

A réskapcsolatok szerepének vizsgálata a nitrogén-monoxid antiaritmiás hatásában és a gyors szívingerléssel kiváltott prekondicionálás késői antiaritmiás hatásában

Gönczi Márton

PhD Tézis

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2013

Bevezető

A koszorúér-elzáródás következtében kialakuló szívizomiszkémia egyik legsúlyosabb következménye azon akután megjelenő súlyos kamrai ritmuszavarok, amelyek gyakran hirtelen szívhalálhoz vezethetnek. Ezen aritmiák megjelenésében szerepet játszó mechanizmusoknak a megismerése, kialakulásuk megakadályozása, illetve kezelése a kísérletes kardiológiai kutatások egyik fontos célkitűzése.

Munkacsoportunk évtizedek óta vizsgálja az akut koszorúérokklúzió során kialakuló szívritmuszavarok mögött meghúzódó mechanizmusokat és az azokat befolyásoló lehetőségeket. Kimutattunk, hogy a Murry és munkatársai által leírt prekondicionálás (PC) nemcsak az iszkémiás károsodás kiterjedését csökkenti, hanem az iszkémia okozta kamrai aritmiák kialakulását is jelentősen gátolja. A PC antiiszkémiás és antiaritmiás hatásának kialakításában számos endogén molekula, köztük a bradikinin, adenzin, szabadgyökök, prosztanoidok, és a nitrogén-monoxid (NO) szerepét igazolták. Fontos kiemelni, hogy a PC védőhatása két fázisban jelentkezik; a korai védőhatás, amely a PC inger után azonnal jelentkezik, viszont 1-2 óra múlva megszűnik, azonban spontán módon 12-24 óra múlva újra megjelenik. Ezt késői védőhatásnak nevezzük. Ugyancsak munkacsoportunk írta le először, hogy a védőhatás más, az érelzárásnál kevésbé invazív beavatkozásokkal, például a szív magas frekvenciával történő ingerlésével, vagy erős fizikai terheléssel is kiváltható.

Számos kísérletes bizonyíték utal arra, hogy a szívizomsejteket összekötő réskapcsolatok fontos szerepet játszanak az iszkémia során fellépő aritmiák keletkezésében. Iszkémia során ezek a szomszédos sejteket összekötő csatornák záródnak, amely inhomogén ingerületvezetést és az aritmiák megjelenését eredményezi. A csatornákat alkotó Connexin 43 (Cx43) fehérje expressziója és foszforilációs állapota alapvető a réskapcsolatokon keresztül megvalósuló sejtek közötti kommunikáció szabályozásában. Számos kísérlet igazolta a réskapcsolatok szerepét a PC korai védőhatásában, amelyek szerint a PC mérsékli a réskapcsolatok iszkémia alatti záródását. További bizonyítékként szolgál az, hogy a PC kardioprotektív hatása megszűnik, ha a réskapcsolatokon keresztül megvalósuló sejt-sejt kommunikációt a PC stimulust megelőzően gátoljuk.

Számos *in vitro* kísérlet utal arra, hogy a NO közvetlenül a csatornafunkciót vagy a Cx43 fehérje expresszióját befolyásolva képes szabályozni a réskapcsolatok működését. A NO ilyen szabályozó hatásáról azonban kevés *in vivo* eredmény áll rendelkezésre.

Habár ismert, hogy a szív rövid (3-6 óra) vagy hosszú (napok) ideig történő mesterséges ingerlése megváltoztathatja a Cx43 expressziós mintázatát, foszforilációs állapotát és a

réskapcsolatok celluláris eloszlását, nem tudjuk, hogy ezek a mechanizmusok szerepet játszanak-e a szívingerléssel kiváltott PC késői antiaritmiás hatásában.

Célkitűzések

A fentiek alapján az alábbi két kérdés megválaszolására terveztünk kísérleteket:

1. Mivel ismert, hogy NO donor molekulákkal a prekondicionáláshoz hasonló antiaritmiás hatás váltható ki, ezért megvizsgáltuk hogy vajon a NO a réskapcsolatok működésének befolyásolásával hozzájárul-e az iszkémia okozta kamrai aritmiák csökkentéséhez?

A kérdés megválaszolásához a NO donor nátrium-nitroprusszidot (SNP) alkalmaztuk, amelyet a szívizomiszkémia előtt 20 perccel a koszorúér lefogást megelőzően és a 60 perces koszorúérokklúzió teljes időtartama alatt intrakoronáriás infúzióban alkalmaztunk.

2. Vajon a réskapcsolatok szerepet játszanak-e a gyors kamrai szívingerléssel kiváltott késői antiaritmiás hatásban?

Milyen változások történnek a szívingerlést követően a Cx43 fehérje expressziójában, celluláris eloszlásában, illetve hogyan módosul a réskapcsolatok funkciója a szívingerlést követően 24 órával előidézett 25 perces koszorúérokklúzió során.

