

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

**METÁN VÉDŐHATÁSA A SZÍVIZOM ISZKÉMIA - REPERFÚZIÓ ALATT
BEKÖVETKEZŐ MITOKONDRIÁLIS - METABOLIKUS KÁROSODÁSBAN**

Ph.D. Tézis

Dr. Jász Dávid Kurszán

Témavezető: Dr. Hartmann Petra

Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet

2022

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Jász DK, Szilágyi ÁL, Tuboly E, Baráth B, Márton AR, Varga P, Varga G, Érces D, Mohácsi Á, Szabó A, Bozó R, Gömöri K, Görbe A, Boros M, Hartmann P. (2021). Reduction in hipoxia-reoxygenation-induced myocardial mitochondrial damage with exogenous methane. *J CELL MOL MED*, 25(11):5113-5123. doi: 10.1111/jcmm.16498. **IF: 4,486**

Benke K, **Jász DK**, Szilágyi ÁL, Baráth B, Tuboly E, Márton AR, Varga P, Mohácsi Á, Szabó A, Széll Z, Ruppert M, Radovits T, Szabó G, Merkely B, Hartmann P, Boros M. (2020). Methane supplementation improves graft function in experimental heart transplantation. *J HEART LUNG TRANSPLANT*, 40(3):183-192. doi: 10.1016/j.healun.2020.11.003. **IF: 7,865**

Kumulatív IF: 12,351

Egyéb, a témához szorosan nem kapcsolódó publikációk:

Hartmann P, Butt E, Fehér Á, Szilágyi ÁL, **Jász DK**, Balázs B, Bakonyi M, Berkó Sz, Erős G, Boros M, Horváth Gy, Varga E, Csányi E. (2018) Electroporation-enhanced transdermal drug delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis. *DRUG DES DEVEL THER*. 12: 1917-1930. doi: 10.2147/DDDT.S161703. **IF: 4,162**

Horváth T, **Jász DK**, Baráth B, Poles MZ, Boros M, Hartmann P. (2020) Mitochondrial Consequences of Organ Preservation Techniques during Liver Transplantation. *INT J MOL SCI*. 10;22(6):2816. doi: 10.3390/ijms22062816. **IF: 4,556**

Varga G, Ugocsai M, Hartmann P, Lajkó N, Molnár R, Szűcs S, **Jász DK**, Érces D, Ghyczy M, Tóth G, Boros M. (2018). Acetylsalicylic acid-tris-hydroxymethyl-aminomethane reduces colon mucosal damage without causing gastric side effects in a rat model of colitis. *INFLAMMOPHARMACOLOGY*. 26(1):261-271. doi: 10.1007/s10787-017-0354-z. **IF: 4,07**

Baráth B, **Jász DK**, Horváth T, Baráth Be, Maróti G, Strifler G, Varga G, Sándor L, Perényi D, Tallós Sz, Donka T, Jávör P, Boros M, Hartmann P (2022). Mitochondrial Side Effects of Surgical Prophylactic Antibiotics Ceftriaxone and Rifaximin Lead to Bowel Mucosal Damage. *INT. J. MOL. SCI*. 23(9):5064, doi:10.3390/ijms23095064 **IF: 5,924**

Összes IF: 31,063

BEVEZETÉS

Az iszkémia/reperfúzió (I/R)

A szívizomsejtek szüntelen összehúzódása elengedhetetlen az emberi szervezet megfelelő vérellátásához, azonban a mechanizmus folyamatos fenntartása rengeteg oxigént igényel. A leggyakoribb szívbetegségek (pl. szívinfarktus, szívizom hipertrófia stb.) kialakulásában az iszkémia (azaz a szövet vérellátásának csökkenése és az ebből következő szöveti oxigénszint csökkenés) alapvető szerepet játszik és a meleg iszkémia által okozott kóros változások hátterében a hipoxia hatására megváltozó intracelluláris milió áll. A sejten belüli alacsony oxigénszint mitokondriális funkciócsökkenéshez vezet, ami a sejt adenzin-trifoszfát (ATP) vesztését okozza. A mitokondrium elektrontranszportláncának (ETC) károsodása szukcinát (Succ) és nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrid (NADH) felhalmozódást okoz, ami aktiválja a sejt alternatív metabolikus útvonalait. A sejtek ATP vesztése emellett az elsődlegesen vagy másodlagosan ATP-függő ioncsatornák csökkent működésével is jár. E változásokat követően, a reperfúzió során, a sejteket túlzott oxigén terhelés éri, emiatt az iszkémia során lelassult működésű mitokondriumok sejtlegzése reaktív oxigéngyökök (ROS) termeléséhez és felszabadulásához vezet. A szervtranszplantáció során alkalmazott hideg iszkémia alatt bekövetkező hipoxia mechanizmusa hasonló koncepción alapszik, de itt a hideg (általában 4°C) környezet lelassítja a szövetek anyagcseréjét, bizonyos fokú védelmet nyújtva a káros anyagcsere-változások ellen. A hideg iszkémia ezen tulajdonsága teszi ezt az eljárást alkalmassá a szervek műtét előtti és műtét közbeni konzerválására. Ugyanakkor a hideg iszkémia is kimeríti a sejt energia raktárait, a lelassult metabolizmus jeleként az ATP termelés csökken és anaerob metabolikus útvonalak aktiválódnak. A hideg iszkémia jellemzője az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció jelentős emelkedése, melynek egy részét a mitokondriumok felveszik, de az ennek ellenére fennmaradó magas Ca^{2+} koncentráció aktiválja a pro-apoptotikus enzimeket, mint például a foszfolipázokat, a kalmodulin szabályozott proteázokat és az endonukleázokat. A hideg környezet hatására Ca^{2+} szabadul fel az endoplazmatikus retikulumból (ER) is. A sejten belüli magas Ca^{2+} szint génexpresszió szintű változásokon keresztül is rész vesz az apoptózis sejten belüli jelútszerében, ugyanis a hipoxia-indukálható faktor 1-alfa (Hif-1 α) és a Bax/Bcl2 rendszeren keresztül pro-apoptotikus változásokhoz vezet.

