

Az akut simvastatin kezelés hatása az iszkémia/reperfúzió okozta kamrai aritmiákra altatott kutya modellben

Kisvári Gábor

PhD Tézis



Témavezető: Prof. Dr. Végh Ágnes

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2016

BEVEZETŐ

A hirtelen szívhalál egyik, talán a leggyakoribb oki tényezője, a koszorúér hirtelen elzáródása során kialakuló súlyos kamrai ritmuszavarok. A modern kardiológiai kutatások egyik fő célja olyan lehetőségek felderítése, amelyek a gyógyszeres terápia valamint sebészeti és az intervencionális kardiológiai módszerek mellett, új terápiás beavatkozást nyújthatnak ezen életet fenyegető kamrai aritmiákkal szemben.

Ilyen új lehetőséget jelentett a Murry és munkatársai által 1986-ban leírt „iszkémiás prekondicionálás” jelensége, amely elsőként bizonyította, hogy a szív adaptálódni képes az iszkémiás stresszhez, azaz rövid időtartamú iszkémiás epizódokkal a szív toleranciája fokozódik az ismételten bekövetkező, de immáron hosszabb iszkémia súlyos következményeivel szemben.

A prekondicionálás kardioprotektív hatására irányuló intenzív kutatómunka fontos mérföldkövét az jelentette az a felismerés, hogy bizonyos gyógyszerek, a prekondicionáláshoz hasonló védőhatást képesek kiváltani. Ennek az ún. „farmakológiai prekondicionálásnak” az ötlete azokból a korábbi kísérletekből eredt, amelyek egyértelműen bizonyították, hogy a prekondicionálás védőhatásában endogén anyagok felszabadulása fontos szerepet játszik. Ennek megfelelően feltételezhető volt, hogy amennyiben patológiás körülmények között ezeknek az endogén anyagoknak a szintézise és/vagy felszabadulása gátlódik, akkor azok a gyógyszerek, amelyek képesek ezen mediátorok hatását utánozni vagy képződésüket befolyásolni, hasonló védőhatást válthatnak ki, mint az iszkémiás prekondicionálás..

Klinikai vizsgálatok eredményei utalnak arra, hogy a magas koleszterinszint kezelésére kifejlesztett sztatinok védelmet nyújthatnak a súlyos kamrai aritmiákkal és a hirtelen szívhalállal szemben. Egyre több kísérletes és klinikai bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a sztatinok kardioprotektív hatásában, a lipid csökkentő hatáson túlmenően és attól független, egyéb, ún. „pleiotróp” hatások is szerepet játszanak. Ezek között szerepel a plakkstabilizáló hatás, az endotheliális funkció javítása, az oxidatív stressz károsító hatásának csökkentése, valamint a gyulladáshoz és trombogén reakciók csökkentése, melyek zöme feltételezhetően szerepet játszik a sztatinok antiaritmiás hatásában, és magyarázattal szolgálhat arra, hogy miért csökken a kardiológiai eredetű elhalálozás gyakorisága a sztattinnal kezelt, kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegek körében. Valószínűnek tűnik, hogy a koleszterinszint-csökkentő hatástól független kedvező hatásokban nitrogén-monoxid (NO)-függő és független mechanizmusok is közrejátszanak. Kimutatták, hogy a sztatinok az eNOS aktiválása révén

serkentik az NO termelést, fokozzák a prosztanoidok képződését és aktiválják a hem-oxigenáz-1 nevű enzimet.

Feltételezhető, hogy a sztatinok az NO-szintézis fokozása révén fejtik ki védőhatásukat az iszkémia/reperfúzió okozta kamrai aritmiák ellen. Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy az NO kulcsfontosságú szerepet játszik a prekondicionálás korai és késői antiaritmiás hatásában függetlenül attól, hogy azt rövid koszorúér-okklúziós epizódokkal, a szív magas frekvencián történő ingerlésével vagy erős fizikai terheléssel váltják-e ki. Azt is ismert, hogy ezek a prekondicionáló ingerek az eNOS aktiválásán keresztül fokozzák az NO termelést.

Bár a sztatinok pleiotróp tulajdonságaival és krónikus alkalmazásuk jótékony hatásaival számos tanulmány foglalkozik, a mai napig nem teljesen tisztázott, hogy a sztatinok pontosan milyen mechanizmusokon keresztül érik el kardioprotektív hatásukat, és még mindössze néhány kutatás foglalkozott az akut hatásuk vizsgálatával, amely teljesen új alkalmazási lehetőséget jelenthet egy eddig csak krónikusan alkalmazott szer felhasználásában.

