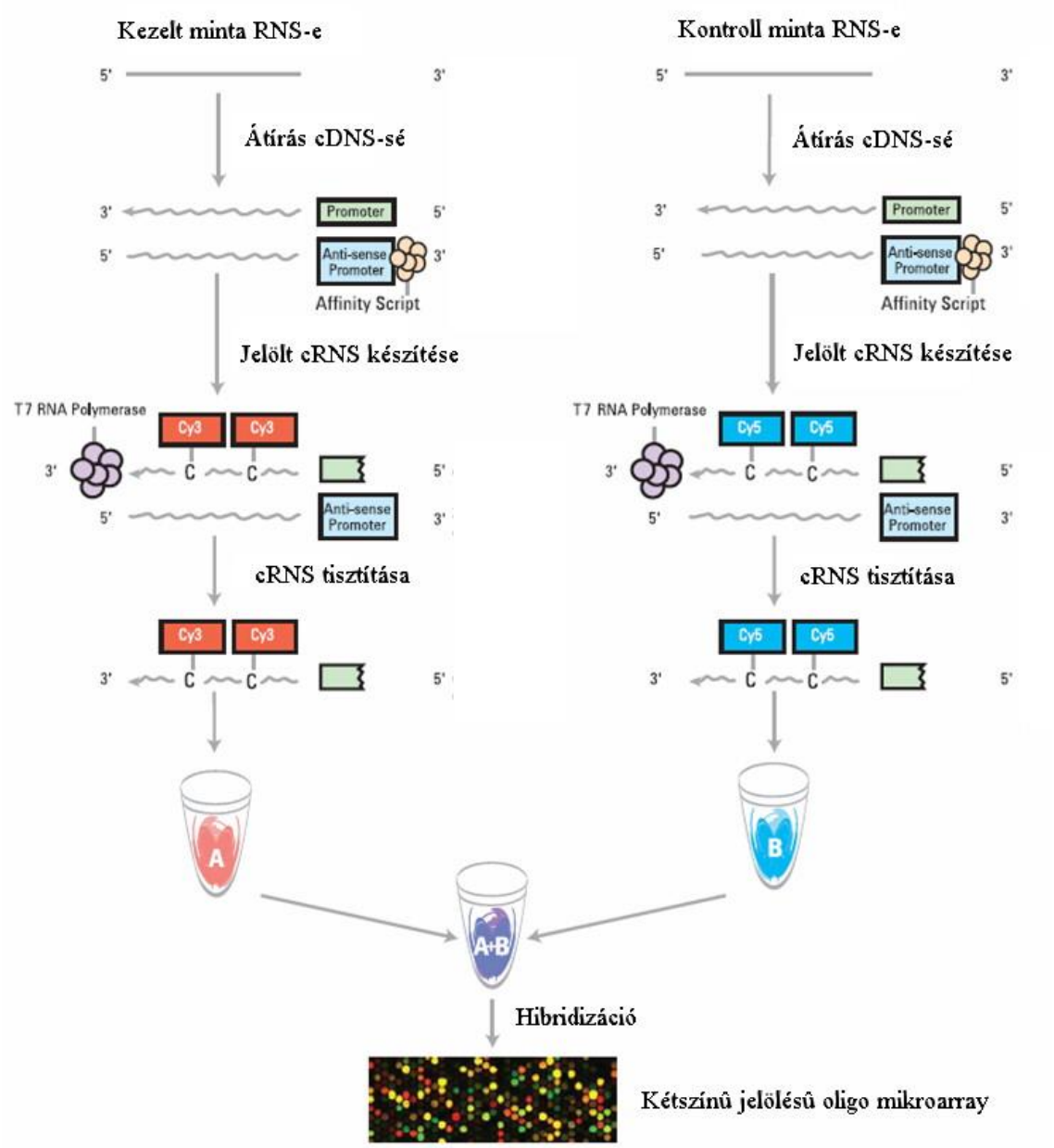
3.2.5. Microarray vizsgálatok

A DXR endothelsejtekre kifejtett hatásának szélesebb körű vizsgálatára microarray technikával a teljes genetikai állomány expressziós profilját határoztuk meg.

3.2.5.1. Agilent GE microarray

200 ng teljes RNS-hez hozzáadtuk a megfelelően higított és a majdani jelöléssel kompatibilis Spike oldatot. T7 promoter primer segítségével cRNS-t készítettünk, cDNS Master Mix hozzáadásával, 40°C-on 2 órán keresztül temperáltuk. A két óra elteltével 15 percre 70°C-ra melegítettük az oldatot, hogy inaktiváljuk az enzimet. A visszahűtött oldathoz Transcription Master Mixet adva 2 órán keresztül 40°C-on megjelöltük a keletkező cRNS szakaszokat Cy-3 és Cy-5 fluoreszcens festékekkel. A maradék festék eltávolítására Qiagen's Rneasy mini spin rendszerét használtuk. A tisztított és jelölt mintánk cRNS tartalmát Nanodrop készülékkel mértük. Ha a jelölés mértéke és a reakciók kitermelése elégséges, akkor a G4858A Human V1 8x60K arrayre szükséges 600 ng jelölt cRNS-t 60°C-on 30 percig fragmentáltuk, majd hűtés után 1:1 arányban elegyítettük a 2x-es töménységű GEx Hybridization Buffer HI-RPM oldattal. 40-40 mikroliter elegyet pipettáztunk a lemez megfelelő részeibe és a lemezt 65°C-on 17 órán keresztül 10 fordulat/perc sebességgel forgattuk. Másnap 0,005% Triton X-102 tartalmú mosó folyadékban 37°C-on kétszer egy percig mostuk, majd a megszáradt lemezt az Agilent C Scannerben az AgilentHD_GX_2Color profillal letapogattattuk *(7. ábra)*. A kapott képfile-t az Agilent Feature Extraction program segítségével adatfile-ra konvertáltattuk, majd az Agilent GeneSpring GX 11.5.1 program segítségével statisztikai és ortologiai kiértékelést hajtottunk végre.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

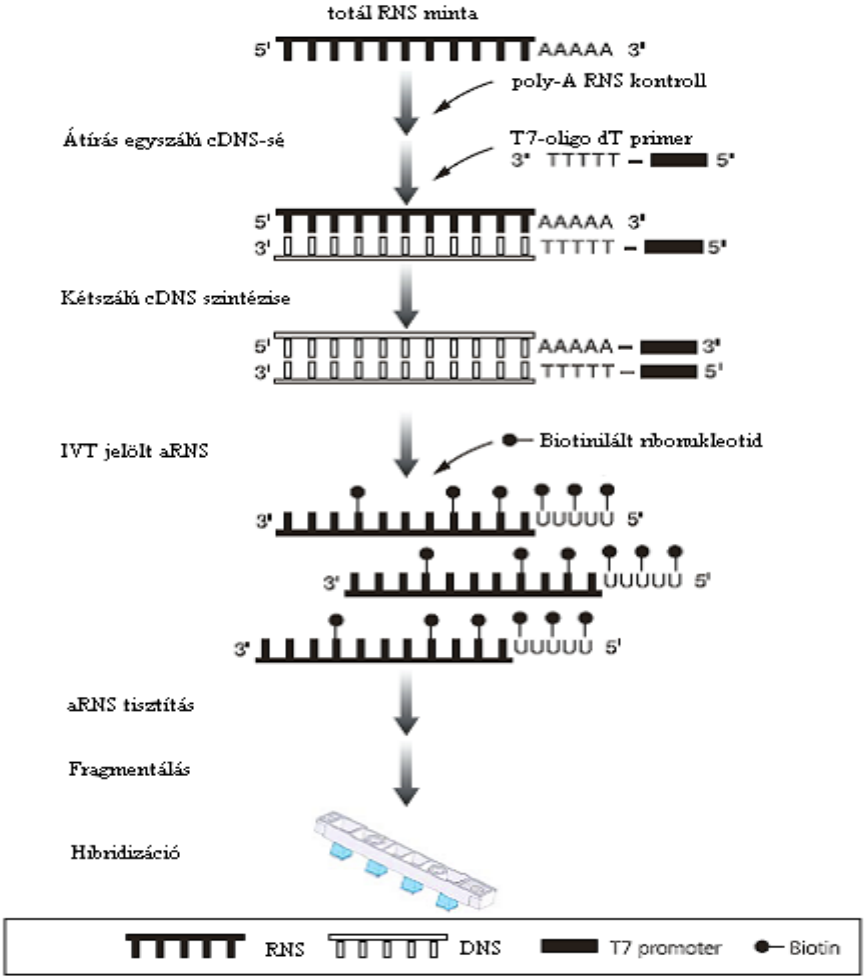


7. ábra Agilent GE Microarray technika folyamatának sematikus ábrázolása (Agilent GE Microarray használati utasítás)

3.2.5.2. Affymetrix DNS chip

A jelölt aRNS oldat készítéséhez GeneAtlas 3' IVT Express Kit-et használtunk. 500 ng totál RNS-hez hozzáadtuk a poly-A-RNS kontrol oldatot. T7 promoter primer segítségével cRNS-t készítettünk. 42°C-on 2 órán keresztül temperáltuk. A visszahűtött oldathoz

Second-strand Master Mixet adva 1 órán keresztül inkubáltuk 16°C-on, hogy kétszálú cDNS-t kapjunk. IVT Master Mix segítségével Biotin jelölt aRNS készítettünk 4 órai inkubálással 40°C-on. A Kit tartalmazta RNS kötő mágneses gyöngyök segítségével a jelölt aRNS szálakat kitisztítottuk. Nanodrop készülékkel mértük. 10µg Biotin jelölt aRNS-t 94°C-on 35 percig fragmentáltuk, majd hűtés után 7,5 µg aRNS-nek megfelelő fragmentált jelölt anyagot elegyítettünk hybridizációs koktéllal. 150-150 µl elegyet pipettáztunk a lemeztartó megfelelő részeibe és az Affymetrix® Human Genome U133 Array Strip chipeket 45°C-on 16 órán keresztül inkubáltuk. Másnap a GeneAtlas™ Fluidics Station segítségével a chipeket megtisztítottuk a felesleges nem hibridizált anyagoktól, majd a chipeken a biotin molekulákhoz kapcsoltunk lumineszcens jelet adó enzimet *(8. ábra)*. A GeneAtlas™ Imaging station detektáló rendszerrel képet készíttettünk a lumineszcens chip felszínről. A képfile-t a Partek program alakította adatfile-á. A kapott adatfile-on az Agilent GeneSpring GX 11.5.1 program segítségével statisztikai és ortologiai kiértékelést hajtottunk végre.



8. ábra. Affymetrix DNS chip technika folyamatának sematikus ábrázolása (Affymetrix GeneAtlas használati utasítás)

3.2.6. ET-1 ELISA

Az mRNS eredmények (SA és qPCR) kontrolljaként az ET-1 termelődését kereskedelmi forgalomban kapható big-ET-1 sandwich ELISA (Biomedica Group GmbH, Vienna, Austria) technikával ellenőriztük. (A big ET-1 koncentrációja arányos az ET-1-gyel, bár a big-ET-1 életideje hosszabb.) A big ET-1 ELISA keresztreaktivitása a humán ET-1/2/3-mal ill. a big ET-2-vel kisebb, mint 1%. A sejteket az LD50-nél kisebb DXR dózisokkal kezeltük 24 h-n át. Ahhoz, hogy detektálható mennyiségű ET-1 termelődjön, a sejteknek hosszabb időre van szükségük, ezért választottuk a 24 h-s kezelési időtartamot. Az ilyen időtartamban alkalmazott magasabb (600, 1000 ng/ml) DXR dózisok viszont a sejtek teljes pusztulását eredményezték volna, ezért kellett a fehérje vizsgálatához alacsonyabb DXR dózisokat alkalmazni. A felülúszót begyűjtöttük és azonnal lefagyasztottuk −80 °C-ra. Az ELISA vizsgálatot a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

3.3. Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag ± SEM formátumban tüntettük fel, kivéve az ET-1 mRNS szöveti szinteket, melyeket a megfelelő kontroll arányában fejeztük ki. A statisztikai analízishez a GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com) szoftver segítségével Student's t teszt ill. ANOVA módszereket alkalmaztunk (lináris trend poszt-tesztet alkalmazva dózisfüggés esetén). A különbségeket $p<0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

