

Reaktívoxigén-származékok szerepe a szív működés szabályozásában

Horváth Iván dr.^{1, 2} ■ Kittka Bálint dr.^{1, 2} ■ Perjés Ábel dr.^{1, 2}
Ruskoaho Heikki dr.³ ■ Szokodi István dr.^{1, 2}

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹Klinikai Központ, Szívgyógyászati Klinika,
²Szentágotthai János Kutatóközpont, Pécs

³Division of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finnország

A reaktívoxigén-származékok fokozott termelődése fontos szerepet játszik a szívelégtelenség patogenezisében. Azonban mint jelátviteli molekula, a szív fiziológiás folyamatainak összehangolásában is részt vesz. Jelen közleményben a szerzők összefoglalják, hogy a reaktívoxigén-származékok endogén produkciója milyen szerepet tölt be a szív pumpafunkciójának szabályozásában fiziológiás viszonyok között. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(47), 1912–1915.

Kulcsszavak: β -adrenerg-stimuláció, endothelin-1, jelátvitel, reaktívoxigén-származékok, szívizom-kontraktilitás

Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac function

Increased production of reactive oxygen species has been implicated in the pathogenesis of congestive heart failure. However, emerging evidence suggests a role for reactive oxygen species in regulating various physiological cellular processes in the myocardium. The authors summarize the current understanding of involvement of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility under physiological conditions.

Keywords: β -adrenergic stimulation, cardiac contractility, endothelin, reactive oxygen species, signal transduction

Horváth, I., Kittka, B., Perjés, Á., Ruskoaho, H., Szokodi, I. [Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac function]. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(47), 1912–1915.

(Beérkezett: 2015. augusztus 18.; elfogadva: 2015. szeptember 13.)

Rövidítések

5-HD = 5-hidroxi-dekanoát; β -AR = β -adrenerg-receptor; EGFR = epidermalis növekedési faktor receptor; ERK1/2 = extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2; ET-1 = endothelin-1; H_2O_2 = hidrogén-peroxid; mito- K_{ATP} -csatornák = mitokondriális ATP-függő K^+ -csatornák; $O_2^{\cdot-}$ = szuperoxid; PKA = proteinkináz-A; ROS = (reactive oxygen species) reaktívoxigén-származékok

A normális aerob anyagcsere folyamán a szívben reaktív-oxigén-származékok (reactive oxygen species – ROS) képződnek, mint a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). A mitokondriális elektrontranszferlánc mellett a ROS fontos forrásai a NAD(P)H-oxidázok, a xantinoxidáz és a citokróm P450. Fiziológiás viszonyok között a ROS-termelődést az antioxidánsok rendszere

hatékonyan képes ellensúlyozni [1]. Patofiziológiás állapotokban viszont, mint krónikus szívelégtelenségben, a ROS termelődése jelentősen fokozódik. Ismert, hogy a tartós oxidatív stressz hozzájárul a szív hypertrophia, az apoptotikus és nekrotikus sejtelhalás, valamint az interstitialis fibrosis kialakulásához, amelyek összességében a szív pumpafunkciójának zavarához vezetnek [1, 2]. A fokozott ROS-produkció közvetlenül is ronthatja a kontraktilitást, a szabadgyök-molekulák csökkenthetik a sarcoplasmaticus reticulum Ca^{2+} -ATPáz [3] és az L típusú Ca^{2+} -csatornák működését, a ciszteimolekulák tiolcsoportjainak (-SH) oxidációja révén [4]. Továbbá, a kontraktilis fehérjék direkt oxidatív módosulása [5, 6], valamint a foszforilációjukat irányító kinázok aktivitásának ROS-függő változása [7] szintén az erőgenerálás, illetve a Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséhez vezet-

het. A közelmúltban nyert kísérletes eredmények felvették, hogy a ROS-molekulák befolyásolhatják a szív működését fiziológias viszonyok között is. Szívizomsejtek mechanikai feszítése serkentette a ROS-produkciót, amely fokozta az intracelluláris Ca^{2+} -felszabadulást a sarcoplasmaticus reticulumból [8], arra utalva, hogy a ROS aktuális szintje szerepet játszhat a szívizom Ca^{2+} -homeosztázisának finomhangolásában. Kimutatták továbbá, hogy szoros kapcsolat áll fenn a kontraktilitás, az oxidatív metabolizmus és a ROS-termelődés között. Az összehúzódások frekvenciájának növelésekor szimultán fokozódott a szívizomsejtek oxigénfogyasztása és a ROS-produkció [9, 10].