Célkitűzések

A következő kérdések megválaszolására terveztünk kísérleteket:

- a) Tanulmányunkban arra kerestünk választ, hogy a simvastatin egyetlen dózisa milyen módon befolyásolja az iszkémia és reperfúzió során kialakuló súlyos kamrai aritmiákat altatott kutyákban. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a simvastatin akut hatásában a nitrogén monoxid szerepet játszik-e. Ehhez a kutyák egy csoportjában aktivált simvastatint, két másik csoportban pedig a simvastatin oldószerét, illetve L-NAME-t, a nitrogén monoxid szintáz enzim (NOS) gátlószerét, adtunk közvetlenül a 25 perces koszorúér-okklúziót megelőzően,
- b) Miután bebizonyosodott, hogy a simvastatin akut alkalmazása számottevő antiaritmiás hatást vált ki, amelyben az NO szintézis fokozódásának szerepe van, így a kísérleteink második sorozatában azt vizsgáltuk, hogy miképpen jön létre az eNOS gyors aktivációja; vajon simvastatin az PI 3-kinase/Akt útvonal gyors aktiválása révén fokozza az eNOS általi NO termelődést. Ennek vizsgálatára a PI3-kináz enzimet gátló wortmannint alkalmaztuk.

Anyagok és módszerek

- Kloralóz-uretán keverékével altatott nyitott mellkasú kutyákon, bal elülső leszálló artéria (LAD) preparálása és lefogása 60 illetve 25 percig iszkémia előidézése céljából, illetve egy mellékág preparálása anyagbeadás céljából
- Simvastatin, annak oldószerének, L-NAME, wortmannin és DMSO (wortmannin oldószer) beadása
- Hemodinamikai paraméterek mérése
- Iszkémia súlyosságának meghatározása epikardiális ST-szakasz változása, elektromos aktiváció inhomogenitása
- Kamrai aritmiák meghatározása: extraszisztolék, tachikardiás epizódok, kamrafibrilláció
- Plazma NO₂/NO₃ koncentrációjának meghatározása
- eNOS foszforiláció és aktivitás meghatározása Western blot és RIA módszerrel

Eredmények

I/1. A simvastatin-, illetve oldószer helyi (intracoronariás) adása nem befolyásolta a hemodinamikai paramétereket és a véráramlást. Ezzel szemben az L-NAME szignifikánsan emelte az artériás vérnyomást és csökkentette a szívfrekvenciát. A koszorúér-okklúzió hatására a hemodinamikai paraméterek szignifikánsan csökkentek mindegyik csoportban.

I/2. A kontroll kutyákban az okklúziót követően nagyszámú ektópiás ütés és tachikardiás epizód jelentkezett. Az állatok 56%-ban kamrafibrilláció lépett fel az okklúzió alatt, és egyetlen kontroll állat sem élte túl a reperfüziót. A simvastatin hatására szignifikánsan csökkent az kamrai ektópiás ütések száma és emelkedett az iszkémiás és reperfüziós inzultust túlélő kutyák aránya a kontroll csoporthoz képest. Az L-NAME önmagában nem befolyásolta az okklúzió alatti extraszisztolés aktivitást és nem befolyásolta a simvastatin kamrafibrilláció ellen nyújtott védőhatását. Ezzel szemben az L-NAME szignifikánsan csökkentette a simvastatin antiaritmiás hatását a reperfüziót követően.

I/3. A kontroll állatokban a LAD okklúzió hatására gyorsan változtak az iszkémia súlyosságát jellemző paraméterek, így az epikardiális ST-szakasz és az elektromos aktiváció inhomogenitása szignifikánsan emelkedett. A simvastatin hatására ezek a változások számottevően kisebbek

voltak. Bár az L-NAME önmagában nem befolyásolta az iszkémia súlyosságát jelző paramétereket, azonban jelentősen csökkentette a simvastatin antiiszkémiás hatását.

I/4. Kontroll állatokban a LAD okklúzióját követően az NOx koncentráció átmenetileg (7. perc) emelkedett, majd ezt követően fokozatosan csökkent és az okklúzió végére szignifikánsan kisebb volt mint a kiindulási NOx koncentráció. Ezzel ellentétben simvastatin adást követően az NOx szint az okklúzió szinte teljes időtartama alatt emelkedett. Ez a hatás L-NAME jelenlétében megszűnt. Reperfúziót követően az NOx szintek minden csoportban közel azonos mértékben emelkedtek.

I/5. A LAD 25 perces okklúziójának végére az eNOS aktivitása szignifikánsan csökkent. Simvastatinkezelés hatására mind az enzim foszforilációja, mind pedig funkcionális aktivitása megőrződött. Az L-NAME önmagában nem befolyásolta az iszkémia hatására kialakuló eNOS aktivitáscsökkenést, azonban meggátolta a simvastatin által kiváltott enzimaktivitás fokozódását anélkül, hogy befolyásolta volna az enzim foszforilált állapotát. A reperfúziót követően az eNOS aktivitása gyorsan helyreállt a kontroll kutyákban, megmaradt a simvastatinnal kezelt kutyában, és továbbra is gátlás alatt maradt a L-NAME-mel kezelt állatok esetében.

