

A nitrogén monoxid és a szabadgyökök szerepe a prekondicionálás korai és késői antiarrhythmias hatásának kialakításában

Hajnal Ágnes

Tézis füzet

Témavezető: Dr. Végh Ágnes

Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet
Szent-Györgyi Albert Orvosi Centrum
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2014

1. Bevezetés

Az elmúlt néhány évtizedben számos vizsgálat folyt a myocardium lehetséges védőmechanizmusainak kialakítására, megelőzve a szív károsodását az ischemás/reperfúziós hatásoktól. Murray és kollégái elsőnek írták le a szív adaptációs képességét a hosszan tartó ischemiás állapothoz. A toleranciát rövid, ismétlődő ischemiás/reperfúziós periódusokkal alakították ki. Ezt a jelenséget ischemiás prekondicionálásnak nevezték. Az a tény, hogy a szív megvédhető a végzetes károsodásoktól a saját adaptációs képességének segítségével, a prekondicionálás kiváltásának folyamatát és mechanizmusát mind kísérletes mind klinikai területen a figyelem középpontjába emelte. A rövid, ischemiás periódusokkal kiváltott védőhatás mára általánosan használt klinikai módszer arra, hogy megvédjék a szívet a coronaria by-pass műtétek során. Számos bizonyíték szolgál arra, hogy a szívben a védőhatás nem csak a rövid érelzárások által lehet kiváltani, hanem a szívfrekvencia megnövelésével (cardiac pacing) ill. fizikai terheléssel is. Számos epidemiológiai vizsgálat szolgáltat adatokat arra vonatkozóan, hogy a rendszeres mozgás csökkenti a szívbetegségekben szenvedő páciensekben a betegség súlyosbodását és a halálozást. Továbbá a fizikális terhelés csökkenti a szívbetegségek kialakulásának kockázati tényezőit (hipertenzió, hiperlipidémia, diabetes, obezitás). Azonban a fizikális terhelés kiváltotta védőhatás pontos mechanizmusa még tisztázásra vár.

Az oxidatív foszforiláció és a mitokondriális respiráció szétválik hipoxia vagy ischemia/reperfúzió során. Ez a szétkapcsolás növeli a szabadgyökök termelődését. Ezek a reaktív oxigén és nitrogén gyökök (ROS, NOS) kiemelkedő szerepet játszanak a reperfúziós arrhythmia kialakításában. A szabad gyökök nem csak károsíthatják a szívizom sejteket, de szerepük lehet a PC kialakításának folyamatában is. A ROS és a NO nem-receptor kapcsolt aktivátorai lehetnek a védőhatásnak.

Számos tanulmány foglalkozik a ROS szerepével a védőhatás késői fázisában. A ROS számos redox szenzitív molekulát aktiválnak, mint például az endogén antioxidáns enzimeket, a mangán szuperoxid diszmutázt (MnSOD) vagy a thioredoxint. A prekondicionált szívben a redox szignál fehérje szintézist indukálhat, hogy elősegítse a szívizomsejtek túlélését. Azonban a ROS szerepe a védőhatás korai fázisában, különös tekintettel az antiarrhythmias hatására, még tisztázatlan maradt.

A NO erős vasodilatációs hatása mellett extrém rövid fél-élet idővel rendelkezik. Az endothéliumból szabadulhat fel számos endogén molekula hatására, vagy akár fizikális stimulusra. A humán szervezetben a NO-t három különböző nitrogén monoxid szintáz (NOS)

izoforma képes előállítani. Ezek közül kettő megtalálható a szívben: az endothéliális NOS (eNOS) és a NOS indukálható formája (iNOS).

Az infarktusos területet vagy a „stuning”-ot vizsgálva számos tanulmány javasolja a NO szerepét a PC késői fázisában. Exogén nitrogén monoxid adása szintén elégséges, hogy a szívben a védőhatást kialakítsa az infarktussal vagy a „stunning”-al szemben nyúlakban és rágcsálókban. Azonban késői védőhatás anti-arrhythmias folyamataiban szerepe még bizonytalan. Bolli és munkatársai a NO szerepét a késői protektív folyamatokba úgy összegezte, hogy ’NO mediálta NO felszabadítás.’ Azonban nem volt bizonyíték a NO trigger vagy mediátor szerepére a fizikális terhelés kiváltotta késői védőhatásban az arrhythmiaakkal szemben.