A Frank–Starling-mechanizmus és az erő kifejtés-frekvencia összefüggés mellett a szívizom-összehúzódások erejét a szimpatikus idegrendszer aktivitása és a szívben termelődő kardiokinek – mint például az endothelin-1 (ET-1) – szabják meg [11]. Jelen cikkünkben összefoglaljuk, hogy fiziológias viszonyok között az endogén ROS-produkció miként vesz részt a szív pumpafunkciójának szabályozásában.

β -adrenerg-receptor-aktiváció és az endogén ROS-termelődés

A perctérfogat szabályozásában alapvető szerepet játszik a szimpatikus idegrendszer aktivitása stressz-szituációk során („Fight-or-flight” response – „Harcoldj vagy menekülj!” reakció). A catecholaminok (noradrenalin, adrenalin), döntően a β_1 -adrenerg-receptorokhoz (β_1 -AR) kötődve, fokozzák a szívizom-összehúzódások erejét (pozitív inotrop hatás). A β_1 -AR-ek stimulációja a G_s -protein–adenilátcikláz–cAMP–proteinkináz-A (PKA) jelpályát aktiválja [12].

A ROS-molekulák kihatnak a β -AR-válaszképességre a szívben. Megtartott bal kamrai szisztolés funkciójú betegeken az antioxidáns hatású C-vitamin fokozta az intracoronarián adott β_1 -AR-agonista dobutamin pozitív inotrop hatását, míg a C-vitamin önmagában nem volt hatással a kontraktilitásra [13]. Összhangban ezen eredményekkel, kimutattuk, hogy az antioxidáns N-acetil-cisztein jelentősen emelte a dobutamin inotrop választ izolált patkányszíven, azonban önállóan nem befolyásolta a kontrakciók erejét [14]. Mindez arra utal, hogy a ROS bazális szintje nem módosítja a myocardialis kontraktilitást, ugyanakkor a β_1 -AR-stimuláció során a megnövekedett endogén ROS-termelődés ellensúlyozni képes az agonisták pozitív inotrop hatását. Azonban az *in vivo* [13] és az *ex vivo* adatokkal ellentétben [14], az N-acetil-cisztein gyengítette az izoproterenolra adott pozitív inotrop választ, illetve az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienek növekedését izolált szívizomsejteken [15].

Számos magyarázat létezhet az ellentmondásosnak tűnő eredmények feloldására. A közelmúltban direkt módon igazolták a β -AR-stimuláció és a ROS-produkció közötti kapcsolatot: a β -AR-agonista izoproterenol dózisfüggő módon fokozta a mitokondriumok ROS-ter-

melését izolált szívizomsejteken, amelynek célzott gátlásával csökkenthető volt a β -AR inotrop hatás [15]. A mitokondriumok mellett a $O_2^{\cdot-}$ fontos forrásai a NADPH-oxidázok [2]. Eredményeink szerint izolált patkányszíven a NADPH-oxidázok farmakológiai gátlása hasonló módon fokozta a β -AR-stimulációra adott inotrop választ, mint az antioxidáns N-acetil-cisztein [14]. Mindez felveti, hogy az eltérő eredetű és szubcelluláris lokalizációjú ROS-termelődés ellentétes hatást gyakorolhat a kontraktilitásra. Továbbá, a ROS-produkció mértékétől, illetve időtartamától függően eltérő módon módosulhat az adenilátcikláz–cAMP–PKA jelpálya működése. Ismert, hogy az oxidánsok dózisfüggő bifázisos hatást gyakorolnak a PKA-ra. A tiolcsoportokat oxidáló ágensek alacsony koncentráció mellett fokozzák, míg magas koncentrációban alkalmazva csökkentik a PKA-aktivitást [16].