I/6. A 25 perces okklúzió és reperfúziót követően erőteljes szuperoxid-termelődést tapasztaltunk közvetlenül a koszorúér felengedése után. Ezt a szuperoxid-termelődést a simvastatin szignifikáns mértékben csökkentette, amelyet az L-NAME adása ugyancsak meggátolt.

I/7. Annak vizsgálatára, hogy vajon a simvastatin közvetlen elektrofiziológiai hatásokkal rendelkezhet mértük a QTc-intervallum változását. A kontroll állatokban az okklúziót követő 5. percben már jelentős QTc-intervallum nyúlást tapasztaltunk, mely az okklúzió teljes időtartama alatt fennmaradt. A simvastatin, függetlenül attól, hogy L-NAME jelenlétében adtuk vagy sem, meggátolta a QTc-szakasz iszkémia hatására bekövetkező megnyúlását.

II/1. A simvastatin és a wortmannin lokális adását követően a hemodinamikai paraméterek nem változtak számottevően. A LAD okklúziója minden csoportban szignifikánsan és közel azonos mértékben változtak a hemodinamikai paraméterek (pl. az artériás vérnyomás és kamrai kontraktilitás csökkent, a végdiasztolés nyomás emelkedett), míg az LCX koszorúéren mért, ún. kompenzatórikus áramlást egyetlen alkalmazott szer sem változtatta meg jelentősen.

II/2. A wortmannin kezelést követően szignifikánsan csökkent a simvastatin antiaritmiás hatása. Így wortmannin jelenlétében emelkedett a kamrai ektópiás ütések és tachikardiás epizód

száma, és hasonlóan mint a kontroll csoportban egyetlen állat sem élte túl a kombinált okklúziós és reperfúziós inzultust. Ugyanakkor, a wortmannin, hasonlóan mint az L-NAME, nem befolyásolta a simvastatin védőhatását az iszkémia okozta kamrafibrilláció tekintetében. A kontroll csoporthoz hasonlítva a wortmannin és a DMSO (a wortmannin oldószere) sem befolyásolta a LAD 25 perces okklúziója és a reperfúzió által kiváltott ektópiás ütések. Ezekben a csoportokban továbbá egyetlen állat sem élte túl a reperfúziót.

II/3. Bár a PI 3-kináz wortmanninnal történő gátlása nem befolyásolta jelentősen az iszkémia okozta inhomogenitást és ST-szakasz emelkedést, azonban teljes mértékben megszüntette a simvastatin antiiszkémiás hatását. .

II/4. A simvastatin eNOS aktivitást fokozó hatása wortmannin jelenlétében megszűnt, azonban a wortmannin önmagában nem befolyásolta az eNOS foszforilált állapotában iszkémia hatására bekövetkező változásokat. A koszorúér felengedését követően a NOS aktivitása a wortmanninnal kezelt csoport kivételével azonnal helyreállt az összes csoportban.

II/5. A wortmannin adása megszüntette az NOx korai emelkedését a kontroll állatokban és teljes mértékben megszüntette az NOx szintek emelkedését a simvastatinnal kezelt állatokban. A DMSO-nak nem volt hatása az NO hozzáférhetőségére.

II/6. A DMSO és a wortmannin alkalmazása sem volt hatással az iszkémia/reperfúzió indukálta szuperoxid-termelődésre, azonban a wortmannin megszüntette a simvastatin szuperoxid-termelődésre gyakorolt gátló hatását.

II/7. Az L-NAME-hez hasonlóan a wortmannin jelenléte sem befolyásolta a simvastatin QTc-intervallumra kifejtett hatását.

Összefoglalás

A kontroll csoporthoz képest – amelyben az állatok a simvastatin oldószerezt kapták –, a simvastatin alkalmazása szignifikánsan csökkentette az iszkémia, valamint a kamrai ritmuszavarok súlyosságát, és fokozta az eNOS aktivitását. Ennek következtében növekedett a plazma NO metabolitok koncentrációja okklúzió alatt és szignifikánsan csökkent a reperfúziót követő szuperoxid termelődés. Kísérleteink arra utalnak, hogy a simvastatin akut alkalmazása után tapasztalható kardioprotektív, esetünkben antiarrhythmias hatásban, az IP3/Akt útvonalon keresztüli gyors eNOS-aktiváció fontos szerepet játszik, ugyanis mind a NOS enzimet gátló L-NAME, mind a PI-3 kináz enzimet gátló wortmannin megszünteti a simvastatin védőhatását.

A disszertáció alapját képező irodalmak:

1. **Kisvári G**, Kovács M, Gardi J, Seprényi G, Kaszaki J, Végh Á. The effect of acute simvastatin administration on the severity of arrhythmias resulting from ischaemia and reperfusion in the canine: Is there a role for nitric oxide? *Eur J Pharmacol.* **2014**; 5;732:96-104.
2. **Kisvári G**, Kovács M, Seprényi G, Végh Á. The activation of PI 3-kinase/Akt pathway is involved in the acute effects of simvastatin against ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetised dogs. *Eur J Pharmacol.* **2015**; 15;769:185-94.