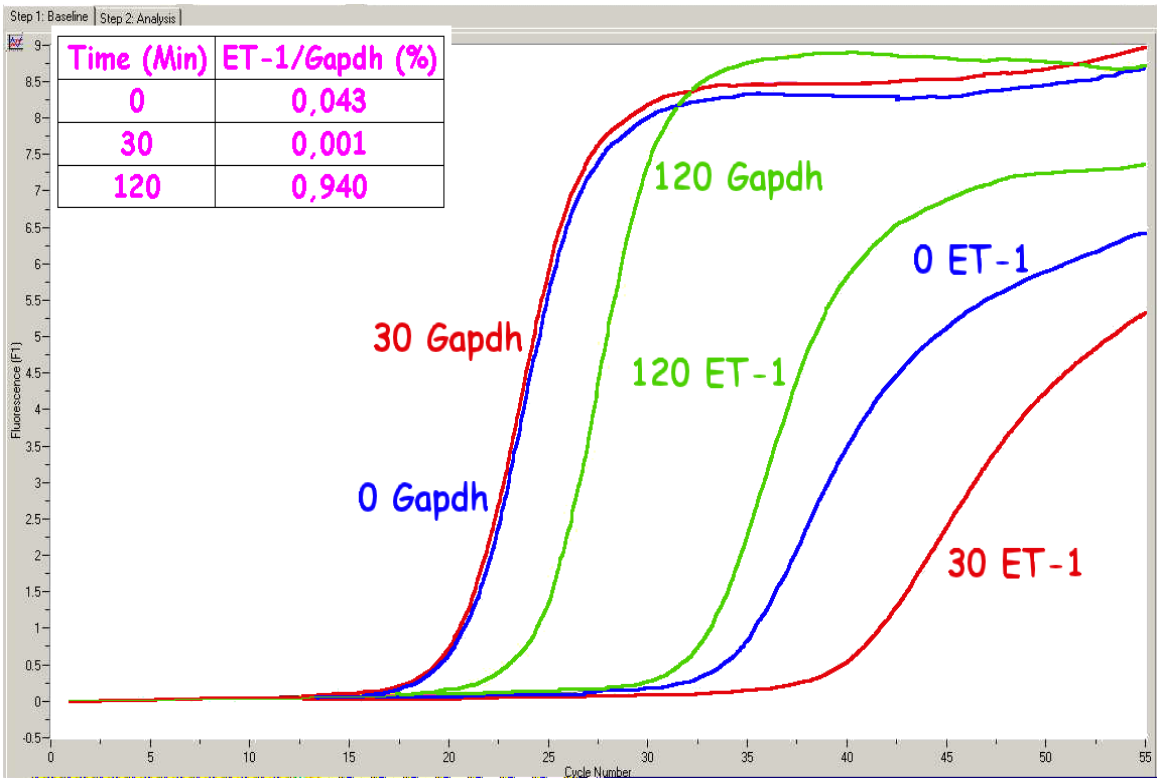
4. EREDMÉNYEK

4.1. Kutyaszív ischaemia/reperfúzió modell

Az állatok vérnyomása kiinduláskor 111,5 ± 11 Hgmm, a kísérlet végén 99 ± 11 Hgmm volt (p=ns). A bal kamrai ischaemiás és az összizomtömeg aránya 28 ±6,6 % volt.

Az általunk vizsgált kutyákban nem fordult elő ritmuszavar, de a MAPD90 (monofázisos akciópotenciál időtartama 90%-os repolarizációnál) az ischaemia alatt rövidült, a reperfúzió során pedig megnyúlt.[61]

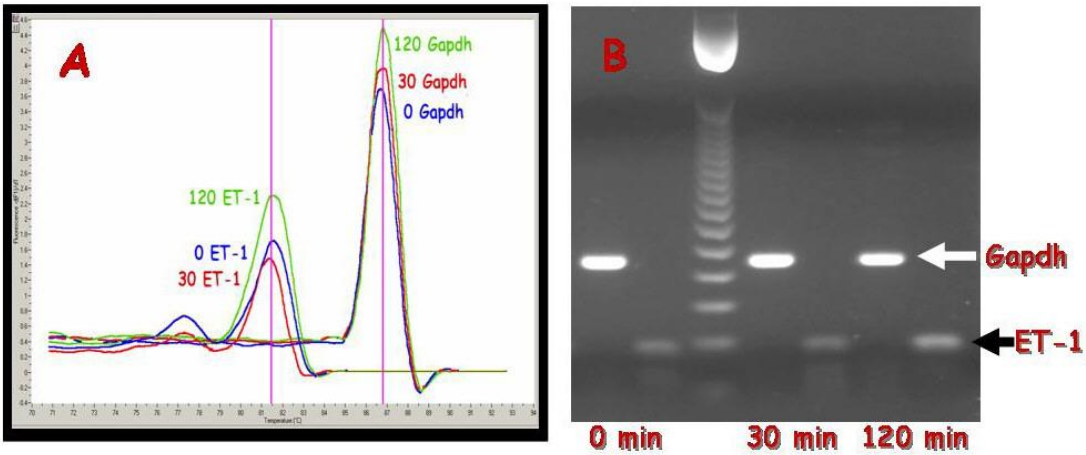
A *9-11. ábrán* ugyanazon kutyából származó mintákból végzett RT-PCR, immunprecipitáció és Western blot vizsgálatok eredményeit mutatjuk be. A *9. ábrán* a miokardiális ET-1 mRNS mennyiségi meghatározása látható.



9. ábra. Miokardiális preproendothelin-1 mRNS mennyiségi meghatározása RT-PCR módszerrel. CP érték meghatározás Light Cycler készüléken. A CP értékből számolható a termék mennyisége a belső standard százalékában. A vízszintes tengelyen a PCR reakció ciklusszáma, a függőleges tengelyen a fluoreszcencia mértéke került feltüntetésre. 0: kiindulási érték, 30: 30 perc ischaemia után, 120: 30 perc ischaemia + 90 perc reperfúzió után, Gapdh: belső standard.

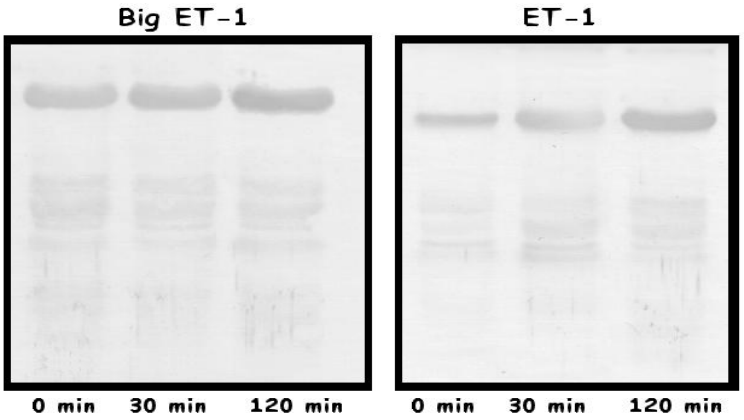
DOI:10.14753/SE.2012.1740

A PCR termék olvadáspont görbéje adja a mérés ellenőrzését *(10A ábra)*, míg az agaróz gél elektroforézissel molekulasúly alapján tudjuk azonosítani a terméket *(10B ábra)*. Az azonosítás szekvenálással is megtörtént.



10. ábra. A) A PCR termék azonosítása olvadáspont görbe (melting curve) felvételével. (Az egyes termékek olvadáspontja specifikus, az ábrán jól látszik, hogy az összes endothelin mRNS azonos hőmérsékleten mutatja a csúcsot, és ez különbözik a Gapdh-tól.) B) A PCR termék igazolása agaróz gél elektroforézissel. (A futtatás során a PCR termékek molekulatömeg szerint válnak szét és ennek alapján azonosíthatók.) Gapdh= belső standard

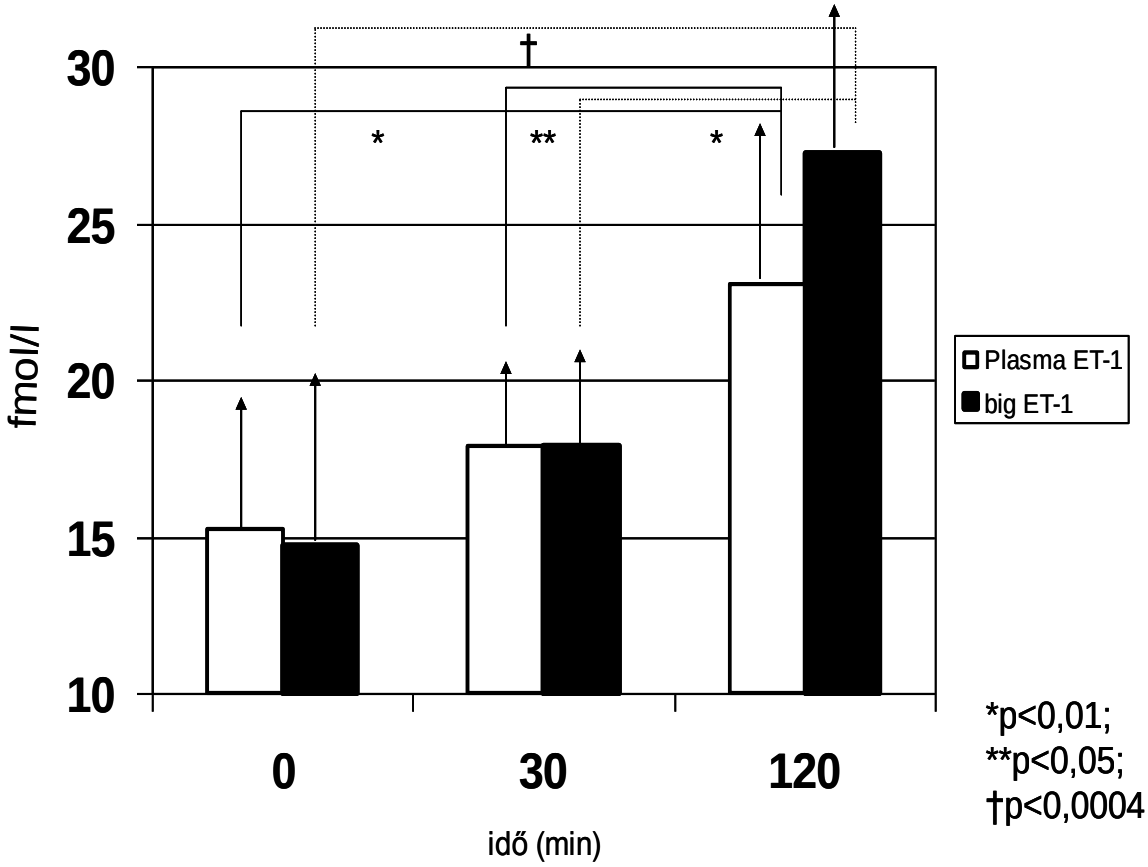
A plazma ET-1 és big ET-1 szintek meghatározására használt immunprecipitáció és -blot módszer segítségével a meghatározni kívánt termék jól és pontosan azonosítható *(11. ábra)*.



11. ábra. Sinus coronarius plazma ET-1 és bigET-1 immunoblot (0 min = kiindulás, 30 min = 30 perc ischaemia után, 120 minrc = 30 perc ischaemia + 90 perc reperfúzió után)

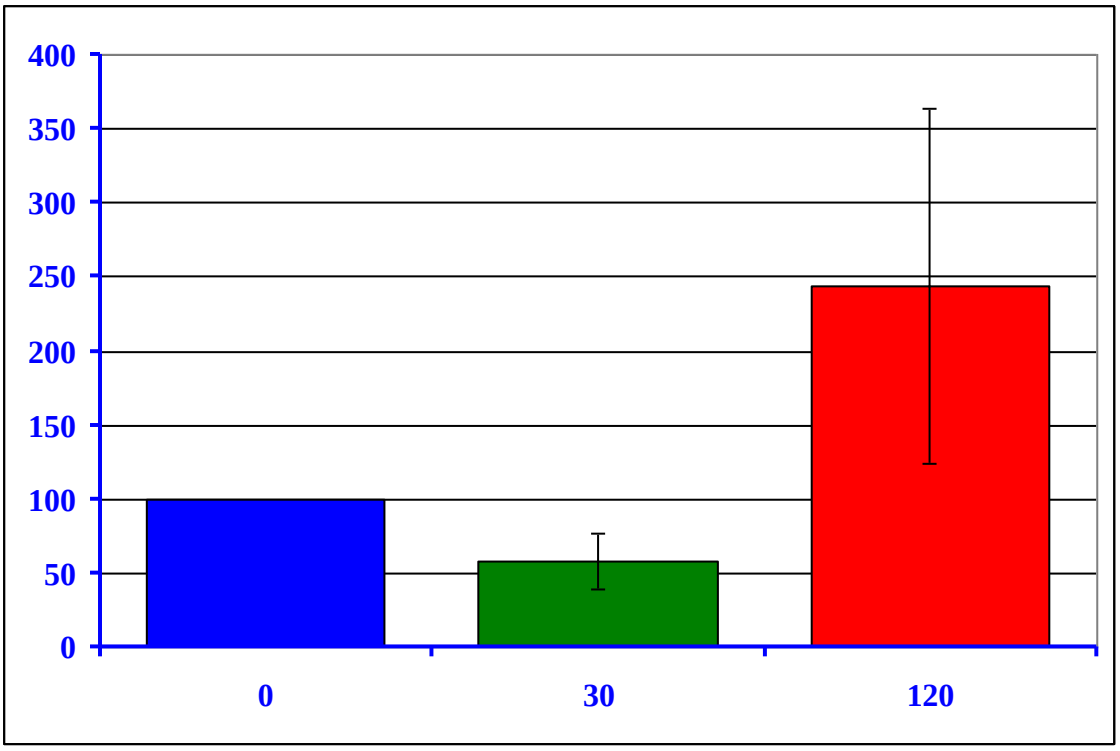
Ischaemia alatt a plazma ET-1 és big ET-1 szint nem változott szignifikáns mértékben. Az ET-1 gén expresszió a szívizomban ischaemia során 57,8 %-kal csökkent a

kiindulási értékhez képest. Reperfúzió alatt szignifikáns emelkedést észleltünk a plazma ET-1 értékekben mind a kiinduláshoz, mind a 30 perces ischaemiához képest. A big ET-1 is hasonlóan változott. A fentiekkel párhuzamosan az ET-1 mRNS szint növekedését is észleltük (az ischaemiás érték 322 %-ára, ill. a kiindulási érték 244 %-ára) *(12-13. ábra).*



