

Az OTKÁ-hoz 2008.-ban „*Antiarrhythmias hatású mechanizmusok in vivo és in vitro tanulmányozása*” címmel benyújtott pályázatban vázolt kutatási tervezet végrehajtása során a következő eredményeket értük el

A pályázatban ismertetett tervezet két nagyobb témakör vizsgálatát tűzte ki célul:

1. A gap junkciós (GJ) csatornák szerepének felderítését az akut iszkémia és reperfúzió során megjelenő kamrai aritmiákban valamint a prekondicionálás antiaritmiás hatásában.
2. A reaktív oxigén és nitrogén gyökök szerepének vizsgálatát az iszkémia és reperfúzió okozta kamrai aritmiákban.

Ad. 1. Munkacsoportunk 2007-ben a Cardiovascular Research-ben közölte (*Papp és mtsai, 2007*), hogy állatkísérletekben (altatott kutyákban) a gap junkciós (GJ) csatornák iszkémia hatására bekövetkező záródása jelentős mértékben hozzájárul az akut koszorúér elzáródás hatására megjelenő, ún. Ib fázisú kamrai aritmiákhoz. Ezek a súlyos kamrai aritmiák azok, amelyek az esetek döntő többségében hirtelen szívhalálhoz vezetnek. Azt is kimutattuk, hogy rövid koszorúér okklúziókkal végzett prekondicionálás csökkenti a GJ csatornák záródását és ennek következtében ezeknek az életet fenyegető aritmiáknak a kialakulását. Vizsgálatainkban a GJ csatornák záródása és az aritmiák kialakulása közötti összefüggést mind *in situ* (a szívizom elektromos impedanciájában bekövetkező változásoknak mérésével), mind az azt követő *in vitro* (GJ permeabilitás, connexin43 [Cx43] foszforilációs állapotának meghatározásával) körülmények között igazoltuk.

Ezeket a vizsgálatainkat folytatva, kísérleteket terveztünk a GJ csatornák farmakológiai modulációjára; tanulmányozni kívántuk, vajon a GJ csatornák zárása carbenoxolonnal (CBX) vagy nyitása rotigaptiddel (RTG), milyen módon befolyásolja az iszkémiás és reperfúziós kamrai aritmiákat. Több kísérletsorozatban kimutattuk, hogy a GJ csatornák iszkémia előtti és alatti zárása, paradox módon, a prekondicionáláshoz hasonlóan, gátolja az okklúzió alatti kamrai aritmiák kialakulását, ugyanakkor, ha prekondicionált kutyákban alkalmazzuk, a CBX megszünteti a prekondicionálás antiaritmiás hatását (1). Feltételezésünk szerint, a GJ csatornák prekondicionálás előtt és alatti zárása megakadályozza a prekondicionáló inger hatására felszabaduló endogén protektív hatású mediátorok diffúzióját és a védőhatás kialakulását (1). Érdekes módon, a GJ csatornanyitó RTG, amennyiben az iszkémia előtt és alatt adtuk ugyancsak antiaritmiás hatással rendelkezett. Eredményeinket részben hazai és nemzetközi kongresszusokon ismertettük (2-4), míg a CBX-re vonatkozó kísérleteink eredményeit a *Cardiologia Hungarica*-ban magyar és angol nyelven közöltük (1). A GJ csatornáknak az aritmogenezisben, a prekondicionálás antiaritmiás hatásában játszott szerepét, valamint a csatornák farmakológiai módosításával kapcsolatos eredményeinket és az erre vonatkozó hipotézisünket felkért könyvfejezetben ismertettük (5).

Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan is, hogy a prekondicionálás antiaritmiás hatásában központi szerepet játszó nitrogén monoxid (NO) vajon képes-e közvetlenül befolyásolni a GJ csatornákat, s amennyiben igen, akkor ennek szerepe van-e a prekondicionálás antiaritmiás hatásában. Kísérletekben a NO donor nátrium nitroprussidot adtuk, és a korábbiakban alkalmazott *in situ* kutya aritmia modellünkben, valamint azt követően ezekből a kísérletekből nyert szívminiókban *in vitro* biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel igazoltuk, hogy a NO közvetlenül a GJ csatornákra hatva, azoknak az iszkémia hatására bekövetkező záródását akadályozva, olyan elektromos feltételeket biztosít a szívben, amely gátolja a kamrai aritmiák kialakulását. Ezek a kísérleteink először szolgáltattak bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a NO a

szívizomban is közvetlenül befolyásolhatja a GJ csatornákat. Eredményeinket számos hazai és külföldi kongresszuson ismertettük és a *British Journal of Pharmacology*-ban közöltük (6).

A nitrogén monoxidnak, a GJ csatornákat szabályozó szerepét igazolja az is, hogy a nátrium nitrit infúzió hatására az okklúziós és reperfúziós aritmiák igen jelentős mértékben csökkennek, és ebben a hatásban, legalábbis részben, a GJ csatornák iszkémia alatti záródásának, NO általi megakadályozása játszik szerepet. Ezzel kapcsolatos az eredményeket eddig két kongresszuson (7, 8) ismertettük.

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a szív magas frekvenciával történő elektromos ingerlése jelentős korai (*Végh és mtsai, 1991, Kaszala és mtsai, 1996*) és késői védőhatást (*Végh és mtsai 1994, Kaszala és mtsai, 1996*) alakít ki a szívben az akut iszkémia és reperfúzió során megjelenő súlyos kamrai aritmiákkal szemben. Ezt a koncepciót folytatva a pályázat négy éves periódusa alatt kísérleteket terveztünk annak a vizsgálatára, vajon a GJ csatornáknak szerepük van-e az ilyen módon kialakított késői antiaritmiás hatásban. Szívingerelt kutyákban, 0, 6 12 és 24 órával a szívingerlést követően vett szívszöveti mintákban hisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk a GJ csatornákat felépítő fő protein a connexin43 (Cx43) mennyiségét, megoszlását és funkcionális állapotát, amelyet a fehérje foszforilált/defoszforilált (foszfo/defoszfo) formájának aránya alapján határoztunk meg (a fehérje foszforilált formája a csatorna nyitott állapotára utal). Kimutattuk, hogy 6 órával a szívingerlést követően a Cx43 mRNS tartalom jelentősen csökken, amelyet újabb 6 óra elteltével (azaz 12 órával a szívingerlés után) a Cx43 fehérjetartalom kb. 50%-ra történő csökkenése követ. Hús-huszonnégy órával a szívingerlés után, amikor a szívingerlés antiaritmiás hatása észlelhető, a Cx43 gén és fehérje expressziós változásai helyreálltak és nem különböztek a kiindulási állapottól. Koszorúér okklúzió hatására a szívingerelt kutyákban, bár a Cx43 mennyisége a kontroll állatokéhoz képest számottevően nem változott, azonban a kontrollal ellentétben, ahol az okklúzió hatására a foszfo/defoszfo Cx43 arány a defoszforilált állapot felé tolódott el és az interkaláris lemezben az immunofluoreszcenciás képek alapján jelentős töredeződést tapasztaltunk, a szívingerelt állatokban mind a Cx43 foszforilált formája, mind a membrán integritása megtartott volt. Ezek a kísérleteink talán a klinikai gyakorlat számára is fontos megfigyeléssel szolgálnak, ugyanis amennyiben 12 órával a szívingerlést követően - amikor a Cx43 fehérje expressziója jelentős mértékű csökkenést mutatott – zártuk el a koszorúeret és idéztünk elő iszkémiát, az aritmiák rendkívül súlyosak voltak és számos esetben kamrafibrilláció következett be. Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a prekondicionáló szívingerlést követően, a késői védőhatás kialakulása során van egy olyan kritikus periódus, amikor a szív érzékenysége fokozódhat mind az iszkémiára, mind az iszkémia kiváltotta aritmiákra. Ezeket az eredményeinket a tudományos konferenciákon történt ismertetések mellett, 2012.-ben a *Clinical Science*-ben közöltük (9). Ugyancsak ennek a munkának az eredménye a közeljövőben Ph.D. értekezés alapját képezi. A GJ csatornáknak az aritmogenezisben betöltött szerepének vizsgálatára vonatkozó kutatásaink eredményességét bizonyítja, hogy felkérést kaptunk, hogy a gap junkciós csatornák szerepét több szempontból elemző kiadványhoz („Frontiers Research Topic”) kézirat benyújtásával csatlakozzunk.