Babai és munkatársai kimutatták, hogy egyszeri alkalmú, futópádon történő, fizikális terhelés is képes csökkenteni a kamrai arrhythmiaakat a védőhatás kialakításától számított 24 órával később. Ez a védőhatás megszüntethető az előzetesen alkalmazott aminoguanidine adásával. Azonban az aminoguanidine nem szelektív gátlója a NOS enzimeknek. További számos enzimet gátol, mint például a histaminázt, mitogén aktiválta protein kinázt, katalázt, SOD-ot és malondialdehidet.

Jelen doktori disszertáció fő témája a rövid érelzárásokkal és fizikai terheléssel kiváltott korai és késői védőhatások mechanizmusainak vizsgálata volt, különös tekintettel a szabad gyökök és a nitrogén monoxid szerepére a védőhatás antiarrhythmias folyamataiban.

2. Célkitűzések

Két fő célja volt a jelen doktori disszertációnak.

1. A reaktív oxigén gyökök vizsgálata az ischemiás prekondicionálással kiváltott korai antiarrhythmias hatás vizsgálatában (1/a). Ebben az esetben alacsony molekulahúlyú, erősen diffúzibilis szabadgyök fogót az N-2-mercaptopropionylglycine-t (MPG) alkalmaztuk. Ebben a vizsgálatban a prekondicionálást rövid kétszer öt perces koronária elzárásokkal hajtottuk végre. Az elzárások után 20 perces nyugalmi periódust követően a LAD-ot 25 percre elzártuk.

Ebben a témakörben a további kérdések kerültek kivizsgálásra:

- nem PC kutyákon miocardiális infarktus közben vizsgáltuk a ROS arrhythmias hatását (1/c). Lehetséges-e az arrhythmias számának csökkentése exogén szabadgyökfogó alkalmazásával?
 - Terveztük a szabadgyökök kialakulásának bizonyítását az ischemia kiváltotta prekondicionálás folyamata során, ill. a 25 perces érelzárás kiindulási és végállapotában (1/b). Lucigenin-indukálta chemiluminescencia módszert alkalmaztuk, hogy vizsgáljuk a ROS képződést in vivo.
 - In vitro ferro-cytochrome-c redukciós assay-ben vizsgáltuk az MPG gyökfogó aktivitását a phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kiváltotta ROS képződésen (1/d). Az alkalmazott módszerben a PMA foszfolipáz-C útvonalon aktiválja a kutya perifériális mononukleáris sejteket, amely aktiváció ROS képződéshez vezet.
2. További bizonyítékokat kerestünk a nitrogén monoxid antiarrhythmias szerepére a fizikális terheléssel kiváltott prekondicionálás késői fázisában (2/a). Ebben a vizsgálatban a nitrogén monoxid szerepét vizsgáltuk:
 - nem szelektív NOS gátló ω -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) ((2/b) és
 - szelektív iNOS gátló, -(2-aminoethyl)-methyl-isothiourea (AEST) alkalmazásával (2/c).

L-NAME-t közvetlenül a fizikális terhelés kiváltása előtt alkalmaztuk, míg az AEST-t a 25 perces teszt érelzárás előtt 70 perces infúzióban adagoljuk.