12. ábra. Sinus coronarius plazma ET-1 és big ET-1 koncentrációk a LAD lekötése előtt (0), 30 perc ischaemia után (30) és 90 perc reperfúziót követően (120) (ANOVA statisztikai módszer, posztteszt analízissel)

DOI:10.14753/SE.2012.1740



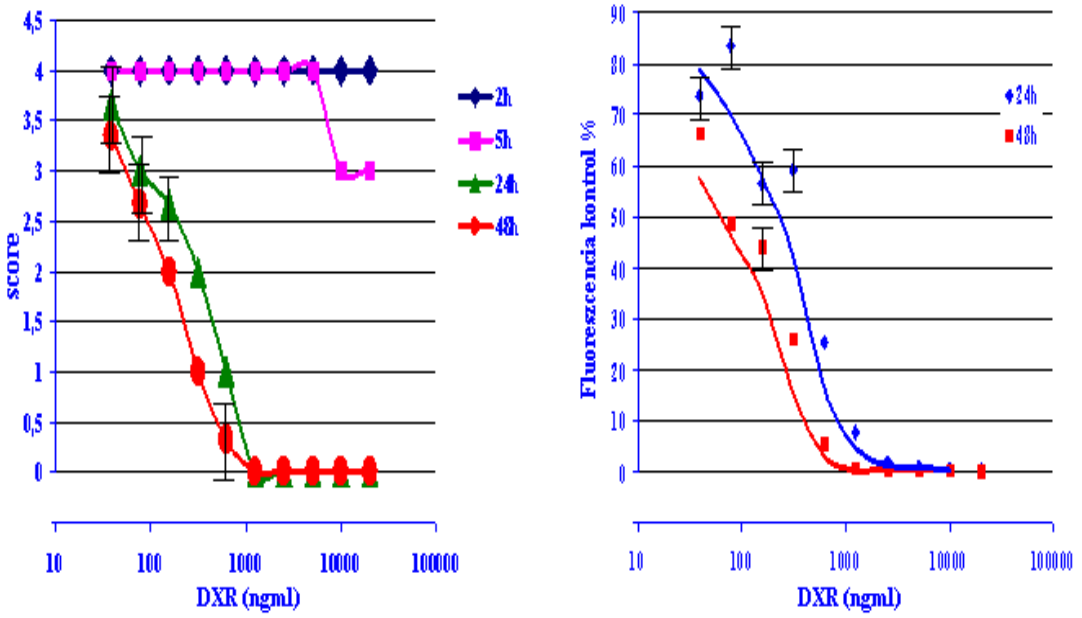
13. ábra. ProET-1mRNS szint a LAD lekötése előtt (0), 30 perc ischaemia után (30) és 90 perc reperfúziót követően (120) A proET-1 mRNS változása a belső standard Gapdh-hoz viszonyítva.

4.2. Endothelsejtkultúra

4.2.1. A DXR toxicitása endothelsejteken

A DXR citotoxicitásának meghatározásakor kétféle módszert alkalmaztunk. A morfológiai módszer során minden mintát gyakorlott vizsgáló értékelt és az átlagos túlélési score-t (0 - 4) vetettük össze a DXR koncentrációval. A másik módszer során az élő sejtek számával arányos fluoreszcenciát mértük és a viabilitást sejtszám kalibráció segítségével számoltuk. A félmaximális citotoxikus koncentráció (LD50) az endothelsejtek esetében 150 ng/ml volt 48 h, 300 ng/ml volt 24 h és több mint 10000 ng/ml volt 6 h kezelés során *(14. ábra)*. Tekintettel arra, hogy az onkológiai betegek kezelési protokolljában nagy intravénás dózisokat alkalmaznak, és a DXR csúcs plazma koncentrációja rövid időre az 1000 ng/ml koncentrációt is eléri,[117] kísérleteink során az endothelsejteket 6 h-án át 1000 ng/ml DXR-rel kezeltük.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

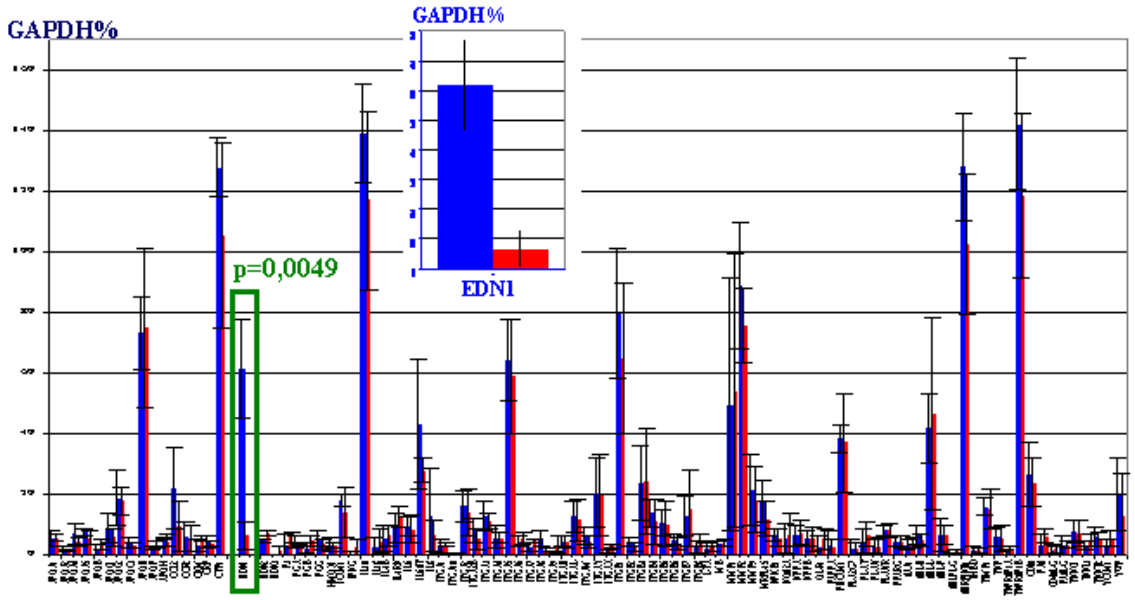


14. ábra. A doxorubicin (DXR) citotoxikus hatása endothelsejteken. 3 azonos, független mérés egy-egy jellegzetes eredményét tüntettük fel. Vízszintes tengelyen a DXR koncentrációk, függőleges tengelyen A) a túlélési pontszám (survival score), B) az élő sejtek számával arányos fluoreszcencia a kontroll százalékában.

4.2.2. DXR hatása az endothelsejtek mRNS expressziós mintázatára

Az endothelsejtek DXR indukálta gén expressziós mintázatát egy cDNS array-vel (SA) szűrtük, mely a kardiovaszkuláris rendszerre jellemző számos kardiovaszkuláris betegség által befolyásolt gént tartalmazott. A 96, az array-n szereplő reprezentatív kardiovaszkuláris gén közül csak az ET-1 mRNS expressziója változott meg szignifikáns módon a DXR kezelés hatására *(15. ábra).* Ugyanebben a kísérleti elrendezésben pozitív kontrollként használtuk a TNFα-t, mely - ismert módon - számos adhéziós molekula és citokin mRNS expresszióját indukálta. (nem bemutatott adatok).

DOI:10.14753/SE.2012.1740



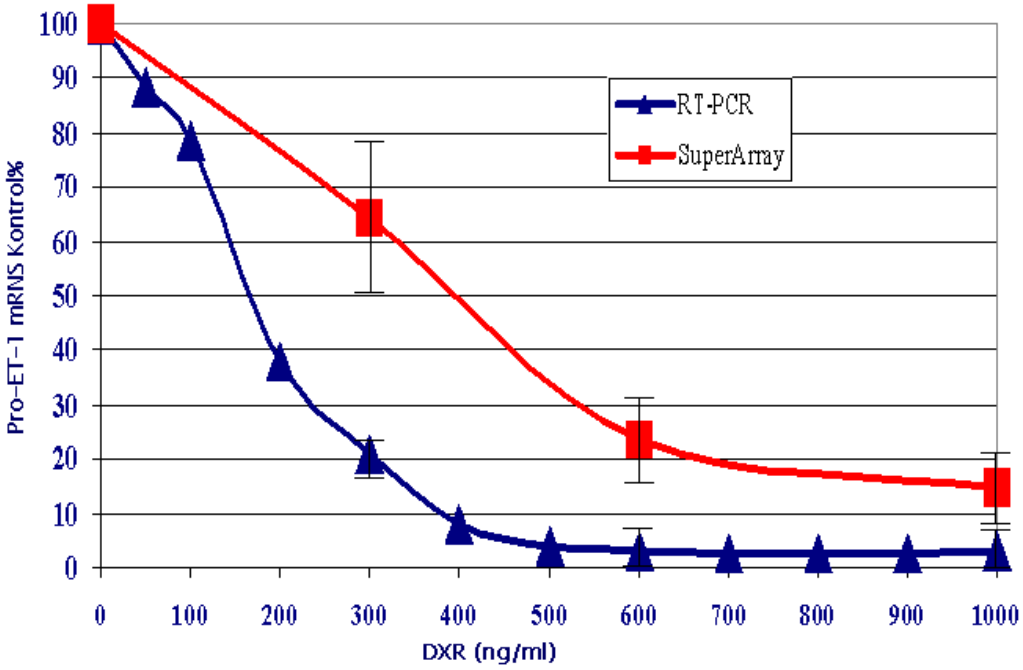
15. ábra DXR-rel kezelt endothelsejtek gén expressziós profilja.

*96, a kardiovaszkuláris rendszerben ismerten szerepet játszó gén (HS037 SuperArray kit, Human Cardiovascular Diseases I) expressziós mintázatát mutatjuk 6 órás 1000 ng/ml DXR kezelést követően humán köldökvéna endothelsejteken (HUVEC). A gén expressziós értékeket a GAPDH expresszió arányában tüntettük fel. Három független mérés átlagát ± SEM ábrázoltuk. ** p<0,01*

4.2.3. ET-1 mRNS expresszió DXR-rel kezelt endothelsejteken

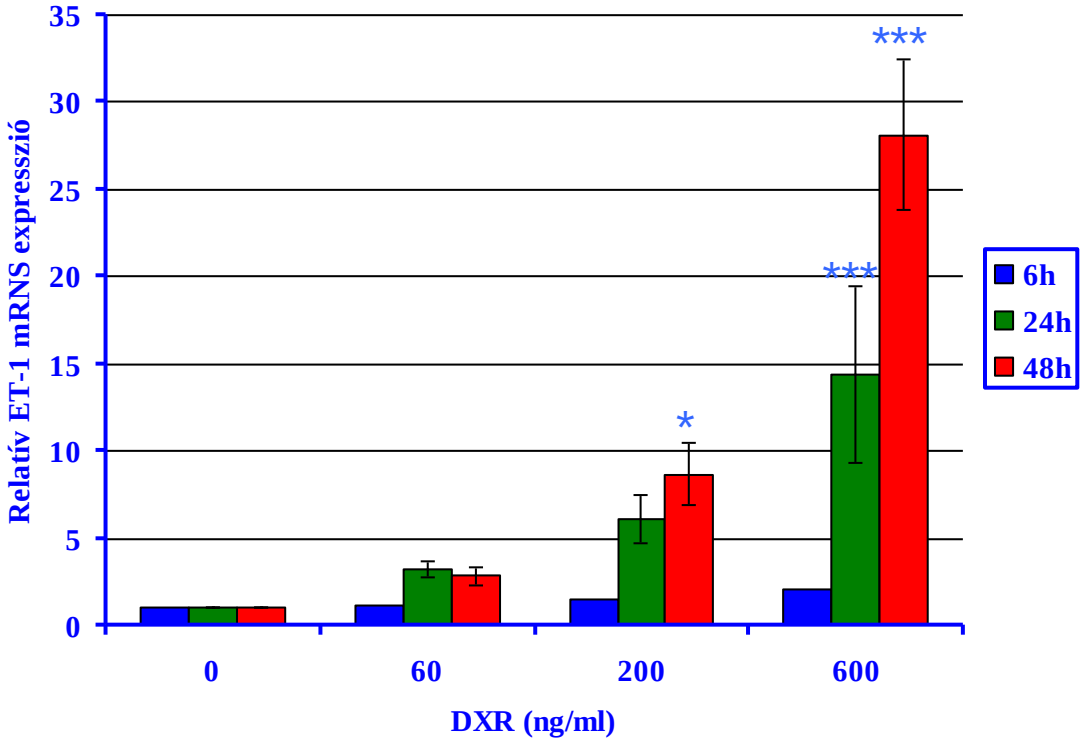
Az SA kísérlet során az ET-1 mRNS expresszió 6 órás DXR kezelést (1000 ng/ml) követően a kezeletlen kontroll endothelsejtek expressziójának 10,9%-a volt (p=0,0049). Azért választottuk ezt a relatíve rövid (6 h) inkubációs időt, hogy a DXR-nek az endothelsejtekre kifejtett direkt hatásait tudjuk vizsgálni. Az SA során kapott eredmények validálására egy következő kísérletben az endothelsejteket különböző dózisú DXR-rel (300, 600 és 1000 ng/ml) kezeltük és 6 h kezelést követően az ET-1 mRNS expresszióját real-time qPCR módszerrel határoztuk meg. Az ET-1 mRNS gén expresszió dózisfüggő és az SA során kapott eredményhez nagyon hasonló volt *(16. ábra)*. Mindazonáltal, a qPCR-nek az SA-val szembeni nagyobb érzékenysége miatt az ET-1 mRNS sokkal jelentősebb szupresszióját találtuk: az 1000 ng/ml DXR-rel kezelt endothelsejtekben a kontrollhoz képest az ET-1 mRNS expressziója csak 2,41% volt (p=0,0022). Az ET-1 mRNS expressziója szignifikánsan és dózisfüggő módon csökkent DXR kezelés hatására *(16. ábra)*.