A mitokondriumok szerepe az I/R károsodásban

A mitokondriumok a sejtanyagcsere számos biokémiai folyamatában részt vesznek, többek között a zsírsavak β -oxidációjában, a Krebs-ciklusban és különböző alternatív szénhidrát-

anyagcsere útvonalakban, de az energiatermelő folyamatokban betöltött kulcsszerep ellenére, a mitokondriumok által végzett oxidatív foszforiláció nemcsak a sejtek anyagcseréjéért, hanem a halálukért is felelős lehet. A mitokondriális ETC lehet a főszereplője a reperfúziós sérülés kialakulásának is. A reperfúziós időszakban jelentkező oxigénterhelés az ATP-szintáz, azaz az ETC V. komplex túlzott működéséhez vezet. Az oxigénterhelés felgyorsítja az elektrontranszportot is, ami a mitokondium komplexein keresztül elektronszivárgáshoz vezet. A kiszivárgó elektronok visszakerülhetnek az ETC-be, vagy redukálhatják a rendszerben nagy mennyiségben jelen lévő NAD^+ -ot, így NADH felhalmozódáshoz vezetve. A helyileg magas elektron koncentráció csökkentésének másik lehetősége a rendszerben amúgy is nagy mennyiségű oxigén felhasználása, így ROS képződést hozva létre, ami az oxido-reduktív stressz legfőbb oka reperfúziós károsodás során.

Az I/R-indukált mitokondrium károsodás mechanizmusa

A mitokondriális mechanizmusokon keresztül létrejött graft károsodás kikerülése mai napig a transzplantáció egyik megoldatlan problémája. Számos mitokondriális mechanizmus, mint az ATP szintézis, vagy éppen a pro-, és anti-apoptotikus jelutak képesek befolyásolni a sejtciklust és a sejtek túlélését. Az I/R-indukált szervkárosodás intracelluláris hipoxiás mechanizmusokon keresztül jön létre, mely végezetül a graft kilökődését, vagy nem megfelelő működését okozza. A vérkeringés és következésképpen szöveti oxigén hiánya a sejtek anyagcseréjét az anaerob glikolízis irányába tolja el, ami miatt a mitokondriumok szintjén csökken az ETC-on áthaladó elektronok száma. A hipoxiás környezet ugyanakkor gátolja a II-es légzési komplex aktivitását is, ezzel NADH és az iszkémia metabolikus markereként is számon tartott szukcinát felhalmozódását okozva. A hipoxia során megfigyelt magas intracelluláris Ca^{2+} szint befolyásolja a mitokondriális membránpotenciált, mely következményeként ROS termelődik. A rendszerből kiszivárgott elektronok és a reperfúzió során a rendszerbe nagy mennyiségben beáramló oxigén fokozott ROS termelést eredményez, mely további ETC károsodást és csökkent ATP termelést eredményez, mely ördögi tovább rontja a sejt túlélését, míg végezetül annak apoptózist okozza. Emelkedett ROS koncentráció tönkreteszi a mitokondrium membránjait is, ami a mitokondriális permeábilis tranzíciós pórusok (mPTP) nyitását eredményezi, növelve ezzel Ca^{2+} -áram okozta stresszt.

A szívtranszplantáció

A gyakorlatban a transzplantáció során mind hideg, mind meleg iszkémiás károsodás is bekövetkezik. A transzplantáció a végstádiumú szervi elégtelenségek végső és egyben egyetlen megoldása, azonban még a mai napig is a betegek biztonságának és a graft

túlélésének javítására tett próbálkozások a klinikai kutatások középpontjában állnak. A mai napig még mindig a hideg statikus tárolás a szervek ex- és implantáció közti megőrzésének arany standardja. A manapság használt technikák még tökéletlenül védnek az átmeneti anoxia vagy a reperfüzió okozta károsodástól, ezért a modern kutatások és módszerek még mindig a hideg iszkémia kiváltott szervkárosodás enyhítése és kivédése felé irányulnak.

