

## Zárójelentés

“A szívizom-kontraktilitás endogén peptiderg szabályozó mechanizmusainak vizsgálata”

című, K 69118 számú OTKA pályázatról

A pályázati munkatervvel összhangban a tervezett vizsgálatok megvalósultak. A született eredmények zöme közlésre került, egyesek előkészítés illetve revízió alatt állnak.

### **Kutatási eredmények rövid összefoglalása:**

#### **I. Mitogénaktivált-proteinkinázok szerepe a kamrai kontraktilitás szabályozásában:**

A krónikus szívelégtelenség a vezető halálokok közé tartozik a fejlett országokban. A kamrai szisztolés diszfunkció kezelésében központi szerepet játszanak az intravénásan alkalmazott pozitív inotrop szerek. A leggyakrabban használt szerek közé a béta-adrenerg agonisták és a foszfodiészteráz gátlók tartoznak, melyek a cAMP szint növelésén keresztül hozzák létre a hatásukat. Rövidtávon dramatikus módon javítják a balkamra-funkciót és csökkentik a klinikai tüneteket, azonban hosszú távú alkalmazásuk rontja a betegek túlélési esélyeit. Ennél fogva alapvető fontosságú, hogy új, kedvezőbb hatásprofilal rendelkező jelátviteli utakat azonosítsunk, melyek előnyösen képesek befolyásolni a kamrai kontraktilitást. Munkánk során a mitogén-aktiválta protein kinázok családjába tartozó extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK1/2) és a p38 mitogénaktivált-proteinkináz (p38-MAPK) szerepét vizsgáltuk a kamrafunkció regulációjában. Izolált patkányszíven nyert eredményeink szerint ezen MAPK-ok ellentétes hatással rendelkeznek, míg az ERK1/2 fontos szerepet játszik az endothelin-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében, addig a p38-MAPK aktivációja negatívan modulálja azt. Kimutattuk, hogy az epidermális növekedési faktor-receptor az ERK1/2 proximális szabályozójaként, míg a p90 riboszómális S6 kináz/Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger jelátvivő útvonal az ERK1/2 effektoraként funkcionál. Továbbá, a p38-MAPK a szarkoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPáz funkcióját szabályozó foszfolambán defoszforilációja révén csökkentheti a kamrai kontrakciós erőt. Eredményeink felvetik, hogy az ERK1/2 jelátviteli út aktiválása, illetve a p38-MAPK gátlása a szívizom-kontraktilitás fokozásának új útjait jelenthetik (Szokodi és mtsai, Circulation. 2008).

#### **II. Reaktív oxigén gyökök szerepe a kamrai kontraktilitás szabályozásában:**

Krónikus szívelégtelenségben a fokozott oxidatív stressz fontos szerepet játszik a kamrai diszfunkció létrejöttében. Azonban a reaktív oxigén gyökök (ROS) funkcionális jelentősége a fiziológiás folyamatok regulációjában nagyrészt ismeretlen a szívben. Jelen munkánk célja az endogén ROS termelés és az általuk aktivált szignál mechanizmusok szerepének vizsgálata volt a szívizom-kontraktilitás regulációjában. A  $\beta_1$ -adrenerg agonista dobutamin (250 nmol/L) pozitív inotrop hatását szignifikánsan fokozta az antioxidáns N-acetilcisztein (500  $\mu$ mol/L) ( $P < 0.01$ ) és a NAD(P)H oxidáz gátló apocynin (100  $\mu$ mol/L) ( $P < 0.05$ ) izolált patkányszív modellen. Továbbá, a dobutamin-indukálta foszfolambán