DOI:10.14753/SE.2012.1740



16. ábra DXR-rel kezelt endothelsejtek ET-1 mRNS expressziója
Az endothelsejteket különböző DXR dózisokkal kezeltük 6 órán keresztül. Superarray és qPCR vizsgálatokat végeztünk 0, 300, 600 és 1000 ng/ml koncentrációjú DXR kezelést követően. Relatív endothelin-1 (ET-1) mRNS expressziókat tüntettünk fel a kezeletlen minták százalékában. Három független mérés átlagát ± SEM ábrázoltuk.

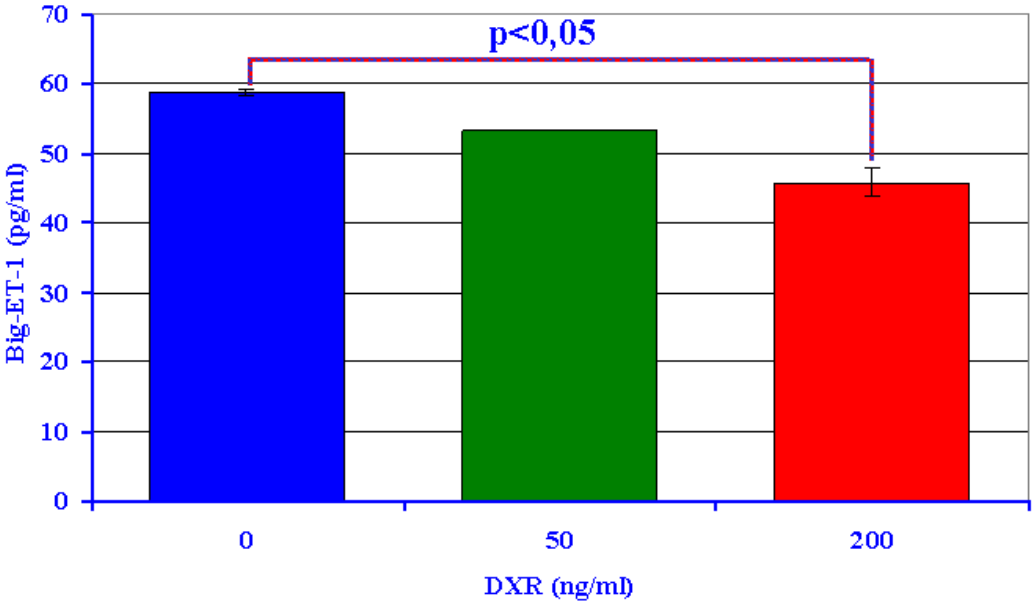
Az irodalomban nem ismert, hogy az endothelsejtek ET-1 expressziója miként változik meg az LD50-nél kisebb DXR kezelés hatására. A mi eredményeinkkel ellentétben más sejttípusokat (humán HeLa, patkány szívizomsejt, egér HL-1) alkalmazó vizsgálatok dózis dependens ET-1 indukcióról számolnak be.[116] Metodikánk validálásaként, ugyanolyan körülmények között HeLa sejteket kezeltünk DXR-rel. Az alkalmazott dózissal és a kezelési idővel arányos ET-1 mRNS indukciót találtunk *(17. ábra).*



17. ábra DXR-rel kezelt HeLa sejtek ET-1 mRNS expressziója
*A HeLa sejteket különböző DXR dózisokkal kezeltük 6, 24 és 48 órán keresztül. Az mRNS expressziót qPCR módszerrel határoztuk meg. Az ET-1 mRNS expresszió idő- és dózisfüggő változásait két utas ANOVA teszttel számítottuk ki. Három független mérés átlagát ± SEM ábrázoltuk. * p<0,05, *** p<0,001*

4.2.4. A DXR kezelés hatása az ET-1 expresszióra fehérjeszinten

Az ET-1 expresszióját quantitatívan és pontosan meg lehet határozni az mRNS szintjén. Az ET-1 esetében, a kutyán végzett kísérletünk alapján, az mRNS és a fehérjeszintű meghatározás korrelál, de a hatásért mégis a fehérje a felelős, ezért ennek vizsgálatát is elvégeztük a génszintű eredmények validálása érdekében. Kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével határoztuk meg a big ET-1 fehérje koncentrációkat. Az endothelsejteket az LD50-nél kisebb DXR dózisokkal (50 ill. 200 ng/ml) kezeltük, 24 óra inkubálást követően a felülúszót összegyűjtöttük és elvégeztük az ELISA meghatározást. A DXR kezelés szignifikánsan csökkentette a big ET-1 fehérje szekrécióját (p=0,0101) *(18. ábra).*



*18. ábra Big endothelin-1 (big-ET-1) termelődés DXR-rel kezelt endothelsejtekben. Az endothelsejteket az LD50-nél kisebb DXR koncentrációjú DXR-rel kezeltük 24 órán keresztül. A felülúszó big-ET-1 koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. A kezeletlen kontroll és a DXR-rel kezelt minták közötti különbséget egy utas ANOVA teszttel értékeltük. Három független mérés átlagát ± SEM ábrázoltuk. * p<0,05*

4.2.5. DXR kezelés hatása az endothelsejt genomjára - Microarray eredmények kiértékelése

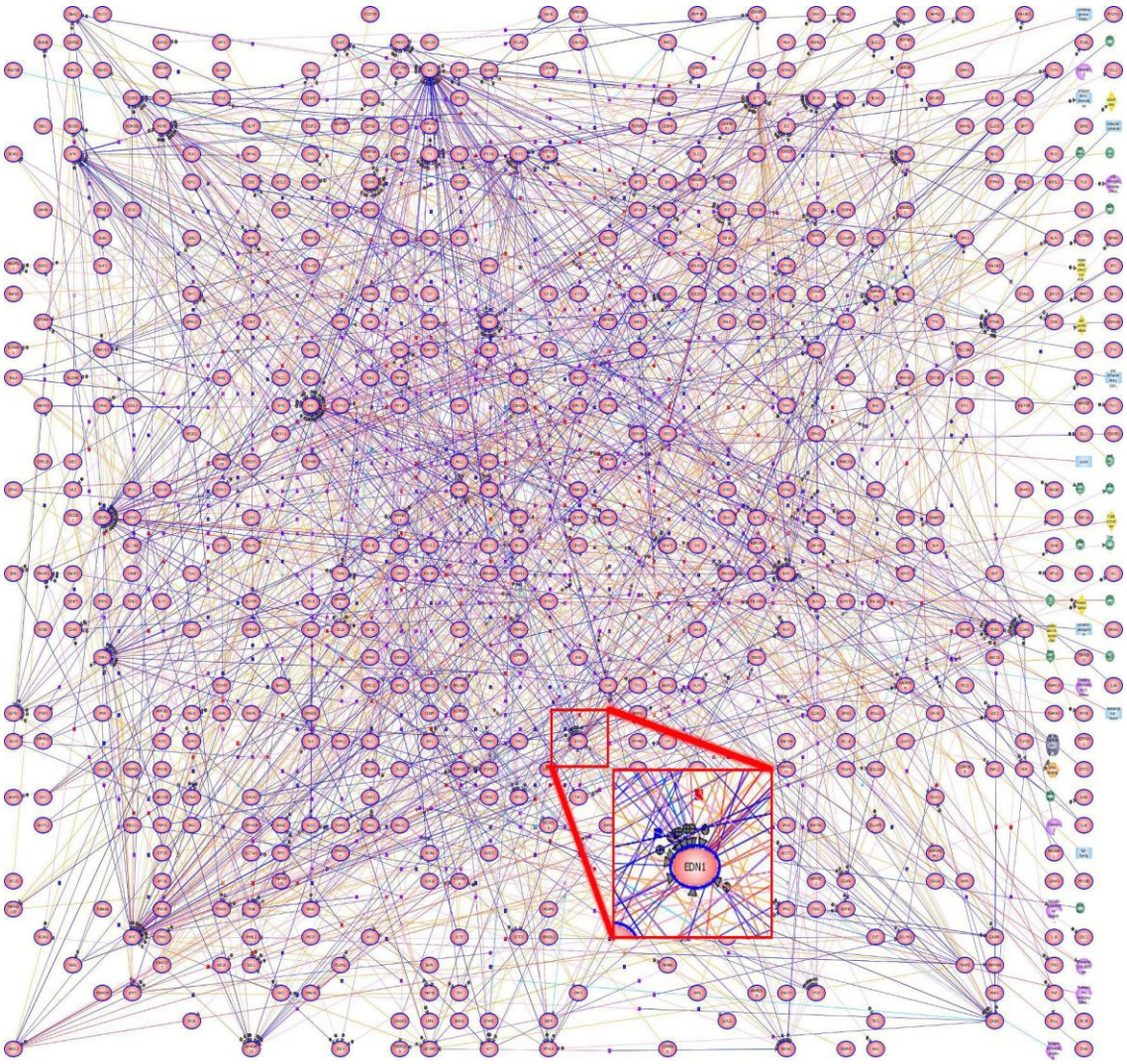
A fenti eredmények alapján már nem csak az ET-1-t magát, hanem az ET-1–t szabályozó valamint az ET-1 által szabályozott gének hálózatát, és ezen géneknek a DXR-re adott reakcióját kívántuk feltérképezni. Ennek érdekében a teljes genom expressziós mintázatát vizsgálni képes microarray módszert választottunk (Agilent). Az irodalomban a microarray-k validálására qPCR módszert használnak. A mi esetünkben többszáz gén expresszió változását figyeltük meg, mindegyik mRNS-re külön qPCR végzése nem volt lehetséges, ezért egy más technológiai bázisra épülő microarray-vel (Affymetrix) igazoltuk az eredményeinket.

HUVEC sejteket 300, 600 ill. 1000 ng/mL DXR-rel kezeltük, majd 6 óra elteltével a sejtekből totál RNS-t preparáltunk, és az Agilent ill. Affimetrix gyári protokolljának

DOI:10.14753/SE.2012.1740

megfelelően megmértük a génexpresszió változást ~25000 gén esetében. Az adat file-okban kapott normalizált intenzitás értékekből a Genespring program segítségével leválogattattuk azokat, melyek a kontrollhoz képest bármely koncentrációjú DXR kezelés hatására legalább kétszeres expressziós szintváltozást mutattak.

A fent említett legalább kétszeres expresszióváltozást mutató géneket tartalmazó adatbázison lefuttattunk egy *pathway* analízist, mely a jelenleg ismert irodalmi adatok alapján teremt kapcsolatot az egyes gének között *(19. ábra)*.



19. ábra. A pathway *analízis grafikai megjelenítése*

A főbb csomópontokat adó géneket és azok irodalmilag ismert kapcsolatainak számát az *1. táblázatban* foglaltuk össze. Az ET-1 génkapcsolatai az ötödik legtöbb kapcsolattal rendelkező csomópontot rajzolták ki a rendszerben.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

Gén	Kapcsolatok	Gén	Kapcsolatok
FOS	88	MDM2	28
IL6	71	VCAM1	23
MYC	69	CEBPB	22
VEGFA	43	F3	20
EDN1	*34*	SSTR1	16
FAS	34	FOXO1	10
EGR1	31	GATA2	8
CEBPA	28		

1. táblázat. A legtöbb kapcsolattal rendelkező csomóponti gének és kapcsolataik száma

A csomóponti analízis azonban nem veszi figyelembe a dózisfüggést, ezért a kétszeres expresszióváltozást mutató géneket tovább szelektáltuk és kiemeltük azokat, melyek a DXR kezelés hatására koncentrációfüggő változást mutattak. További kritériumként csak azokat a géneket vettük figyelembe, ahol a 300 és 600 illetve a 600 és 1000 μg/ml kezelések közötti változás átlagosan legalább 50%-os volt mindkét array-ben (Agilent és Affimetrix). Ezt a háromlépéses szűkítést elvégezve 24 csökkenő és 24 emelkedő expressziójú gént találtunk *(2A és 2B táblázat)*.