A metán (CH₄) kémiai tulajdonságai és bioaktivitása

A CH₄ színtelen, szagtalan, mindenütt jelenlévő, standard körülmények közt inert gázmolekula. A légkör felső rétegében hidroxilgyökökkel reagálva szerepet játszik az ózonképződésben, ám az eukarióta szervezetekben betöltött szerepe, vagy fiziko-kémiai reakciói még nem teljesen ismertek. Az exogén módon adagolt CH₄ hatásait már több kutatócsoport vizsgálta, *in vivo* vizsgálatokban leírták a CH₄ bélperisztaltikára gyakorolt biológiai hatását, valamint a túlélési arány növekedését vérzéses sokk patkánymodelljében. A CH₄-nal dúsított folyadékok bizonyítottan védelmet nyújtanak az I/R-indukált állapotok következményeivel szemben: 2,5% CH₄-t tartalmazó normoxiás levegővel történő lélegeztetés csökkent a bél és a máj I/R károsodását is. Emellett már több adat bizonyítja a CH₄ inhaláció vagy a CH₄-nal dúsított folyadékterápiák antioxidatív és anti-apoptotikus hatását kísérletes hipoxiás és gyulladásos modellekben és szepszis esetén is.

CH₄ hatása az I/R okozta károsodásra

A CH₄ eloszlása *in vivo* jól jellemezhető. I/R okozta sérülésekben a mitokondriumok belső membránján található ETC működése megváltozik és számos korábbi tanulmány utal arra, hogy exogén CH₄ bevitele befolyásolja a mitokondriumok funkcióját. Más egyszerű gázmolekulákhoz hasonlóan valószínűleg a CH₄ is hatást fejt ki a mitokondriális fehérjékre és/vagy fehérjekomplexekre a biológiai membránok foszfolipid kettősrétegének nem specifikus fiziko-kémiai változásain keresztül és korábbi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy ezekért a mitokondriális ETC IV-es komplexe (citokrom c oxidáz) lehet főleg a felelős.

CÉLKITŰZÉSEK

Első lépésben a transzplantációs oldatok CH₄-nal történő dúsításának hatását vizsgáltuk hideg iszkémia alatt, heterotóp patkányszív-transzplantáció modellben. Az I. kísérletsorozat részeként

- megvizsgáltuk a CH₄-dúsítás hatását a graft szívizomzatában lezajló oxido-reduktív és nitrozatív stressz folyamatokra;

- továbbá vizsgáltuk az ER stressz és a mitokondrium-mediált apoptózis markerek expresszióját, mint a CH₄ sejtvédő hatásának háttérében álló lehetséges okot.

Második lépésként a CH₄ extramitokondriális Ca²⁺-áramlásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, mivel feltételeztük, hogy ez a folyamat fontos szerepet játszik az ER-mitokondrium kölcsönhatásban. A II. kísérletsorozat részeként

- megvizsgáltuk az exogén Ca²⁺ hatását izolált szív mitokondriumokon a membránpotenciál változásai háttérében;
- végül a CH₄ pontos, mitokondriális hatásokért felelős ETC-n levő hatáspontra meghatározására törekedtünk az egyes légzési komplexek szelektív szubsztrátjai és inhibitorai felhasználásával.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. kísérlet sorozat

CH₄-dúsított transzplantációs oldat szívgraftokon kifejtett hatásának vizsgálata kísérletes transzplantáció során

Kísérleteinket hím Lewis-patkányokon (250-350 g; Charles River, Németország) végeztük a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63-as uniós irányelvvel összhangban. A vizsgálatot Magyarország illetékes nemzeti hatósága (ÁTET) engedélyezte PEI/001/2374-4/2015 engedélyszámmal.

Kísérleti elrendezés

Lewis-Lewis heterotóp transzplantációt (HTX) végeztünk az irodalomban leírtak szerint, egy alomból származó Lewis-patkányokon a szerv kilökődés elkerülése érdekében. Röviden összefoglalva a műtéti technikát: a donor patkányt izofluránnal altattuk, miközben heparint (25000 NE) adtunk be intravénásan. Kétoldali mellkasi metszést végeztünk a szív feltárása érdekében, és hideg (4°C) kardioplégiás Custodiol (CS, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Németország, n=12) vagy CH₄-nal dúsított CS-t (CS-CH₄, n=12) juttattunk a koszorúerekbe az aortán keresztül. A vena cava superiort, inferiort és a tüdővénaikat en masse varrattal lekötöttük, míg a szívet az aortaívvel együtt vágtuk ki a hemodinamikai és koszorúér-áramlás (CBF) méréshez. A kimetszés után a graftot 60 percig hideg CS-ban vagy CS-CH₄-ban tároltuk. A kontrollszívek ugyanezen a műtéti eljárásen estek át, de nem tároltuk és nem ültettük át (kontroll, n=12). A recipiens patkányokat izofluránnal altattuk, majd heparinizáltuk (400 IU/kg iv), miközben testhőmérsékletüket 37°C-on tartottuk. Az infrarenalis aorta és a vena cava inferior körülbelül 2 cm-es szakaszát izoláltuk és kisérfogóval kizártuk a keringésből. A donorszív aortáját és a tüdőartériáját oldalról összekapcsoltuk a recipiens hasi aortájával, illetve a vena cavával. A szervbeültetés időtartamát 60 percen (iszkémiás periódus) standardizáltuk, hogy minimalizáljuk a kísérletek közötti időbeli eltéréseket. Az anasztomózisok befejezése után protamint (400 NE/kg iv) adtunk a heparin antagonizálására. A donorszívet 60 percig in situ vérrel reperfundáltuk. A donorból történő explantáció után a graftot 60 percig hideg transzplantációs oldatban tároltuk (hideg iszkémiás idő), majd a HTX után 60 perces reperfüziós periódus következett. A reperfüzió végén a korai graft funkciók értékelésére hemodinamikai méréseket végeztünk; ezután biopsziát vettünk a graft bal kamrájából (LV), melyből a továbbiakban a mitokondriális funkciókat és biokémiai paramétereket jellemeztük. Meghatároztuk a szöveti