foszforilációt jelentősen fokozta a NAD(P)H oxidáz gátlás. Az ET-1 (1 nmol/L) intrakoronáriás infúziója szignifikáns mértékben fokozta a ROS termelődést ( $P < 0.05$ ), melyet az N-acetilcisztein teljes mértékben kivédett ( $P < 0.05$ ). Az N-acetilcisztein és a szuperoxid-dizmutáz MnTMPyP (10  $\mu$ mol/L) 33%-kal ( $P < 0.001$ ) illetve 35%-kal ( $P < 0.05$ ) csökkentette az ET-1 pozitív inotrop hatását. A NAD(P)H oxidáz gátló apocynin 36%-kal ( $P < 0.001$ ) gyengítette az ET-1 inotrop effektusát. Továbbá, az ET-1 szignifikánsan fokozta az ERK1/2 foszforilációját ( $P < 0.001$ ). Az ERK1/2-t aktiváló MEK1/2 specifikus gátlószere, az UO126 (1.5  $\mu$ mol/L), kivédte az ET-1 által indukált ERK1/2 foszforilációt, valamint 49%-kal csökkentette a peptid inotrop hatását ( $P < 0.05$ ). Végezetül, az N-acetilcisztein ( $P < 0.01$ ) és az MnTMPyP ( $P < 0.001$ ) szignifikánsan redukálta az ET-1 effektusát az ERK1/2 foszforilációra. Eredményeink szerint a reaktív oxigén gyökök, mint jelátvivő molekulák, szerepet játszanak a fiziológiás folyamatok szabályozásában a miokardiumban. A NAD(P)H oxidáz termelte ROS kettős funkciót tölt be a szívizom-kontraktilitás regulációjában. Adataink szerint a  $\beta_1$ -adrenerg receptorok stimulációjakor fellépő pozitív inotrop hatást markánsan ellensúlyozza a szimultán fokozódó ROS termelődés a foszfolambán foszforiláció csökkentése révén. Másrészt, az ET-1 pozitív inotrop hatását részben a NAD(P)H oxidáz által termelt ROS molekulák közvetítik az ERK útvonal aktivációján keresztül (Kubin és mtsai, *J Mol Cell Cardiol.* 2011; Perjés és mtsai, *Acta Physiol (Oxf.)*. 2012).

### **III. Az nNOS-eredetű NO szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában:**

A nitrogén-monoxid (NO) fontos modulátora a szív pumpafunkciójának, ugyanakkor a neuronális típusú NO szintetáz (nNOS) szerepe a szívizomban ellentmondásos. Jelen munkánkban arra kerestünk választ, hogy az endogén nNOS miként befolyásolja az ET-1 pozitív inotrop válaszát, valamint ezen hatását milyen mechanizmusokon keresztül valósítja meg. Izolált patkányszíven az ET-1 (0.5 nmol/L) pozitív inotrop hatását szignifikánsan fokozta a nem szelektív NOS inhibitor N-nitro-L-arginin metilészter (L-NAME, 300  $\mu$ mol/L) és a szelektív nNOS inhibitor S-metil-L-tiocitrullin (SMTC, 3  $\mu$ mol/L). Hasonlóan, a szolubilis guanilátcikláz inhibitor ODQ (10  $\mu$ mol/L) és a proteinkináz-G (PKG) gátló KT5823 (100 nmol/L) felerősítette az ET-1 inotrop hatását. Továbbá, az ET-1 fokozta a cGMP bal kamrai szintjét, mely hatást az L-NAME és az SMTC kivédett. A foszfodiészteráz 5A gátló sildenafil (1  $\mu$ mol/L) szignifikánsan növelte az ET-1 (1 nmol/L) hatását a szöveti cGMP szintre, valamint ezzel párhuzamosan markánsan gyengítette az ET-1 inotrop effektusát. Eredményeink szerint az nNOS-eredetű NO ellensúlyozni képes az ET-1 pozitív inotrop hatását. Adataink arra utalnak, hogy az nNOS által termelt NO a szolubilis guanilátcikláz–cGMP–PKG jelátviteli út aktivációján keresztül modulálja az ET-1 hatását a kontraktilitásra. (Kubin és mtsai, 2012, előkészületben).