A SA-vel kapott eredményekkel való összehasonlításban 5 olyan, a SA-n is szereplő gént találtunk (IL6, ITGA9, SELP, SELPLG, THBD), melyek mutatnak legalább kétszeres változást a microarray rendszerekben is. Azonban ezek egyike sem mutat koncentráció függést. Az IL6 (11%) és a SELP (8%) kivételével a jel intenzitásuk 5 GAPDH% alatti és egyik sem mutatott szignifikáns változást a SA-n.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

Agilent					**Affymetrix**			
Csökkenés	DXR konc*				***Csökkenés***	DXR konc*		
	300	600	1000			300	600	1000
ADNP	-1,917	-2,763	-4,964		ADNP	-1,578	-2,488	-4,640
ANKRD50	-4,311	-5,426	-14,344		ANKRD50	-2,790	-3,366	-7,683
BCL10	-2,636	-3,761	-7,699		BCL10	-1,603	-3,085	-5,667
CYR61	-1,604	-3,627	-6,002		CYR61	-1,350	-2,394	-3,366
DKK1	-1,225	-1,827	-3,562		DKK1	-1,069	-1,349	-2,379
DNAJC14	-1,236	-2,154	-2,862		DNAJC14	-1,162	-1,984	-2,598
EDN1	**-1,995**	**-3,665**	**-6,404**		**EDN1**	**-1,530**	**-2,560**	**-3,952**
FOXO1	-1,061	-2,068	-3,069		FOXO1	-1,365	-2,189	-4,269
GRRP1	-1,293	-1,440	-2,753		GRRP1	-1,076	-1,219	-2,890
KIT	-2,333	-5,334	-11,002		KIT	-1,959	-4,461	-7,600
KLF6	-2,337	-3,270	-6,544		KLF6	-1,718	-2,399	-4,288
LPAR6	-1,608	-1,787	-4,080		LPAR6	-1,589	-1,779	-3,797
MOBKL2A	-1,115	-1,819	-2,583		MOBKL2A	-1,154	-1,509	-3,008
NFKBIZ	-1,305	-3,924	-11,940		NFKBIZ	-2,549	-2,856	-5,962
NLK	-1,354	-1,713	-3,138		NLK	-1,522	-1,927	-3,395
NUDT4	-3,566	-4,981	-10,574		NUDT4///NUDT4P1	-1,735	-3,009	-4,911
PDE4B	-1,394	-3,524	-6,621		PDE4B	-1,522	-2,654	-4,537
RHOB	-1,851	-2,721	-6,166		RHOB	-1,340	-1,921	-4,075
SLC38A2	-3,206	-4,195	-11,020		SLC38A2	-2,542	-3,593	-6,060
TMCC3	-2,209	-3,789	-5,476		TMCC3	-2,689	-4,707	-7,491
VEZF1	-1,077	-2,158	-3,742		VEZF1	-1,660	-2,528	-4,340
ZBTB38	-3,231	-3,268	-7,713		ZBTB38	-2,595	-3,244	-5,739
ZNF184	-2,029	-3,250	-8,694		ZNF184	-1,577	-1,708	-3,453
ZNF323	-1,132	-2,039	-3,403		ZNF323	-1,144	-1,433	-2,741

*2A. táblázat DXR kezelés hatására kialakult legalább 50%-os koncentrációfüggő expressziócsökkenést mutató gének *Relatív gén expresszió változás, a kontroll és a kezelt minta belső sztenderdekre normalizált denzitásértékeinek aránya 300, 600 és 1000 μg/ml koncentrációjú DXR-rel 6 h-át kezelt HUVEC sejtekben. A könnyebb érthetőség kedvéért negatív előjellel jelöltük a csökkenést.*

DOI:10.14753/SE.2012.1740

Agilent	DXR konc*				**Affymetrix**	DXR konc*		
	300	600	1000			300	600	1000
ASF1B	2,002	2,877	4,804		ASF1B	1,452	2,200	3,531
BAMBI	2,190	3,162	5,260		BAMBI	2,847	3,363	6,893
CDKN2C	1,265	2,293	3,692		CDKN2C	1,048	1,511	2,767
CEBPA	6,742	10,859	21,350		CEBPA	1,206	3,091	8,474
CEBPB	1,727	2,692	4,221		CEBPB	1,480	2,133	3,449
EGR1	1,490	2,292	5,175		EGR1	1,449	1,705	4,441
EGR2	3,187	7,370	28,234		EGR2	1,102	1,262	5,562
FOS	3,223	4,679	12,324		FOS	1,479	2,008	3,912
FZD7	1,481	2,336	10,672		FZD7	1,481	2,250	5,515
HIST2H2AA4	1,936	3,036	6,149		HIST2H2AA3///HIST2H2AA4	1,641	2,658	4,408
ID2	2,515	6,626	14,287		ID2///ID2B	2,482	5,615	14,017
MSX1	1,639	3,372	5,629		MSX1	1,724	2,796	4,738
NANOS1	2,777	8,552	16,659		NANOS1	1,259	2,059	4,402
NPTX2	2,158	2,735	5,201		NPTX2	1,187	1,393	2,577
PDZRN3	1,556	3,152	8,161		PDZRN3	1,530	2,135	4,156
PTHLH	1,637	2,526	4,789		PTHLH	1,413	1,466	2,970
SDC4	2,760	3,804	7,680		SDC4	1,616	2,756	5,085
SHISA2	1,223	2,437	5,785		SHISA2	2,139	2,808	5,027
SMAD5OS	3,131	5,506	12,459		SMAD5OS	1,353	2,129	4,329
SSTR1	2,284	3,642	6,123		SSTR1	1,832	2,509	4,159
TMEM158	1,871	3,201	4,796		TMEM158	2,212	3,005	5,225
VASN	2,484	4,318	10,870		VASN	1,121	1,724	3,517
VEGFA	1,494	2,800	4,194		VEGFA	1,085	1,366	2,513
ZNF425	2,484	4,916	11,441		ZNF425	1,950	2,967	7,145

*2B. táblázat DXR kezelés hatására kialakult legalább 50%-os koncentrációfüggő expressziónövekedést mutató gének * Relatív gén expresszió változás, a kezelt és a kontroll minta belső sztenderdekre normalizált denzitásértékeinek aránya 300, 600 és 1000 μg/ml koncentrációjú DXR-rel 6 h-át kezelt HUVEC sejtekben*

DOI:10.14753/SE.2012.1740

A csomóponti analízisből az ET-1-gyel kapcsolatban álló géneket összegyűjtöttük. Az adott gének termékei és az ET-1 között irodalomban leírt interakciókat elemeztük a *3. táblázatban*, pirossal kiemelve a kísérleteink során DXR kezelésre koncentrációfüggő változást mutató géneket (ld. *2A és 2B táblázat*).

Kapcsolódó géntermékek			hatás
EDN1	→	PLAT	-
EDN1	→	ARF6	+
EDN1	→	CTGF	+
EDN1	→	CXCR7	±
EDN1	→	EGR1	+
EDN1	→	FOS	±
EDN1	→	FOXO1	+
EDN1	→	MYC	+
EDN1	→	POMC	+
EDN1	→	PTGS2	+
EDN1	→	PTK2	+
EDN1	→	SSTR1	±
EDN1	→	SYT1	±
EDN1	→	VEGFA	±
EDN1	→	BCAR3	-
EDN1	→	CREB1	-
EDN1	→	IL6	±
EDN1	→	MYC	-
EDN1	→	RAG1AP1	-
EDN1	→	VCAM1	±

Kapcsolódó géntermékek			Hatás
BCAR3	→	EDN1	-
DES	→	EDN1	+
EGR1	→	EDN1	-
FGF2	→	EDN1	+
FOS	→	EDN1	±
GATA2	→	EDN1	±
IL6	→	EDN1	±
MYC	→	EDN1	-
NDC80	→	EDN1	+
PGF	→	EDN1	±
POMC	→	EDN1	±
PTHLH	→	EDN1	-
SYT1	→	EDN1	+
VEGFA	→	EDN1	+
VEZF1	→	EDN1	±

*3. táblázat Az ET-1 gén ismert kapcsolatai közül a DXR kezelésre aktivitást mutató útvonalak *A nyilak a hatás irányát jelölik. +: termelődés növekedés; -: termelődés csökkenés; ±: mind növekedés, mind csökkenés előfordulhat. Pirossal jelöltük a DXR kezelésre koncentrációfüggő változást mutató géneket.*

Az ET-1 a vizsgált gének között az egyik legtöbb csomóponttal rendelkező gén, ami önmagában is arra utal, hogy az ET rendszer érintett a DXR által. Ezt tovább erősíti, hogy a vele hálózati kapcsolattal rendelkező gének közül 7 hasonló koncentrációfüggő expressziós változást mutatott, mint maga az ET-1.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

5. MEGBESZÉLÉS

Az endothelinek az 1988-as első leírás óta hatalmas karriert futottak be, nagy tudományos érdeklődést keltettek mind az alapkutatásban, mind a klinikumban. A legtöbbet vizsgált peptid, az ET-1 több mint 20000 tudományos közlemény tárgya volt. Az ET-1 története egyedülálló, hiszen a fehérje szekvencia első leírását követően 4 éven belül a receptorok szekvenciái és már ezek antagonistái is ismertek voltak. Mára az ET-1 receptor blokkoló kezelés pl. pulmonális hypertoniában világszerte rendelkezésre áll. Klinikai vizsgálatok vannak folyamatban rezisztens hypertonia, proteinuriával járó vesebetegségek, daganatos betegségek és immunbetegségek területén.[118]

Ennek az igen erős vazokonstriktor peptidnek kezdetektől fogva keresték a szerepét a különböző kardiovaszkuláris kórfolyamatokban. Munkánk első részében egy kísérletes ischaemia/reperfúziós modellen vizsgáltuk az ET-1 gén expresszióját és termelődését.

Kifejlesztettünk egy RT-PCR módszert az ET-1 mRNS termelődés pontos meghatározására. Specifikus primereket terveztünk, a módszert a PCR termék méretének és olvadáspontjának azonosításával, valamint szekvencia analízissel igazoltuk.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az ET-1 és big ET-1 szintek ischaemia során kismértékben, reperfúzió során szignifikánsan növekedtek. Az ET-1 mRNS gén expresszió ischaemia alatt csökkent, reperfúzió során pedig növekedett.

Miokardiális infarktusban és más ischaemiás kórképekben, mint pl. postischaemiás veseelégtelenségben vagy ischaemiás stroke-ban a plazma ET-1 szint emelkedését mutatták ki.[119-121]A plazma ET-1 szint emelkedését írták le patkány és kutya miokardiális ischaemia/reperfúziós modellekben is.[68, 122] Ischaemia során a szívizomsejtek fokozott ET-1 termelését írták le, míg hasonló reakció nem volt tapasztalható az ischaemiának kitett vaszkuláris endothel és simaizomsejtekben, sertésen végzett kísérletekben.[122] Az emelkedett ET-1 szint kedvezőtlen a koronária keringésre a vazokontriktor, sejtproliferatív hatása miatt.

Az ET-1 szintek gyors emelkedése a reperfúzió kezdetén arra utal, hogy a mért ET-1 és big ET-1 nem származhat csak fokozott gén expresszió hatására létrejövő új szintézisből. Ezt támasztja alá a gén expresszió alacsony szintje is. Egyes feltevések szerint ischaemia alatt a sejtekből ET-1 szabadul ki, de ezt csak reperfúzió alatt, a

kimosás hatására észleljük. A plazma ET-1 és big ET-1 szintek növekedése a szekréciónak az intraluminális oldal felé való áttevődéséből is adódhat. A kibocsátási arányok változása válasz lehet az ismert ischaemiás endothelkárosodásra. Az ET-1-nek szerepet tulajdonítanak a miokardiális infarktus akut szakában a károsodás stabilizálásában és a hegképződés elősegítésében. Ez az eredendően pozitív és a gyógyulást segítő folyamat azonban az ischaemia kiváltotta egyéb változások (angiotenzin II emelkedés, oxidatív stressz) miatt túlzottá, károssá válhat és a tartósan magas ET-1 szint szerepet játszhat az ischaemiás cardiomyopathia kialakulásában.

Másik kísérletsorozatunkban korábbi humán vizsgálatainkból kiindulva a DXR direkt hatását vizsgáltuk az ET-1 és egyéb, a kardiovaszkuláris betegségekben érintett gének expressziójára endothelsejtekben. A DXR szívizomsejtekre gyakorolt káros hatását széleskörben tanulmányozták.[97] Kísérletsorozatunkban azért alkalmaztunk endothelsejteket, mert ez a hatalmas felületű "szerv" találkozik először a daganatos betegségek kemoterápiája során intravénásan alkalmazott DXR-rel. Egyre növekvő számú adat áll rendelkezésre az endothelialis cytotoxicitásra vonatkozóan, melyekhez jól illeszkednek a mi eredményeink is.[101, 123, 124] A vaszkuláris endothelium toxikus károsodása egyre nagyobb érdeklődésre tart számot, hiszen a legújabb kutatások szerint a tumor sejteknek is ép endothelre van szükségük a növekedéshez és proliferációhoz.[98]

Elsőként a DXR LD_{50} értékét határoztuk meg endothelsejteken. Megállapítottuk, hogy alacsony koncentrációjú (a betegekben általában előforduló csúcs plazma koncentrációnál alacsonyabb) DXR is jelentős citotoxicitást okozott.
Kilencvenhat kardiovaszkuláris betegségekhez kapcsolható gén expressziójának változását vizsgáltuk meg subletalis dózisú DXR kezelést követően. A 96 vizsgált gén közül csak az ET-1 mRNS expressziója változott szignifikáns mértékben. Az ET-1 gén expressziójának csökkenését qPCR módszerrel is igazoltuk. Azt is kimutattuk, hogy a változás endothelsejt specifikus, mivel az ugyanolyan kísérleti felállásban kezelt HeLa sejtekben a DXR kezelés hatására az ET-1 mRNS expresszió fokozódott. Ez utóbbi eredményünk egyezést mutat más szerzők eredményeivel és pozitív módszertani kontrollnak tekinthető.[116] Az mRNS szint változása mellett szignifikáns bigET-1 fehérje szintézis csökkenést is kimutattunk.