myeloperoxidáz (MPO) és xantin-oxidoreduktáz (XOR) aktivitást, a redukált glutation (GSH) és az oxidált glutation-diszulfid (GSSG) arányát, valamint a szöveti nitrit/nitrát (NO_x) szintet. A reperfüziós periódus végén a szívizomkárosodás szérum markereit a vena cavából vett vérmintából határoztuk meg.

Az állatokat véletlenszerűen három csoportba osztottuk. Az 1. csoportban (kontroll, n=12) a donor patkányok az explantációig ugyanazon a műtéti eljáráson estek át, de a szívek hideg tárolása és implantációja elmaradt. A 2. csoportban (n=12) a 60 perces hideg iszkémiás periódus alatt 4°C-on, gyári Custodiol (CS)-oldatban, míg a 3. csoportban (n=12) CH₄-nal dúsított CS-oldatban tároltuk az explantált graftokat.

Hemodinamikai mérések

60 perccel a transzplantáció után 3F latex ballonkatétert (Edwards Lifesciences Corporation, Irvine, CA, USA) vezetünk be a LV-ba a szívcsúcson keresztül, hogy meghatározzuk a maximális LV szisztolés nyomást (LVSP), a dp/dt_{max}-t (a szisztolés nyomásnövekedés maximális meredekségét) és a dp/dt_{min}-t Millar mikromanométerrel (SPR-838, Millar Instruments) különböző LV térfogatok esetén (20-180 µl). Ezekből az adatokból LV nyomás-térfogat összefüggéseket kerestünk. A graft CBF-ét a donor felszálló aortájára szerelt ultrahangos áramlásmérővel (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) mértük.

Mitokondriális funkciók vizsgálata

A mitokondriális légzést 3 ml mitokondriális respirációs médiumban (MiRO5) homogenizált szövetmintából nagyfelbontású respirometriával (HRR, Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) vizsgáltuk. A mitokondriális O₂-fogyasztást (légzési fluxus), a II-es komplexhez kötött alaplégzést (szukcinát-mediált légzés, az I-es komplex inhibitor rotenon jelenlétében), az oxidatív foszforilációs kapacitást (OxPhos) és a citokróm c felszabadulást (a mitokondriális belső membrán károsodásának indikátora) a korábban leírtak szerint határoztuk meg. A respirometriás adatokat Lowry-módszerrel meghatározott fehérjetartalomra normalizáltuk.

Kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) vizsgálat

A szívizom mRNS-expresszióját qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével elemeztük a kaspáz-3, kaspáz-9, DNS-károsodás által indukálható transzkript 3 (Ddit3, más néven CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homológ protein (CHOP)), Hif-1 α , GSK-3 β és VLDL receptor (VLDLr) génekre vonatkozóan elemeztük.

Biokémiai vizsgálatok - szöveti xantin oxidoreduktáz (XOR) aktivitás

A szívizom biopsziákat 50 mM Tris-HCl-t, 0,1 mM EDTA-t, 0,5 mM ditiotreitolt, 1 mM fenilmetil-szulfonil-fluoridot, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ szója tripszin-inhibitor és 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ leupeptint tartalmazó foszfát pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk. A homogenátumot 4°C-on 20 percig 24 000 g-vel centrifugáltuk, és a felülúszót centrifugálás-koncentráció csövekbe töltöttük. A XOR-aktivitást a felülúszó pterin-izoxantopterin átalakulás fluorometriás kinetikája alapján határoztuk meg metilénkék jelenlétében (teljes XOR) vagy hiányában (XO-aktivitás).

Glutation és glutation diszulfid (GSH/GSSG) arány meghatározása

A GSH/GSSG arányt fluorimetriás Glutathione Assay Kit (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) segítségével határoztuk meg. A minta GSH-tartalmát a tiolszoportokat célzó kromogén reakció termékének detektálásával (478 nm) nyert adatokból a gyártó ajánlása alapján számítottuk ki.

Szöveti myeloperoxidáz (MPO) aktivitás

A szöveteket 0,1 M polimetilszulfonilfluoridot tartalmazó Tris-HCl pufferrel (0,1 M; pH 7,4) homogenizáltuk a szöveti proteázok blokkolása érdekében, majd 4°C-on 20 percig 24000 g-vel centrifugáltuk. 450 nm-en (UV-1601 spektrofotométer; Shimadzu, Japán) mértük a minták MPO aktivitását, és az adatokat a minta fehérjetartalmára normalizáltuk.