A fenti kísérletek során lehetőségünk nyílt arra, hogy szívingerelt kutyákban génextpressziós vizsgálatokat végezzünk. Ezekben a kísérletekben gén chip és RT-QPCR segítségével a szívingerlést követő különböző időpontokban, illetve az ingerlés után 24 óra múlva a koszorúér okklúziót és reperfúziót követően vett szívszöveti mintákban vizsgáltuk a génextpressziós változásokat. Olyan 40 illetve 29 gént

választottunk ki és követtük a mRNS szintjeikben bekövetkező változásokat, amelyekről korábbi kísérletek alapján feltételezhető volt, hogy szerepük lehet a késői védőhatás kialakításában. Eredményeinkből 4 alkalommal tartottunk előadásokat hazai és nemzetközi konferenciákon, két közleményt publikáltuk (10, 11) és a közeljövőben Ph.D. értekezés készül.

A gap junkciós csatornáknak az okklúzió és reperfúzió okozta súlyos kamrai ritmuszavarokban játszott szerepének vizsgálatát a jövőben is folytatjuk, amelyhez 4 évre elnyertük az OTKA támogatását, amit ezúton is köszönünk.

Kísérleteket kezdtünk a statin adás, illetve a statinokkal történő kezelés lehetséges antiaritmiás hatásának vizsgálatára. A kezdeti eredmények szerint a simvastatin egyszeri alkalmazása a koszorúér okklúziót megelőzően csökkenti az akut koszorúér okklúzió és reperfúzió során fellépő súlyos kamrai aritmiákat. Miután ez a kedvező antiaritmiás hatás a NO szintézist gátló L-NAME jelenlétében mérséklődik, feltételezhető a NO szerepe a védőhatás kialakításában. Eredményeinket 2011.-ben Haifa-ban az ISHR-ES kongresszusán ismertettük (12), a kézirat elkészítése folyamatban van.

Ad 2. A reaktív szabadgyököknek az okklúziós és reperfúziós ritmuszavarokban betöltött szerepét vizsgálva a következő eredményeket értük el:

Kimutattuk, hogy amennyiben a szívizom iszkémiát követő reperfúzió során NO-ból és szuperoxidból keletkező toxikus peroxinitritet kis (nanomoláris, mikromoláris) koncentrációban az iszkémiát megelőzően közvetlenül a koszorúér keringésben adjuk, akkor a perkondicionáláshoz hasonló antiaritmiás hatást érhetünk el. Ez a hatás feltehetően a peroxinitritből felszabaduló NO-nak köszönhető, amely szabályozza (gátolja) a reperfúzió alatti szabadgyök (szuperoxid) képződést. Ezt igazolja, hogy mind a perkondicionálás, mind a peroxinitrit adás hatására emelkedett a sinus coronarius vérben a nitrit/nitrát (NO_x) szint, és ez az azt követő 25 perces koszorúér okklúzió alatt is megmaradt, ellentétben a kontroll csoport állataival, amelyekben a NO metabolitok szintje az okklúzió végére jelentősen csökkent. Ezzel párhuzamosan a reperfúzió hatására a kontroll állatokban jelentősen megemelkedett szuperoxid és nitrotyrozin (az endogén peroxinitrit képződés markere) mennyiség a perkondicionált és peroxinitrittel kezelt állatokban szignifikánsan csökkent. Azt is kimutattuk, hogy bár a perkondicionáló rövid iszkémiás/reperfúziós inzultusok során jelentős mennyiségben képződik endogén peroxinitrit, ez nem szükséges a perkondicionálás antiaritmiás hatásának kialakításához. Ezeket az eredményeinket 4 év alatt számos hazai és külföldi kongresszuson ismertettük, belőlük két közleményt a *British Journal of Pharmacology*-ban (13, 14), egyet az *European Journal of Pharmacology*-ban publikáltunk (15), és az adatok egy részéből Kiss Attila Ph.D. értekezést készített, amelyet 2010.-ben sikerrel megvédett.