A Human Cardiovascular Diseases I SuperArray-ben olyan gének szerepelnek, melyekről ismert, hogy az endothelsejtek szabályozó folyamataiban vesznek részt (pl. gyulladásos, proliferatív, pro- vagy antithrombotikus). Számos citokin és adhéziós molekula könnyen indukálható gyulladást fokozó faktorokkal, pl. a TNFα–val. A metalloproteázoknak, extracellularis mátrixfehérjéknek és növekedési faktoroknak jelentős szerepük van az atherosclerosis folyamatában. A thrombospondin, a PAI-1, a P-Selectin és a COX-1/2 mind fontos szabályozói a véralvadásnak és thrombusképződésnek, míg a SOD1/2 –et az oxidatív stressz szabályozójaként ismerjük. Az értónus fenntartásában van szerepe az ET-1/2/3, a NOS és a COX-1/2 fehérjéknek. Érdekes módon a fenti gének expressziója – az ET-1 kivételével – nem mutatott koncentrációfüggő változást a kísérletünkben, ami a DXR-nek a speciálisan az endothelialis ET-1-re kifejtett hatását hangsúlyozza. A DXR-nek a vizsgált 96 génre kifejtett hatásai kevéssé ismertek. *Abou El Hassan és munkatársai* az E-Selectin és a VCAM-1 expressziójának indukcióját találták endothelsejtek DXR kezelésekor.[125] A fenti fehérjék meghatározása 24 h kezelést követően történt, ez azonban nincs ellentmondásban a mi vizsgálatainkkal, melynek során rövidebb behatás után, de az mRNS szinten vizsgáltuk a DXR hatását. Azért használtunk rövid kezelési időket, hogy elkerüljük a gén expressziót befolyásoló másodlagos hatásokat (pl. ROS képződés).

Az ET-1 stimulálja a sejtek migrációját, az inváziós képességet, a neovaszkularizációt és elősegíti a tumor proliferációt.[85] Emellett számos vizsgálat beszámolt az ET-1 anti-apoptotikus hatásáról szívizomsejtekben[126], fibroblasztokon [127] és endothel sejeken.[128] Az ET-1 szint akut esése csökkentheti az anti-apoptotikus hatást. Endothelsejteken végzett saját vizsgálataink során kimutattuk, hogy rövid ideig tartó DXR kezelés dózisfüggő módon gátolja az ET-1 mRNS expresszióját. *Mostafa és munkatársai*[129] patkány érmodellen alkalmazott relatíve alacsony DXR dózis mellett szintén kimutatták az ET-1 mRNS szupresszióját. Mindazonáltal számos vizsgálatban mutattak ki emelkedett ET-1 mRNS expressziót DXR-rel hosszan kezelt állati (patkány, egér) szívizomsejteken.[116, 130, 131] Fiziológiás körülmények között az ET-1 fő forrása az endothelium, de kisebb mértékben a szívizomsejtek is termelnek ET-1-et, ami a két sejttípus eltérő szabályozó mechanizmusaira enged következtetni. Ezen kívül, különbségként kell megjegyezni, hogy a fent idézett kísérletekben a szívizomsejteket

24-48 órán át kezelték, amikor a DXR másodlagos hatásai már nem elhanyagolhatóak. Másik lehetséges magyarázat a különbségekre a sejttípusban keresendő; mi humán endothelsejtekkel dolgoztunk, míg a többi kísérletben patkány ill. egér szívizomsejteket alkalmaztak. A DXR-rel kezelt patkányok ill. egerek plazma ET-1 szintje is emelkedett volt[116, 132, 133], míg a humán vizsgálatokban a plazmaszint vagy csökkent vagy nem változott, ami az ET-1 expressziójának eltérő szabályozására utal a különböző fajokban.

Kísérleteink során a DXR eltérő ET-1 gén expresszióra kifejtett hatásait tapasztaltuk endothelsejteken és a HeLa sejtvonalon. Eredményeinkhez hasonlóan, *Bien és munkatársai* is az ET-1 mRNS fokozott expresszióját találták a HeLa sejtekben.[116] Bár mind az endothel, mind a HeLa sejtek termelnek ET-1-et, a transzkripció szabályozása eltérő lehet. Az endothelsejtek általában a GATA-2 transzkripciós faktort használják az ET-1 promoter helyének A régiójában és az AP-1-et a B régióban.[134, 135] A HeLa sejtekben az ET-1 transzkripció szabályozásáról kevés információ áll rendelkezésre. Az azonban ismert, hogy a HeLa sejtek elsősorban a GATA-6 faktort használják és sokkal kevésbé a GATA-2-t és a GATA-3-t.[136]

Az aktív ET-1 fehérje létrejöttéhez a sejtben számos szabályozó folyamatra van szükség, úgymint a transzkripció, mRNS stabilizáció, transzláció, kibocsájtás (folyamatos kibocsátás és kibocsátás a Weibel-Palade testekből) és a big ET-1-ből való hasítás.[13, 137] Az első, kutyákon végzett kísérletsorozatunkban összefüggést mutattunk ki az ET-1 transzlációja és kibocsátása között. [138] Ezzel összhangban az endothelsejteken végzett kísérletekben is mind az mRNS, mind a fehérje szinten azonos irányú változásokat tapasztaltunk. A DXR szignifikánsan csökkentette a bigET-1 szintet, bár a változás nem volt olyan kifejezett, mint mRNS szinten. Ezt az ET-1 fehérje szintézisének fent említett komplex szabályozása vagy intracellularis raktár jelenléte magyarázhatja.

Az előzőekben részletezett eredmények alapján a DXR-nak az endothelsejt teljes genomjára kifejtett hatását vizsgáltuk microarray technikával. A több ezer génről szerzett adatokból kiszűrtük azokat, melyek jelentős, koncentrációfüggő változást mutattak a DXR kezelésre. Az ET-1 mRNS ezen mérések során is szignifikáns

koncentrációfüggő csökkenést mutatott. A genom analízis során nemcsak az ET-1, de a vele kapcsolatban álló gének hálózatát is feltérképeztük. A DXR kezelés hatására expresszióváltozást mutató gének közül az ET-1 az egyik legtöbb kapcsolattal rendelkezik, mely alapján feltételezhető, hogy az ET-1 rendszernek (az ET-1-t szabályozó és az ET-1 által szabályozott fehérjéknek) központi szerepe van az endothelsejteknek a DXR kezelésre adott válaszában.

Kísérleteink nem adnak választ a DXR hatás pontos pathomechanizmusára, azonban a feltérképezett kapcsolatok további in vitro vizsgálata segíthet ennek jobb megértésében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutya ischaemia/reperfúziós modellben kifejlesztettünk egy RT-PCR módszert az ET-1 mRNS termelődés pontos meghatározására. A párhuzamosan elvégzett ET-1 és big ET-1 meghatározások az ischaemia ill. a reperfúzió során végbemenő folyamatok jobb megismerésére adtak lehetőséget. Az ischaemiás szívizomszövet ET-1 mRNS gén expressziója csökkent, ami a lebomlás és a hipoxiás sejtek csökkent anyagcseréjének következménye lehet. Az észlelt kismértékű ET-1 és big ET-1 plazmaszint növekedés az ép sejtekből származhat. A gén expresszió fokozódása az ischemiát követő reperfúzió után gyors fehérjeszintézisre utal, amely részben hozzájárul a reperfúzió során észlelt big ET-1 és ET-1 plazmaszintek növekedéséhez. Ez utóbbi összefüggésben lehet a reperfúziós aritmiák kialakulásával, illetve az akut miokardiális infarktus egyéb szövődményeivel.

Az endothelsejteken végzett kísérletekben kilencvenhat, kardiovaszkuláris betegségekhez kapcsolható gén expressziójának változását vizsgáltuk meg subletalis dózisú DXR kezelést követően. Kimutattuk, hogy rövid ideig tartó DXR kezelés dózisfüggő módon gátolja az ET-1 mRNS expresszióját. A 96 vizsgált gén közül csak az ET-1 mRNS expressziója változott dózisfüggően és szignifikáns mértékben. Az endothelsejtben az ET-1-et szabályozó valamint az ET-1 által szabályozott gének hálózatát és ezen géneknek a DXR kezelésre adott reakcióját is feltérképeztük a teljes genom expressziós mintázatát vizsgálni képes micoarray módszer segítségével. A DXR kezelés hatására expresszióváltozást mutató gének közül az ET-1 az egyik legtöbb kapcsolattal rendelkezik, mely alapján feltételezhető, hogy az ET-1 rendszernek központi szerepe van az endothelsejteknek a DXR kezelésre adott válaszában. A kemoterápia során alkalmazott magas DXR koncentráció direkt kardiotoxikus hatását tovább növelheti a DXR hatására bekövetkező kezdeti ET-1 termelés csökkenés, ami apoptózisra való nagyobb fogékonyságot jelent.
Kísérleteink során az ET-1 rendszer központi szerepét igazoltuk mind a kutya szívizomsejtek ischaemiára adott válaszában, mind a humán endothelsejtek DXR kezelésre adott reakciójában.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során munkacsoportunk korábbi, DXR-rel kezelt limfómás betegekből származó eredményei nyomán az ET-1 szerepét kívántuk direkt módon vizsgálni szívizomsejteken. Ehhez kutyában kialakított ischaemia/reperfúzió modellt használtunk. Kidolgoztunk egy RT-PCR módszert az ET-1 mRNS termelődés pontos meghatározására. Az ischaemiás szívizomszövet ET-1 mRNS gén expressziója csökkent (57,8 %-kal a kiindulási értékhez képest), ami a lebomlás és a hipoxiás sejtek csökkent anyagcseréjének következménye lehet. A reperfúzió végén tapasztalt génexpresszió fokozódás (az ischaemiás érték 322 %-ára, ill. a kiindulási érték 244 %-ára) gyors fehérjeszintézisre utal, amely részben hozzájárul a reperfúzió során észlelt big ET-1 és ET-1 plazmaszintek növekedéséhez. Ez utóbbi összefüggésben lehet a reperfúziós aritmiák kialakulásával, illetve az akut miokardiális infarktus egyéb szövődményeivel. A DXR kardiovaszkuláris hatásainak további vizsgálatára endothelsejteken (HUVEC) végeztünk kísérleteket. 96 kardiovaszkuláris betegségekhez kapcsolható gén expressziójának változását vizsgáltuk meg subletalis dózisú DXR kezelést követően. Kimutattuk, hogy rövid ideig tartó DXR kezelés dózisfüggő módon gátolja az ET-1 mRNS expresszióját. A vizsgált gének közül csak az ET-1 mRNS expressziója változott dózisfüggően és szignifikáns mértékben. Mind az mRNS, mind a fehérjeszinten azonos irányú változásokat tapasztaltunk. A DXR szignifikánsan csökkentette a bigET-1 szintet. Az endothelsejtben az ET-1–t szabályozó valamint az ET-1 által szabályozott gének hálózatát és ezen géneknek a DXR kezelésre adott reakcióját is feltérképeztük a teljes genom expressziós mintázatát vizsgálni képes micoarray módszer segítségével. A DXR kezelés hatására expresszióváltozást mutató gének közül az ET-1 az egyik legtöbb kapcsolattal rendelkezik. Az előbbiek alapján feltételezhető, hogy az ET-1 rendszernek központi szerepe van az endothelsejteknek a DXR kezelésre adott válaszában, és a kutya modellben tapasztaltak alapján a szívizomsejtek ischaemiára adott reakciójában is. A fentiek vizsgálatára részletesebb, a patomehanizmust érintő kísérletek elvégzése lenne szükséges az ET-1-gyel kapcsolatban, mely által érthetővé válna az ET-1 kardiovaszkuláris rendszerben betöltött, a vérnyomás szabályozásán túlmutató szabályozó szerepe is, valamint lehetőség nyílna az endothelin-rendszer gátlásának kifinomultabb alkalmazására.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

SUMMARY

Upon our previous results from lymphoma patients treated with DXR we wanted to investigate the role of ET-1 on cardiomyocytes. We used an in vivo canine heart ischaemia/reperfusion model. We developed a RT-PCR protocol for quantification of the ET-1 mRNA. The decrease of ET-1 mRNA during ischaemia (57,8 % of the baseline) may be due to degradation and decreased metabolism in the hypoxic cells locally. The elevation of the ET-1 mRNA level during reperfusion (322 % of the ischaemic and 244 % of the baseline) indicates rapid big ET-1 synthesis. This was confirmed by the increases in big ET-1 and ET-1 plasma levels. This latter can be associated with the generation of reperfusion arrhythmias or other complications of acute myocardial infarction. For further investigation of the cardiovascular effects of DXR we conducted in vitro experiments on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Expression of 96 representative genes of cardiovascular importance were assayed by qPCR and Superarray techniques after short sublethal DXR treatment. It was shown that DXR supresses the ET-1 gene expression in a dose dependent manner. Out of the 96 genes only ET-1 gene expression has changed significantly. In the experiments on HUVEC ET-1 mRNA and protein changes were concordant; DXR treatment decreased bigET-1 protein level, too. Network of genes regulating ET-1 and genes regulated by ET-1 were mapped in endothelial cells by microarray technique, which can scan the expression pattern of the whole genome. Out of the genes showing expression changes for DXR treatment, ET-1 is one of those which has the most relations with other genes. Presumably the ET-1 system plays a central role in the reaction to DXR treatment in HUVEC and upon the canine experiments results, in the reaction to ischaemia in cardiomyocytes. For detailed investigation of the pathomechanism further experiments are needed with ET-1, which would clarify the role of ET-1 in the cardiovascular system beyond blood pressure regulation and would help to tailor the blockade of the endothelin system.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411-5.
2. Masaki T. Historical review: Endothelin. Trends Pharmacol Sci 2004;25:219-24.
3. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. J Hypertens 1998;16:1081-98.
4. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. Pharmacol Rev 1994;46:325-415.
5. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. J Biol Chem 1989;264:14954-9.
6. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:2863-7.
7. Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. Role of endothelin-1 in lung disease. Respir Res 2001;2:90-101.
8. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. FASEB J 2011;25:16-28.
9. Levin ER. Endothelins. N Engl J Med 1995;333:356-63.
10. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. J Biol Chem 2001;276:12645-53.
11. Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. Hypertension 1992;19:117-30.
12. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. J Clin Invest 1990;85:587-90.
13. Davenport A, Maguire J. Endothelin. In: Handbook of Experimental Pharmacology; 2006:295-329.

14. Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, et al. Endothelin-converting enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease. J Cardiovasc Pharmacol 1998;31 Suppl 1:S52-4.
15. D'Orleans-Juste P, Houde M, Rae GA, Bkaily G, Carrier E, Simard E. Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. Vascul Pharmacol 2008;49:51-62.
16. Tirapelli CR, Fecteau MH, Honore JC, Legros E, Gobeil F, D'Orleans-Juste P. Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta. Br J Pharmacol 2006;148:527-35.
17. Rossi GP. Aldosterone breakthrough during RAS blockade: a role for endothelins and their antagonists? Curr Hypertens Rep 2006;8:262-8.
18. Masaki T. The endothelin family: an overview. J Cardiovasc Pharmacol 2000;35:S3-5.
19. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. J Cardiovasc Pharmacol 1998;32 Suppl 3:S2-13.
20. Russell FD, Molenaar P. The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. Trends Pharmacol Sci 2000;21:353-9.
21. Shah AM. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. Cardiovasc Res 1996;31:847-67.
22. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:731-59.
23. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature 1990;348:730-2.
24. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. Nature 1990;348:732-5.
25. Kohan DE. Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. Curr Hypertens Rep 2008;10:65-9.
26. Maguire JJ, Kuc RE, O'Reilly G, Davenport AP. Vasoconstrictor endothelin receptors characterized in human renal artery and vein in vitro. Br J Pharmacol 1994;113:49-54.

27. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. FEBS Lett 1988;238:249-52.
28. Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. Crit Care Med 1997;25:958-64.
29. Babaei S, Picard P, Ravandi A, et al. Blockade of endothelin receptors markedly reduces atherosclerosis in LDL receptor deficient mice: role of endothelin in macrophage foam cell formation. Cardiovasc Res 2000;48:158-67.
30. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. Annu Rev Physiol 1999;61:391-415.
31. Salamonsen LA, Marsh MM, Findlay JK. Endometrial endothelin: regulator of uterine bleeding and endometrial repair. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999;26:154-7.
32. Merkely B, Geller L, Toth M, et al. Mechanism of endothelin-induced malignant ventricular arrhythmias in dogs. J Cardiovasc Pharmacol 1998;31 Suppl 1:S437-9.
33. Geller L, Szabo T, Kiss O, Solti F, Juhasz-Nagy A, Merkely B. Fundamental electrophysiological differences between low-dose intracoronary endothelin-1 infusion and myocardial ischemia revealed by multiple monophasic action potential recording. J Cardiovasc Pharmacol 2000;36:S167-71.
34. Hof RP, Hof A, Takiguchi Y. Attenuation of endothelin-induced regional vasoconstriction by isradipine: a nonspecific antivasoconstrictor effect. J Cardiovasc Pharmacol 1990;15 Suppl 1:S48-54.
35. Merkely B, Kiss O, Vago H, Zima E, Szabo T, Geller L. Arrhythmogenic action of endothelin-1. Cardiovasc Res 2000;48:357-8.
36. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. Am J Physiol 1988;255:H970-3.
37. Chu L, Endoh M. Biphasic inotropic response to endothelin-1 in the presence of various concentrations of norepinephrine in dog ventricular myocardium. J Cardiovasc Pharmacol 2000;36 Suppl 2:S9-14.

38. Kowala MC. The role of endothelin in the pathogenesis of atherosclerosis. Adv Pharmacol 1997;37:299-318.
39. Yildiz L, Akcay F, Kaynar H, Bakan N. Increased plasma endothelin-1 in heavy and light smokers. Clin Chem 1996;42:483-4.
40. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. Circ Res 1992;70:1191-7.
41. Kowala MC, Rose PM, Stein PD, et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. Am J Pathol 1995;146:819-26.
42. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. Circulation 1995;91:941-7.
43. Tesfamariam B. The effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function. Am J Cardiovasc Drugs 2006;6:115-20.
44. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, et al. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. Peptides 2003;24:1149-56.
45. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1993;328:1732-9.
46. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 2009;54:S43-54.
47. Aversa CR, Oparil S, Caro J, et al. Hypoxia stimulates human preproendothelin-1 promoter activity in transgenic mice. Am J Physiol 1997;273:L848-55.
48. Skvorak JP, Nazian SJ, Dietz JR. Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. Am J Physiol 1995;269:R1093-8.
49. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I. Time course alteration of endothelin-1 gene expression in the heart during exercise and recovery from post-exercise periods in rats. J Cardiovasc Pharmacol 2004;44 Suppl 1:S447-50.

50. Sugden PH, Clerk A. Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. Curr Vasc Pharmacol 2005;3:343-51.
51. Ballard C, Schaffer S. Stimulation of the Na+/Ca2+ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1. J Mol Cell Cardiol 1996;28:11-7.
52. Vignon-Zellweger N, Relle K, Kienlen E, et al. Endothelin-1 overexpression restores diastolic function in eNOS knockout mice. J Hypertens 2011;29:961-70.
53. Uehara Y, Azuma Y, Minai K, Yoshida H, Yoshimura M, Shimizu M. Endothelin-1 prolongs intracellular calcium transient decay in neonatal rat cardiac myocytes. Heart Vessels 2011.
54. Hong HM, Song EJ, Oh E, Kabir MH, Lee C, Yoo YS. Endothelin-1- and isoproterenol-induced differential protein expression and signaling pathway in HL-1 cardiomyocytes. Proteomics 2011;11:283-97.
55. Glenn DJ, Rahmutula D, Nishimoto M, Liang F, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses endothelin gene expression and proliferation in cardiac fibroblasts through a GATA4-dependent mechanism. Cardiovasc Res 2009;84:209-17.
56. Berger R, Pacher R. The role of the endothelin system in myocardial infarction--new therapeutic targets? Eur Heart J 2003;24:294-6.
57. Battistini B, Kingma JG. Changes in plasma levels of ET-1 and its precursor, big ET-1, in the arterial and venous circulation following double myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs. J Cardiovasc Pharmacol 2000;36:S215-20.
58. Noori A, Kabbani S. Endothelins and coronary vascular biology. Coron Artery Dis 2003;14:491-4.
59. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. Circulation 1994;89:1573-9.
60. Vago H, Soos P, Zima E, et al. The ET(A) receptor antagonist LU 135252 has no electrophysiological or anti-arrhythmic effects during myocardial ischaemia/reperfusion in dogs. Clin Sci (Lond) 2002;103 Suppl 48:223S-7S.

61. Vago H, Soos P, Zima E, et al. Changes of endothelin-1 and big endothelin-1 levels and action potential duration during myocardial ischemia-reperfusion in dogs with and without ventricular fibrillation. J Cardiovasc Pharmacol 2004;44 Suppl 1:S376-9.
62. Cernacek P, Stewart DJ, Monge JC, Rouleau JL. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. Can J Physiol Pharmacol 2003;81:598-606.
63. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991;18:38-43.
64. Khan IA. Role of endothelin-1 in acute myocardial infarction. Chest 2005;127:1474-6.
65. Pernow J, Wang QD. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. Cardiovasc Res 1997;33:518-26.
66. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. Circulation 1998;97:795-804.
67. Galiuto L, DeMaria AN, del Balzo U, et al. Ischemia-reperfusion injury at the microvascular level: treatment by endothelin A-selective antagonist and evaluation by myocardial contrast echocardiography. Circulation 2000;102:3111-6.
68. Velasco CE, Turner M, Inagami T, et al. Reperfusion enhances the local release of endothelin after regional myocardial ischemia. Am Heart J 1994;128:441-51.
69. Miyauchi T, Doi T, Suzuki N, et al. Plasma endothelin-1 concentrations in the coronary sinus in dogs with artificially induced myocardial infarction. Peptides 1992;13:1013-5.
70. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. Circ Res 1991;69:370-7.
71. Gan XT, Chakrabarti S, Karmazyn M. Increased endothelin-1 and endothelin receptor expression in myocytes of ischemic and reperfused rat hearts and ventricular myocytes exposed to ischemic conditions and its inhibition by nitric oxide generation. Can J Physiol Pharmacol 2003;81:105-13.

72. Duda M, Czarnowska E, Kurzelewski M, Konior A, Beresewicz A. Ischemic preconditioning prevents endothelial dysfunction, P-selectin expression, and neutrophil adhesion by preventing endothelin and O2- generation in the post-ischemic guinea-pig heart. J Physiol Pharmacol 2006;57:553-69.
73. Tahara A, Kohno M, Yanagi S, et al. Circulating immunoreactive endothelin in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. Metabolism 1991;40:1235-7.
74. Douglas SA, Louden C, Vickery-Clark LM, et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. Circ Res 1994;75:190-7.
75. Barolet AW, Babaei S, Robinson R, et al. Administration of exogenous endothelin-1 following vascular balloon injury: early and late effects on intimal hyperplasia. Cardiovasc Res 2001;52:468-76.
76. Kisanuki YY, Emoto N, Ohuchi T, et al. Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice. Hypertension 2010;56:121-8.
77. Herczenik E, Varga Z, Eros D, et al. Protein kinase inhibitor-induced endothelial cell cytotoxicity and its prediction based on calculated molecular descriptors. J Recept Signal Transduct Res 2009;29:75-83.
78. Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. Anticancer Agents Med Chem 2008;8:790-7.
79. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. Pflugers Arch 2010;459:951-8.
80. Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara MN, Touyz RM. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. Expert Rev Cardiovasc Ther 2007;5:531-52.
81. Balakumar P, Kaur T, Singh M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. Toxicology 2008;245:49-64.
82. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. Ann Med 2000;32:293-304.

83. Otani H. Oxidative Stress as Pathogenesis of Cardiovascular Risk Associated with Metabolic Syndrome. Antioxid Redox Signal 2010.
84. Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, et al. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;300:H388-96.
85. Bagnato A, Spinella F, Rosano L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. Endocr Relat Cancer 2005;12:761-72.
86. Smollich M, Wulfing P. The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. Curr Vasc Pharmacol 2007;5:239-48.
87. Herrmann E, Bogemann M, Bierer S, Eltze E, Hertle L, Wulfing C. The endothelin axis in urologic tumors: mechanisms of tumor biology and therapeutic implications. Expert Rev Anticancer Ther 2006;6:73-81.
88. Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM. Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. Clin Breast Cancer 2005;5 Suppl:S46-53.
89. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2002;3:1-15.
90. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. Am J Pathol 2000;157:1703-11.
91. Knowles J, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 and angiogenesis in cancer. Curr Vasc Pharmacol 2005;3:309-14.
92. Lane HA, Smith JC, Davies JS. Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis. Vasc Health Risk Manag 2006;2:19-30.
93. Hays AG, Hirsch GA, Kelle S, Gerstenblith G, Weiss RG, Stuber M. Noninvasive visualization of coronary artery endothelial function in healthy subjects and in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 2010;56:1657-65.
94. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. N Engl J Med 1998;339:900-5.

95. Chen XP, Xun KL, Wu Q, Zhang TT, Shi JS, Du GH. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species. Vascul Pharmacol 2007;47:1-9.
96. Spallarossa P, Fabbi P, Manca V, et al. Doxorubicin-induced expression of LOX-1 in H9c2 cardiac muscle cells and its role in apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2005;335:188-96.
97. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. Prog Cardiovasc Dis 2007;49:330-52.
98. Wolf MB, Baynes JW. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. Biochim Biophys Acta 2006;1760:267-71.
99. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Semin Oncol 1998;25:10-4.
100. Deres P, Halmosi R, Toth A, et al. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. J Cardiovasc Pharmacol 2005;45:36-43.
101. Damrot J, Nubel T, Epe B, Roos WP, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. Br J Pharmacol 2006;149:988-97.
102. Kim CS, Jung SB, Naqvi A, et al. p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc. Circ Res 2008;103:1441-50.
103. Woodley-Cook J, Shin LY, Swystun L, Caruso S, Beaudin S, Liaw PC. Effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin on the protein C anticoagulant pathway. Mol Cancer Ther 2006;5:3303-11.
104. Pober JS, Min W. Endothelial cell dysfunction, injury and death. Handb Exp Pharmacol 2006:135-56.
105. Yamashita J, Ogawa M, Shirakusa T. Plasma endothelin-1 as a marker for doxorubicin cardiotoxicity. Int J Cancer 1995;62:542-7.

106. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, et al. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. Circulation 1996;93:1214-22.
107. Zsary A, Szucs S, Keltai K, et al. Endothelin-1 and cardiac function in anthracycline-treated patients: a 1-year follow-up. J Cardiovasc Pharmacol 2004;44 Suppl 1:S372-5.
108. Margulies KB, Hildebrand FL, Jr., Lerman A, Perrella MA, Burnett JC, Jr. Increased endothelin in experimental heart failure. Circulation 1990;82:2226-30.
109. Selvais PL, Robert A, Ahn S, et al. Direct comparison between endothelin-1, N-terminal proatrial natriuretic factor, and brain natriuretic peptide as prognostic markers of survival in congestive heart failure. J Card Fail 2000;6:201-7.
110. Suzuki T, Miyauchi T. A novel pharmacological action of ET-1 to prevent the cytotoxicity of doxorubicin in cardiomyocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001;280:R1399-406.
111. Wainwright CL, McCabe C, Kane KA. Endothelin and the ischaemic heart. Curr Vasc Pharmacol 2005;3:333-41.
112. Oroszlan M, Herczenik E, Rugonfalvi-Kiss S, et al. Proinflammatory changes in human umbilical cord vein endothelial cells can be induced neither by native nor by modified CRP. Int Immunol 2006;18:871-8.
113. Zhao B, Stavchansky SA, Bowden RA, Bowman PD. Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2003;284:C1577-83.
114. Kreuzer KA, Lass U, Landt O, et al. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. Clin Chem 1999;45:297-300.
115. Didier N, Banks WA, Creminon C, Dereuddre-Bosquet N, Mabondzo A. HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. Neuroreport 2002;13:1179-83.
116. Bien S, Riad A, Ritter CA, et al. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. Cancer Res 2007;67:10428-35.

117. Rahman A, Carmichael D, Harris M, Roh JK. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. Cancer Res 1986;46:2295-9.

118. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. Can J Physiol Pharmacol 2008;86:485-98.

119. Chan L, Chittinandana A, Shapiro JI, Shanley PF, Schrier RW. Effect of an endothelin-receptor antagonist on ischemic acute renal failure. Am J Physiol 1994;266:F135-8.

120. Ritthaler T, Gopfert T, Firth JD, Ratcliffe PJ, Kramer BK, Kurtz A. Influence of hypoxia on hepatic and renal endothelin gene expression. Pflugers Arch 1996;431:587-93.

121. Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E, Sokolovsky M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. Stroke 1992;23:1014-6.

122. Tsuji S, Sawamura A, Watanabe H, Takihara K, Park SE, Azuma J. Plasma endothelin levels during myocardial ischemia and reperfusion. Life Sci 1991;48:1745-9.

123. Aroui S, Brahim S, Kenani A. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell penetrating peptides in different cell lines: a comparative Study. Biochem Biophys Res Commun 2009.

124. Kaushal V, Kaushal GP, Mehta P. Differential toxicity of anthracyclines on cultured endothelial cells. Endothelium 2004;11:253-8.

125. Abou El Hassan MA, Verheul HM, Jorna AS, et al. The new cardioprotector Monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro. Br J Cancer 2003;89:357-62.

126. Ogata Y, Takahashi M, Ueno S, et al. Antiapoptotic effect of endothelin-1 in rat cardiomyocytes in vitro. Hypertension 2003;41:1156-63.

127. Shichiri M, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis. Mol Endocrinol 1998;12:172-80.

128. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. Br J Pharmacol 2005;145:323-33.

129. Mostafa MG, Mima T, Taniguchi T, Mori K. Doxorubicin, an RNA synthesis inhibitor, prevents vasoconstriction and inhibits aberrant expression of endothelin-1 in the cerebral vasospasm model of the rat. Neurosci Lett 2000;283:197-200.

130. Riad A, Bien S, Gratz M, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. Eur J Heart Fail 2008;10:233-43.

131. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. J Pharmacol Sci 2006;101:151-8.

132. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, et al. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci 2004;95:19-26.

133. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Osman AM. Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. Pharmacol Toxicol 2001;89:140-4.

134. Lee ME, Dhadly MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. J Biol Chem 1991;266:19034-9.

135. Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. J Biol Chem 1992;267:1279-85.

136. Layon ME, Ackley CJ, West RJ, Lowrey CH. Expression of GATA-1 in a non-hematopoietic cell line induces beta-globin locus control region chromatin structure remodeling and an erythroid pattern of gene expression. J Mol Biol 2007;366:737-44.

137. Mawji IA, Marsden PA. RNA transfection is a versatile tool to investigate endothelin-1 posttranscriptional regulation. Exp Biol Med (Maywood) 2006;231:704-8.

138. Keltai K, Vago H, Zsary A, et al. Endothelin Gene Expression During Ischemia and Reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol 2004;44:S198-S201.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Értekezés témájával kapcsolatos közlemények:

Keltai K, Cervenak L, Makó V, Doleschall Z, Zsáry A, Karádi I.
Doxorubicin selectively suppresses mRNA expression and production of endothelin-1 in endothelial cells.
Vasc Pharmacol 2010;53: 209-214.

Keltai K, Vágó H, Zsáry A, Karádi I, Kékesi V, Juhász-Nagy A, Merkely B.
Endothelin Gene Expression During Ischaemia and Reperfusion.
J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl):S198-201.

Keltai K, Vágó H, Zsáry A, Karádi I, Kékesi V, Merkely B.
Az endotelin gén expresszió miokardiális ischaemia/reperfúzió során.
Magyar Belorvosi Archívum, 2007;60 (2): 160-164.

Keltai K, Zsáry A, Pásztor E, Schneider T, Sármán P, Rosta A, Karádi I, Jánoskuti L.
Pathogenesis and monitoring of anthracycline induced cardiomyopathy: Role of endothelin-1, brain natriuretic peptide and serial echocardiography.
Eur J Heart Fail Suppl (2006) 5(Suppl): 162-163

Zsáry A, Szűcs S, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Fenyvesi T, Karádi I.
Anthracyclines induced cardiomyopathy and endothelins.
Eur J Heart Failure, 2003; Suppl., Vol.2 No. 1. p.15. (110).

Vágó H, Soós P, Zima E, **Keltai K**, Gellér L, Kékesi V, Juhász-Nagy A, Merkely B.
Endothelin-A receptor antagonist LU 135 252 has no electrophysiological and anti-arrhythmic effects during myocardial ischaemia-reperfusion in dogs.
Eur Heart J 2002; 23 (Suppl S): 215.

A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Zsáry A, Szűcs S**, Keltai K**, Pásztor E, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Jánoskuti L, Fenyvesi T, Karádi I.
Endothelin-1 and cardiac function in antracycline treated patients: a one-year follow-up.
J Cardiovasc Pharmacol *2*004;44(suppl1):S372-375.

Szűcs A, Róka A, Soós P, Szilágyi S, Vágó H, **Keltai K**, Dezsi AC, Gellér L, Merkely B.
Effect of Incessant Ventricular Tachyarrhythmias on Serum Endothelin and Big-endothelin Levels.
J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl1:S402-406).

Vágó H, Soós P, Zima Z, Gellér L, **Keltai K,** Róka A, Kékesi V, Juhász.-Nagy A, Merkely B.
Changes of endothelin-1 and big-endothelin-1 levels and action potential duration during myocardial ischaemia-reperfusion in dogs with and without ventricular fibrillation.
J Cardiovasc Pharmacol 2004;44(suppl1):S376-379.

Zsáry A, Szűcs S, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Fenyvesi T, Karádi I.
Endothelins: A possible mechanism of cytostatics-induced cardiomyopathy.
Leukemia & Lymphoma, 2004;45, 351-355.

Szűcs A, **Keltai K**, Zima E, Vágó H, Soós P, Róka A, Szabolcs Z, Gellér L, Merkely B.
Effects of implantable cardioverter defibrillator implantation and shock application on serum endothelin-1 and big-endothelin levels.
Clin Sci 2002;103:233S-236S.

Keltai M. és **Keltai K.**
Antikoaguláns kezelés pitvarfibrillációban
Card Hung, 2011;41:278-286.

Keltai M, **Keltai K,**
Új antikoagulánsok a vénás thromboembolia megelőzésében és kezelésében.
Orv Hetil 2011;152(25):983-992.

Keltai K.
Metabolikus szindróma és szívelégtelenség.
Magyar Családorvosok Lapja 2011;6:15-19.

Keltai K.
Hypertonia kezelés szempontjai az alapellátásban.
Magyar Családorvosok Lapja 2011;4:31-34.

Keltai K.
Angiotenzin receptor blokkolók és kombinációik a hypertonia terápiájában.
Magyar Családorvosok Lapja 2010;5:36-38.

Keltai K, Gera I, Gábris K, Orosz M.
Az infektív endocarditis megelőzésének új irányelvei és fogászati-szájsebészeti vonatkozásai.
Fogorvosi szemle 2010;103:115-118.

Keltai K.
Új irányelvek az infektív endocarditis megelőzésében.
Magyar Családorvosok Lapja 2010;4:9-11.

Keltai K.
A dilatatív cardiomyopathia korszerű kezelése.
Magyar Családorvosok Lapja 2009;7:10-18.

Keltai K.
Antithromboticus kezelés pitvarfibrillációban.
Magyar Családorvosok Lapja 2008;6:2-9.

Keltai K.
A béta-blokkolók helye a hypertonia és a szívbetegségek kezelésében.
Magyar Családorvosok Lapja 2008;9:36-38.

Pozsonyi Z, Förhécz Zs, Jánoskúti L, **Keltai K,** Lengyel M, Prohászka Z.
Alkalmas-e az NT-PROBNP a pitvarfibrilláció sikeres kardioverziója után a tartós sinus ritmus fennmaradásának előrejelzésére?
Magy Belorv Arch 2007;60:523-529.

Nagy E, Bodó I, Jánoskúti L, Förhécz Zs, **Keltai K**, Zsáry A, Prohászka Z, Karádi I, Lengyel M.
Protrombotikus markerek változása pitvarfibrilláció elektromos kardioverziója után.
Cardiol Hung 2007;37:166-170.

Zsáry A, Pásztor E, Szücs Sz, **Keltai K**, Schneider T, Rosta A, Sármán P, Jánoskúti L, Fenyvesi T, Karádi I.
Endotelin-1 szintjének változása és anthracyclin okozta cardiomyopathia.
Magy Belorv Arc 2004;57:67-70.

Zsáry A, **Keltai K.**
Acut coronaria szindróma. A nem ST-elevációval járó akut coronaria szindróma kezelése.
Családorvosi Fórum 2003;1:36-44.

Keltai K.
ACE –gátlók helye a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében.
Háziorvos Továbbképző Szemle 2003;8:683-687.

Keltai K.
Vitiumok diagnózisa és gondozása.
Családorvosi Fórum 2002;8:10-16.

Kempler P, Littmannn L, Jánoskúti L, **Keltai K,** Szombathy T,
László Z, Zsáry A, Sármán P, Fenyvesi T.
A pitvarfibrilláció non-farmakológiai kezelésének újabb eredményei.
Magy Belorv Arch 1999;52:413-418.

László Z, Kempler P, Jánoskúti L, **Keltai K,** Szombathy T, Rössler A, Hinghofer-Szalkay H.
Szimulált orthostasis.
Cardiol Hung 1999;2:47-51.

Jánoskúti L, Kempler P, László Z, **Keltai K**, Szombathy T, Fenyvesi T.
A korai posztinfarktusos periódusban végzett nem invazív tesztek prognosztikai értéke.
Lege Artis Medicinae 1998;8:860-864.

Keltai K, Ökrös P, Kempler P, Jánoskúti L, László Z, Csaba K, Littmann L.
A P- hullám hiánya az EKG-n.
Magy Belorv Arch 1998;51:363-365.

László Z, Kempler P, Jánoskúti L, **Keltai K**, Fenyvesi T.
Kamrai ritmuszavarok, balkamrafunkció és kamrai utópotenciál összefüggése és követése myocardialis infarctus után.
Lege Artis Medicinae 1994;4:242-246.

Jánoskuti L, László Z, **Keltai K.**
„Regularisan irregularis" tartós monomorf kamrai tachycardia.
Cardiol Hung 1994;3:43-44.

DOI:10.14753/SE.2012.1740

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzásegítettek dolgozatom elkészítéséhez.

Szeretném megköszönni témavezetőim, *Dr. Cervenak László* és *Prof. Dr. Merkely Béla* segítségét és útmutatásait.

Külön köszönetet kívánok mondani főnökömnek, *Prof. Dr. Karádi Istvánnak*, aki nemcsak elvárta, de támogatta és lehetővé is tette számomra, hogy a tudományos kutatásban részt vegyek.

A kutya szívmodellen végzett vizsgálatokkal kapcsolatban köszönettel tartozom *Dr. Vágó Hajnalkának* és a Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központ Kísérleti Kutatólabor dolgozóinak szakmai segítségükért.

Köszönöm M*akó Veronikának* és a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratórium Endotélsejt munkacsoportjának, hogy az endothelsejttenyészeten végzett kísérletsorozat kivitelezésében segítségemre voltak.

Továbbá köszönöm *Doleschall Zoltánnak* (Országos Onkológiai Intézet), mindkét kísérletsorozatban a molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom *Varga Katalinnak* a PhD dolgozat szövegének formai gondozásáért.