Nitrit/nitrát (NO_x) arány

Az NO_x-t, a nitrogén monoxid (NO) stabil végtermékeinek szintjét a szövetekben a Griess-reakcióval mértük. Ez a vizsgálat a nitrát nitritté történő enzimatisz redukcióján alapul, amely ezután színes azovegyületté alakul át, melyet 540 nm-en spektrofotometriával detektáltunk.

Szövettan, immunhisztokémiai festés

A szíveket pufferezt paraformaldehid-oldatban (4%) rögzítettük, paraffinba ágyaztuk, majd 5 mm vastagságú metszeteket festettünk meg hematoxilinnel és eozinnal (H&E). Az ER stressz marker szarko(endo)plazmatikus retikulum Ca²⁺ ATPáz (SERCA1) immunhisztokémiai festését SERCA1-specifikus antitesttel (#S1189, Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) végeztük a korábban leírtak szerint. A szövetteni értékelést két vizsgáló (K.D.J. és Z.S.) egymástól függetlenül végezte, kódolt tárgylemezeken, egy korábban leírt 0-4 fokozatú szövetteni skálán, a károsodott szívizomsejtek és a károsodási fókuszok számának összességén alapuló pontozási rendszer segítségével. A SERCA1 immunreaktivitást nyílt forráskódú képalkotó szoftverrel (ImageJ 1.8-as verzió) határoztuk meg, és a látómezőnként látható immunreakció-pozitív sejtek százalékos arányában fejeztük ki.

II. kísérletsorozat

A CH₄ *in vitro* hatásainak vizsgálata anoxia okozta stressz során és a mitokondrium membrán potenciál-változásainak értékelése

Az oldott CH₄ hatását patkány szívizomsejtek izolált mitokondriumain vizsgáltuk anoxia-reoxigenizáció (A/R) alatt. A kísérleti protokollt az ÁTET V./148/2013-as engedélyszámmal jóváhagyta.

Kísérleti elrendezés

Az izolált szív mitokondriumokat az alábbiak szerint kezeltük: az anoxiát 100%-os N₂ perszufflációval idéztünk elő 2 órán keresztül egy 2 ml térfogatú küvettában, amely 1 ml respirációs médiumot és 1 ml légeteret tartalmazott. Az anoxiát reoxigenizációs periódus követte (95% levegő és 5% CO₂) 2,2% CH₄ kiegészítéssel vagy anélkül 30 percig (A/R, illetve A/R+CH₄ csoportok) (n=12-16). A kontrollcsoportokban a mitokondriumokat normoxiás (95% levegő és 5% CO₂) küvettában tároltuk a reoxigenizációs idő alatt 2,2% CH₄ hozzáadásával vagy anélkül (normoxia és normoxia+CH₄ csoportok). Ezután a mitokondriumokat HRR vizsgálatnak vetettük alá.

Mitokondriális funkciók vizsgálata

Az Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) nagy felbontású respirométer segítségével vizsgáltuk az izolált szív mitokondriumok oxigénfogyasztását különböző mitokondriális komplexek stimulálása mellett. A mitokondriális hidrogén-peroxid (H₂O₂) termelés meghatározására és a mitokondriális membránpotenciál változásainak kimutatására az Oxygraph-2k fluororespirometriás funkcióját használtuk.

Mitokondriális H₂O₂ termelés

A mitokondriális H₂O₂-felszabadulást, mint a ROS termelődés markerét fluorimetriás eljárással követtük nyomon az Amplex Red/tormaperoxidáz rendszerrel, amely reakció során a nem fluoreszcens Amplex Red a fluoreszcens tulajdonságú rezorufinná oxidálódik. A H₂O₂-termelés kalibrálása ismert mennyiségű H₂O₂-dal történt. Kísérletünkben a ROS termelődést úgy vizsgáltuk, hogy oxidáló szubsztrátokat (10 mM glutamát, 5 mM malát, 20 mM Succ, 5 mM ADP) adtunk a mitokondriumokhoz. Izolált mitokondriumokon a reverz elektrontranszport (RET) által indított H₂O₂-áramlást zárt rendszerben 20 mM Succ hozzáadása után mértük, majd ezt követően 1 µM rotenon (Rot) hozzáadásával blokkoltuk. A reziduális oxigénfogyasztást 1 µM antimycin A (Ama, a III-as komplex inhibitora)

hozzáadása után becsültük meg, mellyel ki tudtuk zárni az oxidatív mellékreakciók hatását. Ezután a szabadgyök-szivárgást a H_2O_2 -termelés és oxigénfogyasztás százalékos arányaként határoztuk meg State 3 légzés során.

Mitokondriális membránpotenciál

A mitokondriális membránpotenciált is fluorimetriás módszerrel mértük fluorofór safranin segítségével. Először $1\mu M$ Rot, $10mM$ Succ és $1\mu M$ CCCP-t adtunk a rendszerhez, végül $1\mu M$ Ama hozzáadásával meghatároztuk a reziduális oxigénfogyasztást (ROX).

