

Az OTKA-hoz 2012.-ben „**A nitrogén monoxid szabályozó szerepe az akut iszkémia és reperfúzió okozta aritmia-mechanizmusokban**” címmel benyújtott pályázatban ismertetett kutatási tervet megvalósítása során a következő eredményeket értük el

A kutatási tervet három főbb témakör vizsgálatát tűzte ki célul; mindhárom téma a nitrogén monoxid (NO) hatásainak és szabályozó szerepének vizsgálatához kapcsolódik.

A pályázatban ismertetett főbb témakörök a következők voltak:

1. Az anorganikus nitrit hatásának és mechanizmusának vizsgálata az iszkémia és reperfúzió okozta kamrai aritmiákra.
2. Az akut statin kezelés hatásának és mechanizmusának vizsgálata az iszkémia és reperfúzió okozta kamrai aritmiákra.
3. A nitrogén monoxid gap junkciós csatornákat szabályozó szerepének további vizsgálata.

Ad 1. Számos közlemény igazolja, hogy a szervetlen nitritek és nitrátok, a szerves molekulákhoz hasonlóan, nitrogén monoxid leadására képesek, különösen savas kémiai közegben. Ilyen közeg alakul ki iszkémia alatt, amikor a szívizom hipoxia/anoxia következtében a szívizomsejtek pH-ja csökken és ez a közeg elősegíti a nitrát/nitrit/NO redukciós kaskád működését, azaz a nitritből NO képződik. Ilyenformán a kívülről bevitt vagy a vérben keringő nitrit NO raktárként működhet, amely szabad NO-t biztosíthat olyan körülmények között is, amikor az enzimatis NO szintézis az iszkémia következtében károsodik.

Kísérleteink első részében vizsgáltuk, vajon a nátrium nitrit olyan kis koncentrációban történő adása, amely sem a hemodinamikai paramétereket (artériás vérnyomás, balkamrai nyomás és kontraktilitás, szívfrekvencia), sem a koszorúér keringést nem befolyásolja, valamint nem okoz számottevő methemoglobin képződést, miképpen hat a 25 perces koszorúér okklúzió, majd reperfúzió során fellépő kamrai aritmiákra, altatott kutyákban. Kimutattuk, hogy a nátrium nitrit intravénás infúziója ($0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), akár a koszorúér okklúziója előtt, akár a reperfúziót megelőzően adva, számottevően csökkentette az okklúzió és reperfúzió során megjelenő kamrai aritmiák számát és súlyosságát és növelte az iszkémia/reperfúziós inzultust túlélő állatok arányát. A túlélők száma különösen magas volt (93%, szemben a kontroll csoporttal, ahol túlélés nem volt), amikor a nátrium nitrit infúzióját 10 perccel a reperfúziót megelőzően indítottuk. Kollaborációs partnereink segítségével (Dr. Elizabeth Murphy és munkatársai, Systems Biology Centre, National Heart Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) vizsgáltuk, vajon ez a jelentős antiaritmiás hatásban milyen mechanizmusok játszanak szerepet. Megállapítottuk, hogy a kardioprotektív hatás, legalábbis részben, a nitritből keletkező NO általi fehérje S-nitroziláción és S-glutathioniláción keresztül valósul meg. Eredményeinket több külföldi és hazai kongresszuson ismertettük és 2015-ben a PLOS ONE-ban közzétettük (1).

A vizsgálataink második része arra irányult, hogy felderítsük vajon a nátrium nitrit, a prekondicionáláshoz hasonlóan, képes-e késői védőhatás kialakítására az iszkémia és reperfúzió okozta kamrai aritmiákkal szemben. Ezekben a kísérletekben az első nap felületes narkózisban az állatok $0.2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ koncentrációban nátrium nitritet kaptak intravénás infúzióban, majd 24 órával később (második nap) a kutyákat ismételt elaltattuk és a koszorúér 25 percre elzártuk, amit gyors reperfúzió követett. Megállapítottuk, hogy a nátrium nitrit számottevő késői antiaritmiás hatással rendelkezik; szignifikánsan csökkent az okklúzió alatt megjelenő kamrai aritmiák számát és gyakoriságát, valamint azok súlyosságát és emeli a túlélő kutyák arányát (2, 3). A nátrium nitrit késői antiaritmiás hatásában szerepet játszó mechanizmusok felderítésére két további kísérletsorozatot terveztünk. Elsőként vizsgálatuk, vajon a nátrium nitrit, a prekondicionáláshoz hasonlóan, a NO- indukálta NO