3. Methods

3.1 Kutyák műtéti előkészítése

Enyhe altatásban (Sigma, 20 mg kg⁻¹ nátrium pentobarbitone intra vénás infúzióban) a jobb arteria femoralisba katétert ültettünk, hogy mérni tudjuk a szisztolés, diasztolés vérnyomást (SABP, DABP) valamint a szívfrekvenciát (HR). A vena femoralisba szintén katétert ültettünk, ezen keresztül adagoltuk az altatás fenntartásához a chloralose (60 mg kg⁻¹) és urethán (200 mg kg⁻¹) keverékét. Ezen kívül a femorális vénába ültetett kanülön át adagoltuk az AEST-t is, közvetlenül a teszt érelzárás előtt. A bal arteria carothist kipreparáltuk és ezen keresztül katétert helyeztünk a bal kamrába, hogy mérni tudjuk a bal kamrai szisztolést (LVSP) és vég-diasztolés (LVEDP) nyomást. Az ötödik borda között a mellkast feltárjuk és a perikardiumot felnyitjuk. A baloldali arteria coronaris (LAD) anterior descendens ágát, közvetlenül proximálisan az első fő diagonális elágazása felett az okklúzióhoz kipreparáltuk. Ennek az artériának a bal oldali ágát kanüláltuk helyi, fiziológiás sóoldat, vagy MPG intracoronáriás adásakor szabadgyökök vizsgálata esetén. A bal oldali arteria coronaris circumflex ágát kipreparáljuk és elektromágneses áramlásmérőt (4 mm átmérőjű) felhelyezünk az arteria coronarisra. A miokardiális véráramlást (MBF) Spectramed készülékkel mértük (Hugo Sacs Electronics, Germany). A kompozit elektródot a potenciális ischémiás terület közepére varrtuk fel, melynek segítségével az elektromos aktiváció inhomogenitásának mértékét tudtuk nyomon követni. Az elektród tartalmaz továbbá 4 unipoláris elektródot is, mely segítségével az EKG jel ST-szakasz emelkedést mértük.

3.2 Vizsgált hemodinamikus paraméterek és kamrai arrhythmiák

A jobb oldali arteria femoralison keresztül mértük a szisztolés (SABP) és diasztolés (DABP) vérnyomást és a szívfrekvenciát (HR). Az artériás vérnyomás középértékét a SABP és a DABP értékből számoltuk. A bal kamrai szisztolés (LVSP) és vég-diasztolés nyomást (LVEDP) a bal oldali arteria carotisba tett kanül segítségével mérjük. Ebből számoljuk ki a bal kamrai nyomás idő szerinti első deriváltjának minimum és maximum értékét. A coronária áramlást a bal arteria coronaris circumflex ágára helyezett elektromágneses áramlásmérővel mérjük.

A kamrai arrhythmiák megjelenését a 25 perces teszt érelzárás során és azt követő reperfüzió alatt vizsgáljuk a Lambeth konvenciónak megfelelően. Az érelzárás során a korai kamrai ütések számát (VBP's) számoltuk. Továbbá rögzítettük a kamrai tachikardiák (VT) eseményeit és számát. Ezen kívül vizsgáltuk a kamrai fibrillációkat mind az okklúzió, mind a

reperfúzió során. Azokat a kutyákat tekintettük túlélőknek, akiknek a szívfrekvenciája 10 perccel az ischemiás-reperfúziós inzultust követően szinus ritmusban volt.

3.3 Alkalmazott *in vitro* kísérletek a szabadgyökök szerepének vizsgálatában

A rövid érelzáródásokkal kiváltott prekondicionálás és az ezt követő teszt okklúzió és reperfúzió során vizsgáltuk a szabadgyök termelődést lucigenin-enhanced chemilumineszcens assay-vel. Minden vizsgált időpontban két mL-nyi vért gyűjtöttünk a sinus coronariusból EDTA alvadásgátolt vérvételi csőbe. A mintákat a vérvétel után 5 percig centrifugáljuk 200 g-n szobahőmérsékleten. 100 µL plazmához 250 µM Dulbecco foszfát pufferben (DPBS) oldott lucigenint adunk. 2 perces inkubációs idő után (sötétben) mérjük a chemilumineszcenciát folyadék scintillációs detektorral (Packard Tri-Carb 2100 Model).

Másrészt vizsgáltuk a szuperoxid anionok képződését és MPG-vel történő gátlását kutya leukocitákban. A szuperoxid anion képződését Guarenieri és kollégái által leírt szuperoxid-függő ferrocitochrome-c redukciójával határoztuk meg. 2 mL perifériás vért gyűjtöttünk kutya véna femoralisból EDTA alvadásgátolt csőbe. A polimorfonukleáris sejteket (PMN) Ficoll-Hypaque grádiens segítségével izoláltuk vérből (centrifugálás 200 g-n, 20 percig szobahőmérsékleten). Az izolálást követően a sejteket 40 µM tartalmú ferrocitochrome-c tartalmú DPBS-ben vesszük fel, majd 0,3 µM PMA-val stimulálva a szuperoxid képződést 550 nm-en detektáltuk.