### **IV. Az extracelluláris szignál-regulált kináz szerepe az adrenomedullin pozitív inotrop hatásában:**

Az ERK1/2 abnormális aktivációja központi szerepet játszik a karcinogenezisben. Jelenleg klinikai vizsgálatokban tesztelik egyes kis molekulású MEK1/2 inhibitorok (ERK1/2 proximális aktivátorai) hatékonyságát daganatos betegségekben. Az ERK1/2 fiziológiás szerepe a szívben nagyrészt ismeretlen. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az adrenomedullin (AM) nevű peptid egyike a szívizom-kontraktilitás legpotensebb aktivátorainak, azonban hatásának pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy

az AM direkt szívhatásának közvetítésében milyen szerepet játszik az ERK1/2. Az AM (1 nmol/L) 30 perces intrakoronáriás infúziója izolált patkányszíven szignifikánsan fokozta a szívizom-kontraktilitást, valamint az ERK1/2 foszforiláltsági állapotát. A specifikus MEK1/2 gátló U0126 (1.5  $\mu$ mol/L) kivédte az ERK1/2 foszforiláció fokozódását, valamint 40%-kal gyengítette az AM pozitív inotrop hatását ( $P < 0.01$ ). Az epidermális növekedési faktor-receptor gátlása (AG1478, 1  $\mu$ mol/L) szimultán csökkentette az ERK1/2 foszforilációt és az AM pozitív inotrop hatását. Továbbá, az ERK1/2 által szabályozott  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger működésének gátlása (zoniporide, 1  $\mu$ mol/L) hasonló mértékben csökkentette az AM pozitív inotrop hatását, mint az ERK1/2 illetve az epidermális növekedési faktor-receptor gátlása. Eredményeink szerint az ERK1/2 fontos szerepet játszik az AM pozitív inotrop hatásának közvetítésében. Kimutattuk továbbá, hogy az epidermális növekedési faktor-receptor az ERK1/2 proximális szabályozójaként, míg a  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger az ERK1/2 effektoraként funkcionál. Eredményeink felvetik, hogy a MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli út daganatellenes célzott gátlása ronthatja a betegek szívizom-kontraktilitását (Skoumal és mtsai, 2012, revízió alatt).

## **V. A prolaktin-releasing peptid szerepe a kamrai kontraktilitás szabályozásában:**

A hypothalamus eredetű prolaktin-releasing peptid (PrRP) a GPR10 elnevezésű árvareceptor endogén ligandja. A peptid biológiai hatásait mindeddig szinte kizárólag a központi idegrendszerben vizsgálták. Valószínűsíthető, hogy a PrRP szerepet játszik a nociceptív folyamatokban, a stresszreakció kiváltásában, valamint a vérnyomás centrális szabályozásában. A közelmúltban kimutatták, hogy a patkány miokardiumban specifikus PrRP kötőhelyek találhatóak, azonban a peptid funkcionális jelentősége a szívben mindmáig ismeretlen. Kísérleteinkben a PrRP direkt szívhatását és az azt közvetítő szignál mechanizmusokat kívántuk karakterizálni. Izolált patkányszíven a PrRP-31 (1-100 nmol/L) 15 perces intrakoronáriás infúziója dóziszfüggő, lassan kialakuló pozitív inotrop hatást váltott ki. A PrRP maximális hatása 10 nmol/L-os koncentrációnál jelentkezett ( $13.6\% \pm 3.1$ ,  $P < 0.001$ ). A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a peptid hatását egyes ellenreguláló mechanizmusok miként befolyásolják. A cAMP katabolizmust végző foszfodiészterázok gátlása (IBMX, 10  $\mu$ mol/L) nem módosította a PrRP inotrop hatását ( $10.7 \pm 1.9\%$ ,  $P = \text{NS}$ ), arra utalva, hogy az effektus létrejöttében cAMP-függő mechanizmusok nem vesznek részt. A proteinfoszfátáz-1 és a proteinfoszfátáz-2A gátlása (calyculin A, 1 nmol/L) szignifikánsan fokozta a PrRP-re adott inotrop választ ( $P < 0.001$ ), míg a proteinfoszfátáz-2A specifikus blokkolása (okadaik sav, 10 nmol/L) nem befolyásolta azt ( $P = \text{NS}$ ). A proteinkináz-Ca farmakológiai gátlása (Ro32-0432, 100 nmol/L) szignifikánsan növelte a PrRP inotrop effektusát ( $21.6 \pm 3.4\%$ ,  $P < 0.001$ ), valamint fokozta a foszfolambán foszforilációját ( $1.5 \pm 0.09$  vs.  $1.0 \pm 0.18$ ;  $P < 0.001$ ), mely fehérje kulcsszerepet tölt be a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz működésének szabályozásában. Eredményeink - a PrRP pozitív inotrop hatásának leírása révén - elsőként világítanak rá a peptid élettani jelentőségére a szívben. Vizsgálataink szerint a PrRP pozitív inotrop hatását cAMP-től független mechanizmusok közvetítik, melyeket a proteinkináz-Ca és a proteinfoszfátáz-1 szimultán aktivációja jelentékenyen csökkent a foszfolambán fehérje defoszforilációja révén (Kónyi és mtsai, Regul Pept. 2010).