szintézis fokozásán keresztül váltja ki a kardioprotektív hatását. Ezekben a vizsgálatokban mértük az indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) aktivitását, az enzim szelektív gátlószerének az S-(2-aminoethyl)-isothiourea (AEST; teljes dózis: 2.0 mg/kg; i.v.) hiányában és jelenlétében, nátrium nitrittel kezelt kutyákban. A vérplazma nitrit/nitrát szintjének mérésével megállapítottuk, hogy a nátrium nitrit beadását követően, annak legalábbis egy része, a nitrit reduktázok (deoxi-hemoglobin és xanthine oxidoreductase) által NO-vá alakul még normoxiás körülmények között is. Az így keletkezett NO képes az iNOS aktiválására, és ezt az aktivációt az AEST teljes mértékben megszünteti. Ennek ellenére, a nitrit késői antiaritmiás hatása csak részben csökken, ami arra utal, hogy az iNOS aktiváció, ellentétben a prekondicionálással, csak másodlagos szerepet játszik a nitrit késői antiaritmiás hatásában. Feltételezésünk szerint, amit a nitrit/nitrát szintek mérése is igazolt, a nitrit nagyobb része a beadást követően nitráttá alakul, és 24 órán keresztül nitrát formában cirkulál a vérben. Iszkémia hatására, amikor az oxigén ellátás és a pH csökken, a nitrát nitritté majd NO-vá redukálódik, ilyenformán biztosítva a szívizomban egy megfelelő NO szintet iszkémiás körülmények között is, amikor az oxigén hiányában az enzimatis NO képződés csökkent vagy gátolt lesz. Eredményeinket a Canadian Journal of Physiology and Pharmacology közlésre elfogadta és jelenleg on-line verzióban a közlemény elérhető (4).

A vizsgálatok második része arra irányult, hogy megvizsgáljuk vajon a nátrium nitrit késői antiaritmiás hatásában szerepet játszi-e a mitokondrium morfológiájában és funkciójában, iszkémia és reperfúzió hatására bekövetkező változások, módosítása. Ezekben a kísérletekben, a 24 órával korábban nitrittel kezelt és nem kezelt (kontroll) csoportok állataiból a 25 perces iszkémia/reperfúziót követően, a reperfúzió 2. percében a leállított szívekből szövetmintákat vettünk további *in vitro* mérések céljából. A morfológiai vizsgálatokat transzmissziós elektronmikroszkópiával végeztük a Szegedi Biológiai Kutató Biofizikai Intézetének munkatársai segítségével. A mitokondriumok légzési funkciójában, illetve ATP szintézisében bekövetkező változásokat Clarke elektróddal és biolumineszcenciás módszerrel mértük. Megállapítottuk, hogy a nátrium nitrit 24 órával az iszkémiát megelőzően adva szignifikánsan csökkenti az iszkémia/reperfúzió okozta mitokondriális szerkezeti elváltozásokat; csökkenti a mitokondriumok duzzadását, megőrzi a mitokondrium állományának szerkezetét, valamint mérsékeli a mitokondrium területében, átmérőjében iszkémia/reperfúzió hatására bekövetkező csökkenést és a gömbformálódás növekedést. Ugyanakkor a nitrit hatására tovább csökkent a complex-1 függő mitokondriális oxidatív foszforiláció kapacitása (OXPHOS) és a légzési kontroll arány (respiratory control ratio). Ezen utóbbi a mitokondriális működés klasszikus paramétere, mely az oxigén felhasználás és oxidatív foszforiláció közötti kapcsolatot mutatja. Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a nátrium nitrit, nagy valószínűséggel a complex I-re hatva megakadályozza, hogy az elektrontranszport láncan keresztül az elektron a szabadgyökök képződéséért felelős complex III-ra jusson. Ennek következtében, a reperfúzió korai szakában csökken az oxigén szabadgyökök képződése, amely magyarázata lehet a reperfúziós aritmiák nitrit kezelés általi csökkentésének. Eredményeiket a Molecular Cell Biochemistry-ben szeretnénk leközölni. Jelenleg a kézirat elkészítése folyamatban van.