Az ET-1 szívserkentő hatása és az endogén ROS-termelődés

Az ET-1 a szívizom-kontraktilitás egyik legerőteljesebb stimulátora. Mechanizmusát tekintve, a β -AR-választól eltérően, az ET-1 elsősorban a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységet fokozva képes növelni a szívizom-összehúzódások erejét. A peptid inotrop hatását az ET_A -receptorok közvetítik az epidermalis növekedési faktor receptor (EGFR) extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2 (ERK1/2)–p90 riboszomális S6-kináz– Na^+ / H^+ cseremechanizmus jelátviteli út aktivációja révén [17].

Intakt patkányszíven nyert eredményeink szerint, az ET-1 kontraktilitást növelő hatását az $O_2^{\cdot-}$ -termelés fokozódása kísérte. Továbbá az antioxidáns N-acetil-cisztein a ROS-termelődés visszaszorításával párhuzamosan gyengítette az ET-1-pozitív inotrop hatását [14]. Korábbi megfigyelések szerint, az exogén ET-1 kontraktilis erőt fokozó hatása szinte teljes mértékben kivédhető volt antioxidánsokkal macskaeredetű szívizomsejteken [18, 19]. Ugyanezt a modellt használva kimutatták, hogy az angiotenzin-II adása fokozta az endogén ET-1 felszabadulását, amely a ROS-termelődést stimulálva növelte a sejtek kontraktilis erejét [18]. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ET-1 inotrop effektusában a NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS játszhat szerepet, mivel a NAD(P)H-oxidázt gátló apocynin párhuzamosan csökkentette az ET-1 hatását a kontraktilitásra és a ROS-termelődésre [14]. Az intakt patkányszíven nyert adatainkkal összhangban, a NAD(P)H-oxidáz farmakológiai gátlása kivédte az ET-1 inotrop hatását macskaszívű izolált kamrai izomsejteken [19].

Ismert, hogy a NAD(P)H-oxidázok által termelt ROS a mitokondriális ATP-függő K^+ -csatornák (mito- K_{ATP} -csatornák) nyitása révén további ROS felszabadulását stimulálhatja a mitokondriumokból. A mito- K_{ATP} -csatornák fontos védőszerepet játszanak a szívizomban az ischaemiás-reperfúziós károsodással szemben [20].

Ugyanakkor, e csatornák fiziológias funkciója kevésbé tisztázott. Izolált patkányszíven a mito- K_{ATP} -csatornák nyitását gátló 5-hidroxi-dekanoát (5-HD) jelentősen gyengítette az ET-1 pozitív inotrop hatását, ugyanakkor a peptid az 5-HD jelenlétében is képes volt szignifikáns módon fokozni a ROS-termelést. Adataink arra utalnak, hogy a mito- K_{ATP} -csatornák a ROS-tól független mechanizmusokon keresztül befolyásolják a kontraktilis erőt [14]. Izolált kamrai izomsejteken a nem szelektív K_{ATP} -csatorna-gátló glibenklamid kivédte az ET-1 hatását mind a kontraktilitásra, mind a O_2^- -termelésre. Ugyanakkor, az 5-HD csupán az ET-1 pozitív inotrop effektusát gyengítette, a ROS-produkciót nem befolyásolta szignifikáns módon [19]. A közelmúltban demonstrálták, hogy a mito- K_{ATP} -csatornák gátlása esetén a szív nem volt képes megfelelően reagálni különféle típusú inotrop stimulusokra (dobutamin, ouabain és magas perfuzátum Ca^{2+} -koncentráció) [21]. Azt feltételezték, hogy a mito- K_{ATP} -csatornák nyitáskor a mitokondrium belseje felé irányuló K^+ -áram megakadályozza a mitokondriális mátrix stressz okozta zsugorodását, valamint a külső és a belső membrán közötti tér expanzióját. Mindez fontos a mitokondrium és a citoplazma közötti hatékony energiáttranszfer fenntartásában [21].