EREDMÉNYEK

A transzplantált graftok hemodinamikai paraméterei

A transzplantációt követően az LV ballon térfogatának ("előterhelésének") növekedése emelkedett LVSP-t és dP/dt_{max} -ot eredményezett, melyek közül mindkettő szignifikánsan megnövekedett a CS- CH_4 csoportban a CS-hez képest a legnagyobb előterhelés során mért értékek esetében. A diasztolés funkcióban hasonló változás volt megfigyelhető a nagyobb előterhelési térfogatoknál, ami a CS-hez képest szignifikánsan emelkedett dP/dt_{min} értékeket eredményezett ($p < 0,05$), ami a jobb szívizomrelaxációra enged következtetni. A CBF szintén szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövekedett 60 perc reperfúziót követően a CS- CH_4 -ben tárolt graftok esetében a CS-ben tároltakhoz képest. A HR értékekben nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kísérleti csoportokon belül és a kísérleti csoportok között.

Szívizomsejtek mitokondriális funkciója

A II-es komplexhez kapcsolt légzés szignifikánsan magasabb volt a CS- CH_4 csoportban, mint a CS csoportban 60 perccel a reperfúziót követően. Telítő ADP dózis alkalmazása után az OxPhos szignifikánsan magasabb volt a CS- CH_4 csoportban. A mitokondriális membránban kötött enzim exogén citokróm c-vel történő helyettesíthetőségét exogén adagolt citokróm c hatására vizsgáltuk. A CS- CH_4 csoportban a citokróm c felszabadulása a membránból szignifikánsan alacsonyabb volt a CS-hez képest.

Szívizom ER stressz- és apoptózis-asszociált gének expressziója

A hipoxia- és ER stressz-asszociált gének ($Hif-1\alpha$, CHOP, GSK- 3β és VLDLr) relatív mRNS-expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a CS- CH_4 csoportban. A kaszpáz-3 és kaszpáz-9, valamint a pro-apoptotikus Bax expressziója nem csökkent szignifikánsan. Az anti-apoptotikus Bcl2 és a Bax/Bcl2 expresszió aránya azonban jelentősen különbözött a CS- CH_4 csoportban, ami az anti-apoptotikus útvonalak relatív dominanciáját jelzi.

Biokémiai oxidatív stressz markerek

Az XOR kulcsfontosságú enzim a reperfúzió által kiváltott ROS termelésben, emellett katalizálhatja a nitrátok és nitritek redukcióját. A XOR aktivitás és a szöveti NO_x-szintek egyaránt szignifikánsan csökkentek a CS-csoporthoz képest, amikor CS-CH₄-t alkalmaztunk a hideg iszkémia alatt. Az MPO-t főként az aktivált polimorfonukleáris sejtek (PMN) termelik. A szöveti MPO szint szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoportéhoz képest, ugyanakkor az MPO aktivitás szignifikánsan csökkent CS-CH₄ hatására. A GSH/GSSG arány az oxidoreduktív stressz egyik legfontosabb markere. Ez az arány szignifikánsan csökkent a CS csoportban; a graftok CS-CH₄-ben történő konzerválása azonban magasabb GSH/GSSG arányt eredményezett.

Szöveti vizsgálatok

A H&E festés a CS csoportban csak enyhe myofibrilláris dezorganizációt mutatott a kontrollhoz képest, ami a barázdák elvesztésével, valamint a myofibrillumok hullámosságával, összehúzódsági sávokkal és a myociták plazmamembránjának felbomlásával járt. A szívizomsejtek felépítése a CS-CH₄ csoportban közel normális volt. Ezen változások nem különböztek szignifikánsan a CS csoportban tapasztaltaktól, ami a két oldat közel azonos szövetvédelmi potenciálját jelzi. A SERCA1 immunreaktív szívizomsejtek száma jelentősen megnőtt a CS-tárolt graftokból származó metszetekben a kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a CS-CH₄ csoportban az immunreaktív sejtek száma jelentősen csökkent a CS csoportéhoz képest.

A CH₄ *in vitro* hatásai anoxiás stressz során és a mitokondriális membránpotenciál változásainak értékelése

A mitokondriális membrán potenciál-változásait a potenciálérzékeny fluorofór safranin segítségével jellemeztük. A légzőkomplexek szubsztrátjai normoxiás körülmények között jelentős hiperpolarizációt okoztak a mitokondriális membránban. Ez a kiváltott hiperpolarizáció az A/R-csoportban megszűnt. A membránpotenciál szubsztrát okozta változásait a CH₄ kezelés részben konzerválta. Az anoxiás periódus alatt alkalmazott CH₄ csökkentette a mitokondriumon keresztül keletkezett H₂O₂ mennyiségét. Az oxigénfogyasztás szempontjából külön vizsgáltuk az I-es és II-es komplexhez kapcsolt légzést. A CH₄ jelentősen csökkentette az I-es komplex oxigénfogyasztását, míg a II-es komplexhez kapcsolt légzésre normoxiás körülmények között nem volt hatással. Ezzel szemben a CH₄-kezelés az A/R+CH₄ csoportban jelentősen javította a II-es komplex oxigénfogyasztását az I-es komplexhez képest.