A nitrogén monoxid szabályozó szerepének hosszú évekre visszatekintő tanulmányozása során többször is felmerült, hogy megvizsgáljuk, miképpen alakul a nitrogén monoxid szintáz (NOS) enzim aktivitása prekondicionálás hatására. Ennek a feladatnak az elvégzésére nyílt lehetőségünk Dr. Gardi Jánossal (Szegedi I. sz. Belklinika) történő kollaborációs munka keretében. Kimutattuk, hogy a prekondicionáló inger hatására a NOS enzim jelentős mértékben aktiválódik, amelynek következtében iszkémia alatt jobb lesz a NO okklúzió alatti biológiai hozzáférhetősége. Eredményeinket absztrakt formában a Cardiovascular Researchben (5), a kéziratot egy újonnan induló folyóiratban, a Current Research in

Cardiology-ban közöltük (6). A közlemény részét képezte Juhász László Ph.D. értekezésének, amelyet 2015-ben védett meg (7).

Ad2. A pályázat új projektjeként indult a statinok, jelen esetben a simvastatin, akut adásának az iszkémia/reperfúzió okozta szívritmuszavarokra gyakorolt hatásainak vizsgálata. Ennek előzménye volt, hogy krónikus statin kezelést követően, számottevő antiaritmiás hatást tapasztaltak különböző szívbetegségekben szenvedő betegekben. Mind a humán, mind a kísérletes adatok arra utaltak, hogy a statinok antiaritmiás hatása független a koleszterincsökkentő hatástól, azaz a kedvező hatás nem hiperkoleszterolémiás betegekben is kimutatható. Ezen megfigyelések alapján feltételezték, majd kísérletesen igazolták, hogy a statinok egyéb, ún. pleiotróp hatással rendelkeznek, amelynek a hátterében az endotheliális NOS(eNOS) aktivációja áll. Ebből a hipotézisből kiindulva, kísérleteket terveztünk annak megállapítására, hogy vajon az egyetlen alkalommal adott simvastatin képes-e és ha igen, milyen módon befolyásolja az akut iszkémia és reperfúzió okozta súlyos kamrai aritmiákat. Kimutattuk, hogy a koszorúér okklúziója előtt egyetlen alkalommal adott simvastatin injekció, számottevően csökkentette a kamrai aritmiákat, az iszkémia súlyosságát, fokozta az eNOS aktivitását és mérsékelte a reperfúziót követő szabadgyök képződést. Miután a simvastatin antiaritmiás hatása, legalábbis részben, az eNOS gátló L-NAME jelenlétében megszűnt, igazoltuk, hogy a simvastatin az eNOS aktiválásán keresztül hozza létre jótékony hatását. Érdekes megfigyelés volt, hogy L-NAME jelenlétében a simvastatin okklúziós kamrafibrillációt csökkentő hatása azonban megmaradt, ami arra utal, hogy a kamrafibrilláció mechanizmusának a többi aritmia-típustól eltérő különbözősége miatt, a simvastatin fibrillációra gyakorolt hatásában ugyancsak más mechanizmust részvétele is fontos lehet. Erre a kérdésre a simvastatin direkt elektrofiziológia paraméterekre gyakorolt hatásainak felderítése adhat választ. Ezeket az eredményeinket hazai és külföldi kongresszusokon ismertettük és az European Journal of Pharmacologyban 2014-ben publikáltuk (8).