3.4 Prekondicionálás kiváltása

Kísérletsorozatunk első felében a prekondicionálás korai fázisát vizsgáltuk. Ekkor a prekondicionálást 2×5 perces rövid érelzáródással és azt követő gyors reperfúzióval váltottuk ki. Az okklúziós-reperfúziós izultusok között 20 percet hagytunk. A második okklúziós-reperfúziós eseménysor után 20 perccel alakítottuk ki a 25 perces teszt okklúziót.

A kísérletsorozatunk második felében a prekondicionálás késői fázisának antiarrhythmias hatását vizsgáltuk. Ekkor a védőhatást egyszeri 21 percig tartó, futópádon történő fizikális terheléssel váltottuk ki. Az állatokat a futópádon növekvő terhelésnek tettük ki: minden 3. percben növeltük a futás sebességét és vagy a futópáda dőlésszögét.

4. Konklúzió

4.1 Szabadgyökök szerepe a prekondicionálás korai antiarrhythmias hatásában

A kutyákban, mint más fajokban, a kamrai arrhythmiaikat csökkenteni lehet, ha a hosszabb idejű érelzárást megelőzi egy vagy több rövid idejű ischémias és reperfüziós esemény. Az ischémias prekondicionálás erős antiarrhythmias hatását bizonyította ez a munka. Egyetlen állat sem fibrillált a prekondicionált csoportból a teszt okklúzió alatt. Ezzel szemben a kontroll csoportban 82%-os volt a fibrillált állatok száma a teszt okklúzió során. A VPB és a VT epizódok száma szintén alacsonyabb volt azokban a kutyákban, akikben a PC hatást kiváltottuk. Az epikardiális ST-segmens emelkedés és az elektromos aktiváció inhomogenitásának mértéke kevésbé volt kifejezett a PC kutyákban, mint a nem-PC állatokban.

(1/a) Bizonyítottuk, hogy az antiarrhythmias védőhatás kialakításában a szabadgyökök szerepe kevésbé valószínű kutyákban. Az ismert szabadgyök fogó, MPG, alkalmazásával bizonyítottuk ezt. Az alkalmazott MPG dózisa (azonos 90 mg kg^{-1} totál intravénás dózissal) azonos volt azzal, melyet előzetesen az irodalomban több helyen alkalmaztak. Az MPG-t közvetlenül az arteria coronaris oldalágába juttatunk, arra a területre, melyet később elzártunk. Az eredmények azt mutatják, hogy a lokálisan adott MPG nem képes megszüntetni a prekondicionálás jótékony, antiarrhythmias hatását. A VF és VT események és a korai kamrai ütések megoszlása hasonló volt a prekondicionált kutyákban, függetlenül attól, hogy az állat kapott-e szabadgyökfogót vagy sem. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy ebben az állatfajban az *in vivo* állapotban a ROS, és főként a szuperoxid gyök, nem szükséges a korai, életet veszélyeztető arrhythmiaikkal szembeni védőhatás kialakításához.

(1/b) A kísérlet során a vizsgáltuk a felszabaduló szabadgyökök mennyiségét a sinus coronariusból vett vérmintából. Azt tapasztaltuk, hogy a második prekondicionáló okklúzió követő reperfüzió során vett vérmintában emelkedett meg legnagyobb mértékben a detektálható szabadgyökök mennyisége. Az alkalmazott MPG kezelés ezt a szabadgyök emelkedést képes volt legátolni.

(1/c) Az MPG-t kapott kontroll kutyákban (C + MPG csoport) a fázis I. arrhythmiaik száma csökkent, ennek okának kiderítése későbbi vizsgálatokat igényel. A VPB-k számát az egész 25 perces érelzárás alatt nem mutatott szignifikáns különbséget, a fiziológias sóoldatot kapott kontroll csoporttal szemben. Továbbá az ischémia mértékének két jellemzője, az ST-szakasz emelkedés és az elektromos aktiváció inhomogenitás nem mutatott eltérést MPG kezelés hatására a kontrollhoz képest.

4.2 A NO szerepe a PC késői antiarrhythmias hatásában

Kísérletsorozat második részében további bizonyítékokat kerestünk a nitrogén monoxid szerepére a prekondicionálás késő fázisában. Vizsgálataink célja volt a nitrogén monoxid trigger és mediátor szerepének tisztázása a fizikális terheléssel kiváltott védőhatás antiarrhythmias hatásában. Ebből a célból két NOS gátlót alkalmaztunk. A fizikális terhelés hatására markáns védőhatás alakul ki az arrhythmiaikkal szemben 24 óra múlva.