Extramitokondriális Ca^{2+} -kiváltotta membránpotenciál-változások

Az extramitokondriális Ca^{2+} által normoxiás és anoxiás környezetben kiváltott membránpotenciál-változásokat izolált szív mitokondriumokban fluoreszcens szenzorral (gerjesztés 465 nm; a szenzor erősítése: 1000 és polarizációs feszültség: 500 mV) nagy felbontású fluororespirométeren értékeltük. A safranin négylépcsős titrálása után 100 μl mintát töltöttünk a kamrákba. Ezután a mitokondriumokhoz 1 μl 0,5 μM Rot és 20 μl 10 mM Succ-t adtunk. A fluoreszcens festék érzékenységét 20 μl 20 mM CaCl_2 exogén adagolásával követtük nyomon háromlépcsős titrálás során egészen a plató eléréséig. A Ca^{2+} jelet 1 μl 1 μM Ama hozzáadásával megszüntettük. A Ca^{2+} áramlás okozta membránpotenciál-változásokat a fluoreszcens jel változásának sebességeként és az átlagos nyugalmi fluoreszcencia változásaként fejeztük ki.

Az anoxiára adott hiperpolarizációs válasz mértéke kevésbé volt szembetűnő a normoxiás csoporthoz képest. Ez valószínűleg a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusokon (mPTP) keresztül történő nem szelektív Ca^{2+} kiáramlásnak volt köszönhető. A CH_4 -kezelés azonban szignifikánsan alacsonyabb Ca^{2+} kiáramlást eredményezett. Ezek az eredmények összhangban vannak a membránpotenciál-mérésekkel, ahol a mitokondriumok 2,2%-os CH_4 -nal történő kezelése fenntartotta a hiperpolarizációt. Érdekes módon a CH_4 kezelés a normoxiás csoportban a Ca^{2+} kiáramlás esetében nem mutatott relációt a membránpotenciál mérésekben megfigyelt szubsztrát-okozta változásokkal. Megjegyzendő, hogy ezek még előzetes eredmények, mivel ezen módszert eredetileg extramitokondriális Ca^{2+} mozgások mérésére fejlesztették ki máj mitokondriumokon. A Ca^{2+} -áramok nagysága eltérő lehet a szív mitokondriumaiban; ezért módszerünk további validálást igényel.

MEGBESZÉLÉS

A szívizom különösen rosszul tűri a hosszan tartó iszkémiát, emiatt a graftok tárolási ideje és módja a transzplantáció egyik fő kérdése. A klinikai gyakorlatban a CS oldatot használják, ezért kísérleti körülmények között is ideális az ilyen irányú vizsgálatokra. Nem újkeletű ötlet, hogy különböző gázmediátorokat (például NO-t, szén-monoxidot (CO) vagy hidrogén-szulfidot (H_2S)) oldatok adalékaként próbálnak ki szervtranszplantációs modellben. Feltételezéseink szerint hatékonyságuk összefügghet azzal, hogy az oldatban vagy akár a szervben levő biológiailag fontos molekulákkal kölcsönhatásba lépnek. A CH_4 előnye, hogy *in vivo* körülmények közt nem toxikus; egyszerű aszfixiás gáznak tekinthető, ami azzal jár, hogy hipoxiát okozhat olyan esetben, amikor a növekvő CH_4 koncentráció kiszorítja a rendszerben jelen lévő belélegzett levegőt, ezáltal csökkentve az oxigén koncentrációját.

Továbbá rendelkezésre állnak olyan adatok is, melyek igazolják CH_4 élő rendszerekben betöltött szabályzó szerepét a NO -, CO - és H_2S -hoz kapcsolható élettani és biokémiai reakciókon keresztül.

A keringés leállása után a mitokondriumok kimerülése nagyban hozzájárul a Ca^{2+} beáramlás okozta membrán működési zavar kialakulásához. A CH_4 dúsítás eredményeként a mitokondriumok nagyobb hatásfokkal hasznosították az ADP-t, ami hozzájárult az elegendő OxPhos fenntartásához. Továbbá csökkent a citokróm c felszabadulása is, ami a mitokondrium belső membránjának kisebb mértékű sérülését jelzi. A hideg iszkémia által kiváltott sejtkárosodás folyamata az ER és a mitokondrium kettős, egymástól függő szerepével viszonylag jól jellemezhető. A hipoxia megváltoztatja a sejt plazma nyugalmi potenciálját, és az ER által közvetített Ca^{2+} transzport aktiválásán keresztül növeli a Hif-1 α expresszióját, amely az egyik kulcsfontosságú tényező a létrejött intracelluláris láncreakcióban, mely végül a sejt apoptózisához vagy nekrozisához vezet. Eredményeink azt mutatják, hogy a hideg iszkémia és a graft hideg körülmények közt történő tárolása aktiválta az ER-mitokondrium stresszfolyamatot a szívműködési sejtekben, kezdve az ER fokozott Ca^{2+} pumpa működését jelző emelkedett SERCA1 fehérjeszinttől, egészen a Hif-1 α fokozott expressziójáig. Emellett a magasabb sejten belüli Ca^{2+} -szint aktiválhatja a belső, mitokondriális apoptotikus útvonal pro-apoptotikus faktoraként szolgáló GSK-3 β -t. Ennél is fontosabb, hogy a CH_4 -nal dúsított transzplantációs oldatban a korábban említett jelátviteli útvonal egyes génjeinek expressziója is csökkent.