Ennek a munkának folytatásaként vizsgáltuk az eNOS simvastatin általi aktivációjának mechanizmusát. Ismeretes, hogy az eNOS gyors aktiválódásában szerepe lehet az Akt/IP-3 kináz útvonal aktivációjának. Ennek ismeretében vizsgálni kívántuk, hogy vajon a simvastatin által előidézett eNOS aktiválódás ezen az útvonalon keresztül valósul meg. Ehhez az IP-3 kináz gátlószert a wortmannint alkalmaztuk. Kimutattuk, hogy hasonlóan az L-NAME-hez, a wortmannin, az okklúziós kamrafibrilláció kivételével, a simvastatin minden kedvező hatását megszüntette. Ez arra utal, hogy a simvastatin az Akt/IP-3 kináz/ eNOS útvonal aktiválásán keresztül hatva, fokozza az NO termelődését. A NO okklúzió alatti jobb biológiai hozzáférhetősége hozzájárul ahhoz, hogy simvastatin kezelést követően csökkennek az okklúzió és reperfúzió okozta aritmiák. Ezeket az eredményeket szintén az European Journal of Pharmacologyban publikáltuk (9) és a két közlemény alapján Kisvári Gábor elkészítette Ph.D. értekezését, amelyet 2017. március 17.-én fog védeni (10).

Ad. 3. A 2012-2016 évekre benyújtott pályázatunk részét képezték az előző időszakról (2008-2012) átnyúló, annak folytatását jelentő vizsgálataink. Ennek egyik fontos kérdése volt a gap junkciós csatornák szerepének további vizsgálata az akut iszkémia és reperfúzió okozta aritmiákban. Ennek kapcsán vizsgáltuk a NO, gap junkciós csatornákra gyakorolt szabályozó szerepét. A gap junkciós csatornák aritmogenezisben játszott szerepének, illetve a NO gap junkciós csatornákat szabályozó tulajdonságának felderítésére végzett kutatómunka eredményeként született meg Gönczi Márton Ph.D. értekezése (10). Ugyancsak a témakörben korábban végzett munkánk elismeréseként felkérést kaptunk, hogy a NO szabályozó szerepére vonatkozó eredményeinket a Frontiers in Pharmacology, gap junkciós csatornákkal foglalkozó speciális kötetéhez csatlakozva közöljük (11).

A jelen pályázati időszakban, ebben a témakörben vizsgáltuk, hogy a gap junkciós csatornák zárása carbenoxolonnal miképpen befolyásolja a szívingerléssel előidézett prekondicionálás

késői antiaritmiás hatását. Eredményeinket 2014-ben nemzetközi kongresszuson ismertettük (12, 13) és a *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*-ban közöltük (14). Az első pontban ismertetett, szervesetlen nitrítékkal végzett vizsgálatainkhoz kapcsolódóan, megvizsgáltuk, hogy a nátrium nitrít késői antiaritmiás hatása köthető-e a NO, gap junkciós csatornákra gyakorolt hatásához. Megállapítottuk, hogy a nátrium nitrít késői antiaritmiás hatása, legalábbis részben, a gap junkciós csatornákra gyakorolt hatáson keresztül valósul meg. Az eredményeinkből készült kéziratot az *Acta Biologica Hungarica* közlésre elfogadta, a közlemény megjelenése 2017 elején várható (15).

Vizsgálatokat folytattunk arra vonatkozóan is, hogy megállapítsuk, vajon a szívingerlés miképpen módosítja a gap junkciós csatornákat felépítő connexin 43-nak az interkaláris lemezen belül, más fehérjékkel való kapcsolódását (16). Továbbá, Szépe Tamás (SZTE, Informatikai Intézet) segítségével kidolgoztunk egy programot, amely segítségével a konfokális mikroszkópos felvételeken lehetővé vált a gap junkciós kapcsolatok automatikus értékelését (17).

Ugyancsak a korábban elkezdett munkánknak a jelen pályázati periódusban történő befejezéseként született meg az a közlemény, amelyben a gén expresszió időbeni változását vizsgáltuk szívingerléssel prekondicionált kutyákban (18). A génexpressziós változások vizsgálatából származó eredmények alapján készült el, és 2013-ban sikeresen védte meg Kovács Mária Ph.D. értekezését (19).

A 2012-2016 között, az OTKA (majd később NKFIH) által támogatott kutatások sikeres befejezéséhez nagyban hozzájárultak a munkacsoportban dolgozó szakdolgozatukat és Ph.D. értekezésüket készítő hallgatók. Munkánkat azonban hátráltatta, hogy a projekt időtartama alatt nehézségekbe ütköztünk a kísérleti állatok beszerzésében. Köszönjük az NKFIH-nak kutatásaink támogatását és hogy hozzájárultak, hogy a projekt időtartamát 2017. február 28.-ig meghosszabbíthassuk.