Eredményeink szerint az ERK1/2 aktivációja, amely alapvető szerepet tölt be az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében [17], döntően ROS-érzékeny, mivel az N-acetil-cisztein és az apocynin is szignifikánsan csökkentette az ET-1 indukálta ERK1/2-foszforilációt [14]. Korábban kimutattuk, hogy az ET-1 az EGFR transzaktiváció révén váltja ki az ERK1/2 aktivációját [17]. A ROS-termelődés fokozódása inaktíválhatja a proteintirozin foszfatázokat és ily módon emelkedhet az EGFR tirozinfoszforilációja. Az aktivált EGFR a Ras jelátvivőn keresztül aktiválhatja az ERK1/2 jelátvivőt [22]. Továbbá a szabad gyökök közvetlenül is aktiválhatják a Ras-t a redoxérzékeny ciszteinek (elsősorban a Cys118) módosítása révén [22]. További kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy az ERK1/2 aktivációja milyen ROS-függő mechanizmusokon keresztül jön létre.

Klinikai vizsgálatok

A szívelégtelenség állatkísérletes modelljeiben nyert pozitív eredmények alapján [2] komoly várakozás övezte az antioxidáns vegyületekkel folytatott klinikai vizsgálatokat. A HOPE tanulmány szerint a magas cardiovascularis kockázattal bíró betegek megelőző céllal folytatott E-vitamin-kezelése nem csökkentette a szívelégtelenség kialakulásának rizikóját [23]. A HOPE-TOO tanulmányban az E-vitamin egyenesen növelte a szívelégtelenség kockázatát, amellyel, hogy összességében nem befolyásolta a major cardiovascularis események kialakulásának esélyét [24]. Továbbá, krónikus szívelégtelenségben az E-vitamin-kezelés nem javította a betegek funkcionális állapotát [25]. Az OPT-CHF klinikai tanulmány szerint a xantinoxidáz-gátló oxipurinol nem javította a szívelég-

telenségben szenvedő betegek balkamra-funkcióját a vizsgálatba bevont teljes populációban. Ugyanakkor a magas húgysavszintű betegek állapotát az oxipurinol előnyösen befolyásolta, a változások korrelációt mutattak a xantinoxidáz-gátló húgysavszintcsökkentő hatásával [26]. A Q-SYMBIO vizsgálat szerint a koenzim- Q_{10} kezelés javította a szívelégtelenség tüneteit, valamint csökkentette a cardiovascularis eredetű mortalitást [27]. Ugyanakkor egy korábbi tanulmányban a koenzim- Q_{10} nem javította a pumpafunkciót szívelégtelenségben [28]. További, magasabb elemszámú vizsgálatok szükségesek a koenzim- Q_{10} hatásának tisztázására.

Következtetések

Számos kísérletes eredmény támogatja hipotézisünket, amely szerint az endogén ROS-termelődés fontos regulátora a szívizom-kontraktilitásnak fiziológias viszonyok között. Az endogén ROS-produkció mérsékelt, átmeneti fokozódása befolyásolja az ET-1- [14, 18, 19] és a β -AR-stimuláció pozitív inotrop effektusát [13, 14, 15], az angiotenzin-II [29], a leptin [30] és a TGF- β_1 negatív inotrop hatását [31]. Az antioxidáns vegyületekkel folytatott klinikai tanulmányok ez idáig csalódást okoztak, a ROS-termelődés csökkentése nem javította a szív pumpafunkcióját a szívelégtelen betegekben általánosan [32]. A ROS jelátviteli szerepének felismerése a szív fiziológias folyamatainak szabályozásában [11], illetve a stresszhatásokra adott adaptációs válaszban [20] magyarázatot adhat az antioxidáns vegyületekkel folytatott kezelések sikertelenségére. A fiziológias folyamatok alaposabb megismerése hatékonyabb, célzott terápiák kifejlesztéséhez vezethet el.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: A kézirat elkészítésében, az irodalomkeresésben, valamint az irodalmi adatok kritikus értékelésében minden szerző részt vett. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek a kéziratban foglaltak vonatkozásában nincsenek érdekeltségeik.

Irodalom

- [1] Giordano, F. J.: Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115(3), 500–508.
- [2] Sag, C. M., Santos, C. X., Shah, A. M.: Redox regulation of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2014, 73, 103–111.
- [3] Xu, K. Y., Zweier, J. L., Becker, L. C.: Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ. Res.*, 1997, 80(1), 76–81.
- [4] Gill, J. S., McKenna, W. J., Camm, A. J.: Free radicals irreversibly decrease Ca^{2+} currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 292(3–4), 337–340.