## **VI. A neuronostatin szerepe a szívizom-kontraktilitás és a sejttúlélés szabályozásában:**

A neuronostatin (NST) fehérjét a közelmúltban izolálták. A szomatosztatin gén által kódolt protein szerepét felvetették az idegi folyamatok, a vérnyomás, illetve a táplálék és vízfelvétel regulációjában. Az NST közvetlen szívhatásai azonban ismeretlenek. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az NST miként befolyásolja a szív pumpafunkcióját, a szívizomsejtek túlélését és növekedési folyamatait. Továbbá, a hatások közvetítésében szerepet játszó intracelluláris mechanizmusokat kívántuk azonosítani. Izolált szív preparátumon az NST (0.1-10 nmol/L) 15 perces adagolása nem váltott ki inotrop hatást. Továbbá, az NST (10 nmol/L) nem befolyásolta a béta-adrenerg agonista izoprenalin (1  $\mu$ mol/L) pozitív inotrop effektusát, illetve a Frank-Starling választ. Ugyanakkor az NST (10 nmol/L) szignifikánsan csökkentette az ET-1 (1 nmol/L) kontraktilitást fokozó hatását, melyet a p38-MAPK erőteljes foszforilációja kísért. Sejtkultúrán az NST alacsony dózis mellett (0.1 nmol/L) indukálta a fehérjetranszláció gépezetét a p38-MAPK foszforilációja illetve az eukariota elongációs faktor 2 (eEF2) defoszforilációja révén. Magas dózis mellett az NST (100 nmol/L) csökkentette az Akt foszforilációját és ezzel párhuzamosan nekrotikus sejtelhalást váltott ki, míg az apoptotikus sejthalál előfordulását nem befolyásolta. Eredményeink szerint az NST modulálni képes a szív kontraktilitatis erejét, a szívizomsejtek növekedését és túlélését. (Vainio és mtsai, J Biol Chem. 2012).

## **VII. Direkt adrenomedullin géntranszfer hatásának vizsgálata fiziológiás és patofiziológiás viszonyok között:**

Az adrenomedullin (AM) termelődése a szívben számos patofiziológiás állapotban fokozódik, azonban a peptid hatása a kamrai remodelling folyamatára kevésbé ismert. A kérdés tisztázása céljából direkt AM géntranszfert végeztünk egészséges, illetve kóros szívű patkányokban (bal kamrai nyomás túlterhelés, miokardiális infarktus). Kísérleteinkben az AM gént egy adenovírus vektorhoz kötötten injektáltuk patkányok bal kamrai falába. Nyomás túlterhelés céljából 14 napig infundáltunk angiotenzin II-t (33  $\mu$ g/kg/óra), miokardiális infarktust a bal kamrai elülső leszálló koronária ág lekötésével hoztunk létre. Direkt AM géntranszfer 20-szorosára növelte a bal kamrai AM mRNS-szintet. Echokardiográfiás vizsgálatok szerint a frakcionális rövidülés és az ejekciós frakció szignifikánsan nőtt az AM géntranszfer után. *Ex vivo*, izolált perfundált patkányszíveken az AM géntranszfer szignifikánsan fokozta a szisztolés funkciót, míg a diasztolés funkciót nem befolyásolta. Western-blot analízis szerint az AM overexpresszió jelentős mértékben fokozta a proteinkináz-C-epsilon és a proteinkináz-C-delta izoforma transzlokációját. Az AM géntranszfer szignifikánsan csökkentette az angiotenzin II által indukált bal kamrai hipertrófiát, ennek ellenére a szisztolés kamrafunkció megtartott volt, szívelégtelenség jeleit nem tapasztaltuk. Miokardiális infarktust követően az AM overexpresszió csökkentette a bal kamra falvastagságát, növelte a kamrai diasztolés átmérőt, valamint szignifikánsan rontotta a bal kamra szisztolés funkcióját. Eredményeink szerint az AM normál szíveken képes javítani a szisztolés funkciót, míg a diasztolés funkciót nem befolyásolja. Patofiziológiás viszonyok között az AM kontextusfüggő módon módosítja a bal kamrai remodelling folyamatát: az AM géntranszfer adaptív választ vált ki nyomástúlterhelés-indukálta bal kamrai hipertrófiában, míg maladaptív folyamatokat idéz elő miokardiális infarktust követően. (Leskinen és mtsai, J Gene Med. 2008).