Az a feltételezésünk, hogy a NO szint iszkémia alatti megtartása fontos kardioprotektív tényezőként szerepelhet vezetett azokhoz a kísérletekhez, amelyekben vizsgáltuk a szerves nitritek lehetséges antiaritmiás hatását. Régóta ismert volt, hogy a szerves nitritek és nitrátok, mint NO donorok, nemcsak az iszkémiás károsodást, de az aritmiákat is csökkenteni képesek. Erre vonatkozóan számos saját kísérletes bizonyítékkal rendelkezünk (pl. *Végh és mtsai., 1996, György és mtsai., 2000*). Ugyanakkor, a legújabb vizsgálatok arra utaltak, hogy az inert molekulának tekintett nitrit és nitrát, amely az NO metabolizmus természetes végterméke, alacsony pH és oxigén hiány jelenlétében, mint pl. a szívizom iszkémia, NO-vá redukálódhat, így biztosítva jobb NO ellátást iszkémiás körülmények között is. Ennek megfelelően kísérleteket terveztünk, amelyekben vizsgáltuk a nátrium nitritnek az iszkémia és

reperfúzió okozta kamrai ritmuszavarokra gyakorolt hatását. Kimutattuk, hogy a nátrium nitrit infúzió, akár az iszkémia előtt és alatt, akár 10 perccel a reperfúzió előtt adva, rendkívül jelentős mértékben csökkenti az iszkémia és reperfúzió alatti súlyos kamrai aritmiákat. Ez a markáns antiaritmiás hatás egyrészt összefüggésbe hozható a fentebb említett GJ csatornákra gyakorolt hatással, másrészt a reperfúzió alatti szabadgyök képződés mérséklésével, illetve a fehérjék S-nitrozilációjával. Ez utóbbi mechanizmus feltételezi a létfontosságú fehérjék megóvását a reaktív oxigén szabadgyököktől (ROS) azáltal, hogy a NO reverzibilisen kötődve a fehérjék -SH csoportjaihoz megakadályozzák a ROS kötődést és annak károsító hatását. Elisabeth Murphy laboratóriumával kooperálva számos olyan fehérjét találtunk, amely a nitrit adás következtében S-nitrozilálódtak, különösen abban a kísérleti felállásban, amikor a nátrium nitritet a reperfúzió előtt adtuk. Ezeket, az eredményeinket eddig számos hazai és külföldi konferencián ismertettük (16-20), belőlük a kézirat elkészítése folyamatban van.

Idézett korábbi irodalom:

- György K., Végh Á., Rastegar M.A., Papp J.Gy., Parratt J.R.: Isosorbide-2-mononitrate reduces the consequences of myocardial ischaemia, including arrhythmia severity: implications for preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*, **14**: 481-488, 2000.
- Kaszala K, Végh Á., Papp J.Gy., Parratt J.R.: Time course of the protection against ischaemia and reperfusion induced ventricular arrhythmias resulting from brief periods of cardiac pacing. *J Mol Cell Cardiol*, **28**: 2085-2095, 1996.
- Papp R., Gönczi M., Kovács M., Seprényi Gy., Végh Á. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, **74**: 396-405, 2007.
- Végh Á., Szekeres L., Parratt J.R.: Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res*, **25**: 1051-1053, 1991.
- Végh Á., Papp J.Gy., Parratt J.R.: Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing. *Br J Pharmacol*, **113**: 1081-1082, 1994.
- Végh Á, György K., Papp J.Gy., Sakai K., Parratt J.R.: Nicorandil suppressed ventricular arrhythmias in a canine model of myocardial ischaemia. *Eur J Pharmacol*, **305**: 163-168, 1996.