Részletesen vizsgáltuk az I-es és II-es komplex iszkémiát követően a szívműködési mitokondriális légzésében betöltött szerepét. A CH_4 -kezelés gátolta a glutamát + malát stimulált I-es komplex aktivitást, míg a Succ okozta II-es komplex aktivációra nem volt hatással. Következésképpen, a CH_4 csökkent elektronáramlást eredményezett az I-es komplexen keresztül, de nem változtatta meg a Succ elektronáram-mediált oxidációját a II-es komplex esetében. Ezen eredmények alapján CH_4 jelenlétében a mitokondriumok nettó ROS-termelésének csökkenése megtartott Succ-oxidáció mellett valószínűleg közvetlenül az I-es komplex gátlásával függ össze. Úgy tűnik, hogy a CH_4 izoláltan az I-es komplex elektronszállító képességét blokkolja, ellentétben az oxidatív metabolizmus reoxigenizáció során zajló teljes gátlással.

A CH_4 által kiváltott protektív hatás valószínűleg az I-es komplexen keresztüli elektronáram akadályozásán és a ROS-termelés csökkenésén keresztül valósul meg. Az I-es komplex reverzibilis deaktivációja egy belső mechanizmus, amely fiziológiai körülmények közt is

biztosítani képes az ETC gyors válaszát a környezet oxigénhiányára. Az ezt követő reoxigenizáció azonban a hirtelen légzési robbanás miatt ROS termeléshez vezet. Normoxiás körülmények között a magas NADH-szint a NADH-kötő alegység közelében elhelyezkedő flavin-mononukleotid-résznél biztosíthatja az előre irányuló elektronáramlást szuperoxid-termelődés kíséretében. Reoxigenizáció során az ubikinol és a megnövekedett protonmotoros erő által kialakított reverz elektronáramlás (RET) ROS-t hozhat létre, hiszen az elektronok visszaáramlanak az ubikinolból az I-es komplex irányába. A CH₄-kezelés korlátozza az I-es komplexen keresztül történő előre irányuló elektrontranszfert a kontroll mitokondriumokban, míg a RET-t hatékonyan gátolja a poszt-iszkémiás mitokondriumokban.

A mitokondriális I-es komplexnek két különböző katalitikus aktivitású konformációja van: egy aktív (A) és egy deaktivált (D) állapot, amelyek fiziológiás körülmények között 9:7 egyensúlyi arányban vannak jelen. Az A/D átalakulás iszkémia/anoxia során gyorsan következik be, biztosítva az ETC gyors válaszát a hirtelen oxigénhiányra. Az A/D átalakulást szabályzó tényezők közé tartozik az oxigén biológiai hozzáférhetősége, a mátrixban lévő NADH mennyisége, illetve a hőmérséklet és a pH. Az anoxiás körülmények közt felhalmozódó D-konformáció fiziológiai szerepe valószínűleg az, hogy megvédje a mitokondriumokat a reoxigenizációt követő légzésrobbanás okozta ROS-termelődéstől. Az I-es komplex D-konformációban történő átmeneti megőrzését korábbi kísérletek sikeresen alkalmazták a reperfüziós károsodás ellen poszt-iszkémiás agyban és szívben. Bár iszkémiás/anoxiás körülmények között a teljes NAD mennyiség csökken, a flavin helyén lévő nukleotidot közvetlenül az ubikinolból redukálhatja a RET a reoxigenizáció kezdetén.

AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Kísérleteink alapján a transzplantációs oldat CH₄-dúsítása a graft fokozott védelmét eredményezi a hideg iszkémiás szervkárosító folyamatokkal szemben patkány szívtranszplantációs modellben.
- A CH₄ tartalmú CS hatékonyan csökkenti a szívizomban lezajló oxido-reduktív stresszt, melyet a szívizom csökkent GSH/GSSG arányaként, alacsonyabb NO_x-szintjeként, valamint a csökkent szöveti MPO- és XOR-aktivitás mértékeként jellemeztünk.

- A CH₄ hatása mögött álló mechanizmus a CH₄ ER stresszre és a mitokondriumok strukturális és funkcionális integritására gyakorolt hatásával függ össze.
- A mitokondriumok és az ER közötti kölcsönhatás az extramitokondriális Ca²⁺ áramlásban bekövetkező változás miatt jöhet létre.
- A Ca²⁺ által kiváltott mitokondriális membránpotenciál-változások anoxia hatására csökkennek, a CH₄ azonban képes helyreállítani a hiperpolarizáció nagyságát.
- A CH₄ antioxidatív hatását az I-es komplex elektronszállításának részleges blokkolásával fejt ki, csökkentve ezzel a mitokondriális ROS termelést.