### **VIII. A STAT3 transzkripció faktor szerepe az angiotenzin II-által indukált bal kamrai remodellációban:**

A parthenolide molekula ígéretes daganatellenes szer, mely a STAT3 ("signal transducer and activator of transcription 3") transzkripció faktor gátlásán keresztül fejti ki hatását. STAT3 aktiváció megfigyelhető bal kamrai hipertrófiában, ugyanakkor pontos szerepe ismeretlen. Jelen munkánkban a parthenolide molekula hatását vizsgáltuk angiotenzin II-által indukált bal kamrai remodellációban. Az 1 hetes Ang II infúzió (33 µg/kg/óra) hím patkányokon jelentős bal kamrai hipertrófiát hozott létre, mellyel párhuzamosan fokozódott a STAT3 foszforilációja (Tir705 illetve a Szer727 helyeken). Parthenolide (0.5 mg/kg/nap) markánsan csökkentette a bal kamrai hipertrófiát, míg a balkamra-funkció intakt maradt. Ang II hatására fokozódott a prolil-4-hidroxiláz béta (P4HB) pozitivitást mutató sejtek száma, mely a kollagén-szintetizáló sejtek markere. Parthenolide kezelés jelentősen visszaszorította a P4HB-pozitív sejtek számát. Hasonló módon, a parthenolide csökkentette az Ang II által indukált bal kamrai fibrózist valamint a kollagén-1 és a fibronectin molekulák génexpresszióját. Továbbá, a parthenolide kezelés csökkentette a prohipertrófiás hatású, fibroblaszt-eredetű interleukin-6 molekula fokozott expresszióját. Eredményeink szerint a STAT3 farmakológiai gátlása előnyösen befolyásolja a bal kamrai remodelláció folyamatát a fibroblaszt aktiváció csökkentése révén. Eredményeink felvetik, hogy a parthenolide molekula – a daganatellenes terápiák mellett – hatékony lehet egyes kardiovaszkuláris kórképek kezelésében is (Skoumal és mtsai, J Mol Cell Cardiol. 2011).

### **IX. Adrenomedullin szerepe a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában:**

Összefoglaló munkánkban az adrenomedullin jelentőségét taglaltuk a kardiovaszkuláris rendszer regulációjában. Bemutattuk a peptid szerepét a szívizom-kontraktilitás és a koronáriakeringés szabályozásában élettani körülmények között. Továbbá, összefoglaltuk a peptid citoprotektív és angiogenetikus hatását, valamint patofiziológiai jelentőségét szívelégtelenségben (Szokodi I, Ruskoaho H. 2008).

### **X. Apelin szerepe a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában:**

Összefoglaló munkánkban az apelin funkcionális jelentőségét mutattuk be a kardiovaszkuláris rendszerben fiziológiás és patofiziológiás viszonyok között. Összegeztük az apelin szerepét a szívizom-kontraktilitás, a koronáriakeringés, az angiogenezis és a kardiogenezis szabályozásában. Bemutattuk továbbá, a peptid miokardiális citoprotektív, antifibrotikus és antihipertrófiás hatását patofiziológiás állapotokban (Perjés és mtsai, 2012, közlésre elfogadva).