- [5] Hertelendi, Z., Tóth, A., Borbély, A., et al.: Oxidation of myofibrillar protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signal.*, 2008, 10(7), 1175–1184.
- [6] Canton, M., Menazza, S., Sheeran, F. L., et al.: Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2011, 57(3), 300–309.
- [7] Sumandea, M. P., Steinberg, S. F.: Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(12), 9921–9927.
- [8] Prosser, B. L., Ward, C. W., Lederer, W. J.: X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science*, 2011, 333(6048), 1440–1445.
- [9] Heinzel, F. R., Luo, Y., Dodoni, G., et al.: Formation of reactive oxygen species at increased contraction frequency in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*, 2006, 71(2), 374–382.
- [10] Saitoh, S., Zhang, C., Tune, J. D., et al.: Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26(12), 2614–2621.
- [11] Perjés, A., Kubin, A. M., Kónyi, A., et al.: Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2012, 205(1), 26–40.
- [12] Xiao, R. P., Zhu, W., Zheng, M., et al.: Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006, 27(6), 330–337.
- [13] Mak, S., Newton, G. E.: Vitamin C augments the inotropic response to dobutamine in humans with normal left ventricular function. *Circulation*, 2001, 103(6), 826–830.
- [14] Kubin, A. M., Skoumal, R., Tavi, P., et al.: Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2011, 50(5), 884–893.
- [15] Anderson, D. C., Fauconnier, J., Yamada, T., et al.: Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.*, 2011, 589(7), 1791–1801.
- [16] Humphries, K. M., Pennyacker, J. K., Taylor, S. S.: Redox regulation of cAMP-dependent protein kinase signaling: kinase versus phosphatase inactivation. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(30), 22072–22079.
- [17] Szokodi, I., Kerkelä, R., Kubin, A. M., et al.: Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility. *Circulation*, 2008, 118(16), 1651–1658.
- [18] Cingolani, H. E., Villa-Abrille, M. C., Cornelli, M., et al.: The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension*, 2006, 47(4), 727–734.
- [19] De Giusti, V. C., Correa, M. V., Villa-Abrille, M. C., et al.: The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci.*, 2008, 83(7–8), 264–271.
- [20] Murphy, E., Steenbergen, C.: Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.*, 2008, 88(2), 581–609.
- [21] Garlid, K. D., Puddu, P. E., Pasdois, P., et al.: Inhibition of cardiac contractility by 5-hydroxydecanoate and tetraphenylphosphonium ion: a possible role of mitoKATP in response to inotropic stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, 291(1), H152–H160.
- [22] Clerk, A., Sugden, P. H.: Ras: the stress and the strain. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2006, 41(4), 595–600.
- [23] Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., et al.: Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 342(3), 154–160.
- [24] Lonn, E., Bosch, J., Yusuf, S., et al.: Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2005, 293(11), 1338–1347.
- [25] Keith, M. E., Jeejeebhoy, K. N., Langer, A., et al.: A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, 73(2), 219–224.
- [26] Hare, J. M., Mangal, B., Brown, J., et al.: Impact of oxypurinol in patients with symptomatic heart failure. Results of the OPT-CHF study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008, 51(24), 2301–2309.
- [27] Mortensen, S. A., Rosenfeldt, F., Kumar, A., et al.: The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. *J. Am. Coll. Cardiol. Heart Fail.*, 2014, 2(6), 641–649.
- [28] Watson, P. S., Scalia, G. M., Galbraith, A., et al.: Lack of effect of coenzyme Q on left ventricular function in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1999, 33(6), 1549–1552.
- [29] Palomeque, J., Sapia, L., Hajjar, R. J., et al.: Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, 290(1), H96–H106.
- [30] Dong, F., Zhang, X., Ren, J.: Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor–NADPH oxidase pathway. *Hypertension*, 2006, 47(2), 222–229.
- [31] Li, S., Li, X., Zheng, H., et al.: Pro-oxidant effect of transforming growth factor-beta₁ mediates contractile dysfunction in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.*, 2008, 77(1), 107–117.
- [32] Sugamura, K., Keaney, J. F. Jr.: Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 51(5), 978–992.

(Szokodi István dr.,
Pécs, Ifjúság útja 13., 7624
e-mail: istvan.szokodi@pte.hu)