(2/a) Az eNOS gátló L-NAME alkalmazása a fizikális terhelés kiváltása előtt megszünteti a fizikális terhelés jótékony, antiarrhythmias hatását. A NO termelődés gátlásával (L-NAME segítségével) bizonyítani tudtuk a NO trigger szerepét prekondicionálás kiváltásában.

(1/b) Az alkalmazott szelektív iNOS gátló AEST alkalmazása gátolja a fizikális terhelés késői antiarrhythmias hatását. Bebizonyítottuk, hogy a fizikális terheléssel kiváltott prekondicionálás késői antiarrhythmias hatásban a NO mediátor molekulaként is szerepet játszik.

5. A PhD munkához kapcsolódó cikkek és absztraktok:

5.1 Cikkek

Hajnal Á, Nagy O, Litvai A, Papp JGy, Parratt JR, Végh Á

Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs

LIFE SCIENCES 77:(16) pp. 1960-1971. (2005)

IF: 2.512

Hajnal Á, Nagy L, Parratt JR, Papp JGy, Végh Á

N-2-mercaptopyrionylglycine, a scavenger of reactive oxygen species, does not modify the early antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning in anaesthetised dogs

CARDIOVASCULAR DRUGS AND THERAPY 18:(6) pp. 449-459. (2004)

IF: 1.486

5.2 Absztraktok

Hajnal Á, Csillik A, Litvai Á, Parratt J R, Végh Á

Protection against arrhythmias by exercise; role of nitric oxide: -p. A27.

JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY (2002) Volume 34; Issue 6, Page A27.

International Society for Heart Research (ISHR) European Section Meeting, 2002, Szeged

Hajnal A, Nagy L, Parratt JR, Vegh A

The role of free radicals in the early anti-arrhythmic effects of ischaemic preconditioning

JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY 36:(5) p. 51. (2004)

International Society for Heart Research (ISHR) European Section Meeting, 2004, Dresden

Hajnal Á., Litvai Á., Dr. Papp Gy., J.R. Parratt, Dr. Végh Á.

A nitrogén-oxid szerepének vizsgálata a fizikai terheléssel kialakított prekondicionálás késői antiarrhythmias hatásában.

A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság V. Kongresszusa
Debrecen, 2002. december 12-14.

Hajnal Á., J.R. Parratt, Végh Á.

A reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepének vizsgálata az ischaemiás prekondicionálás korai antiarrhythmias hatásában altatott kutyában.

Magyar Kardiológusok Társasága 2003. évi Tudományos Kongresszusa,
Balatonfüred, 2003. május 14- 17.

Á. Hajnal, J.R. Parratt, Á. Végh

Possible role of ROS in the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning in anaesthetised dogs.

International Society for Heart Research (ISHR) European Section Meeting, 2003. Strasbourg

Á. Hajnal, J.R. Parratt, Á. Végh

Possible role of ROS in the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning in anaesthetised dogs.

Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, 2003, Pécs

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az évek során, akik nélkül a jelen doktori disszertáció nem készült volna el.

Elsősorban témavezetőmnek, Dr Végh Ágnesnek szeretném köszönetemet kifejezni, akinek irányításával és tanításával nyertem betekintést az állatkísérletes munkákba és a farmakológia területére. Hálás vagyok a támogatásáért az életem nehéz mérföldkövében.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr Varro Andrásnak és Dr Papp Gyulának, akik lehetőséget teremtettek számomra, hogy kísérletes munkáimat az általuk vezetett Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben végezzem.

Szeretném megköszönni Dr. Tordai Csillának a munkáját és odaadását a szabadgyökök mérések lebonyolításában. Külön köszönetemet fejezem ki a támogatásáért, mind a PhD munkám során, mind az egyetemi szakdolgozati munkám megvalósításában.

Szeretném köszönetemet kifejezni Kosztka Máriának és Bakó Erikának, akik nem csak kiváló aszisztensi munkájukkal, de baráti, emberi hozzáállásukkal is segítettek a kísérletes munkáim megvalósulásában.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni családomnak, akik támogattak, ostromoztak, segítettek, hogy befejezzem a PhD munkámat és ezt a disszertációt.