Anyagok és módszerek

- Kloralóz-uretánnal altatott nyitott mellkasú kutyákon, bal elülső leszálló artéria (LAD) preparálása és lefogása 60 illetve 25 percig iszkémia előidézése céljából
- SNP intrakoronáriás infúziója 0,2µg/kg/perc dózisban
- Jobb kamrai szívingerlés 4x5 percen keresztül 240 ütés/perc frekvenciával
- Hemodinamika paraméterek mérése
- Iszkémia súlyosságát jelző paraméterek mérése: epikardiális ST-szakasz változása, elektromos aktiváció inhomogenitása, totál aktivációs idő (TAT) mérése kompozit és térképező elektróddal
- Kamrai aritmiák meghatározása: extraszisztolék, tachicardiás epizódok, kamrafiibrilláció
- Elektromos kapcsolat meghatározása szöveti impedancia méréssel
- Metabolikus kapcsolat vizsgálata kettős fluoreszcens festék permeabilitás vizsgálattal

- Cx43 mRNS expresszió változás mérése valós idejű RT-PCR-al
- Cx43 fehérje expresszió ill foszforilációs mintázat vizsgálata Western-blot technikával
- Cx43 celluláris eloszlásának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel.

Eredmények

Az SNP korai antiaritmiás hatása a belőle felszabaduló NO réskapcsolatokat befolyásoló hatásán keresztül valósul meg

1. Az SNP intrakoronáriás infúziója enyhe artériás vérnyomáscsökkenést okozott. A LAD okklúzió hatására a hemodinamikai paraméterek jelentősen csökkentek, a kontroll és az SNP-vel kezelt csoport között szignifikáns különbség nem adódott. Az SNP infúzió sem a kollaterális véráramlást, sem az okklúzió hatására bekövetkező kompenzatorikus véráramlásfokozódást nem befolyásolta.
2. Az iszkémia súlyosságát jelző két paramétert, az epikardiális ST szakasz elevációját és az elektromos aktiváció inhomogenitását az SNP a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkentette.
3. A koszorúérlefozás követően a kontroll csoportban a kamrai aritmiák két fázisban jelentkeznek, Ia és Ib fázisban. Az extraszisztolék száma a 60 perces okklúzió alatt 666 ± 202 , a tachikardiás epizódok száma 8 ± 3 , ami az állatok 55%-ában jelentkezett.. Amennyiben az állatokat SNP-vel kezeltül, az ektópiás ütések száma jelentősen 49 ± 18 -ra csökkent, tachikardiás epizódok száma 0.3 ± 0.3 az állatok 20%-ban volt megfigyelhető. Kamrafibrilláció okklúzió alatti gyakoriságára az SNP infúziója nem volt hatással.
4. A réskapcsolatok által létrehozott elektromos sejt-sejt kapcsolat iszkémia okozta változásait a szívizom szöveti ellenállás és a sejtmembránok kapacitív tulajdonságát jellemző fáziseltolódás mérésével vizsgáltuk. Iszkémia hatására a kontroll csoportban jelentősen emelkedett a szöveti ellenállás, ugyanakkor a fázisszög negatív irányba tolódott, ami az elektromos kapcsolat jelentős gátlódására, a réskapcsolatok záródására utal. SNP infúziója mérsékelte a szöveti ellenállás és a fáziseltolódás mértékét, azaz javította a sejtek közötti elektromos kapcsolatot.
5. A réskapcsolatok permeabilitásának iszkémia indukált változásait ún. kettős fluoreszcens-festék terjedéssel vizsgáltuk. A kontroll csoportban a szívizomsejtek közötti metabolikus kapcsolat a normoxiás szívizomban jelentősen csökkent, azonban SNP hatására az iszkémiás területen a permeabilitás fokozódott, amely a sejtek közötti kapcsolat megőrzésére utal.

6. Szívizomiszkémia alatt a sejtek ATP raktárai kimerülnek, amelynek egyik eredménye a Cx43 fehérje defoszforilációja és következményes réskapcsolat záródás. A kontroll állatokban a normoxiás szívminákban a Cx43 fehérje foszforilációs és defoszforilációs (P/DP) aránya $53/47 \pm 1\%$, azonban az iszkémia hatására jelentős defoszforilációt figyeltünk meg, a P/DP aránya $28/72 \pm 2\%$ -nak mutatkozott. Ezzel szemben az SNP-vel kezelt csoportban a Cx43 P/DP aránya az iszkémiás területen $62/38 \pm 3\%$.

A réskapcsolatok szerepe a gyors szívingerléssel kiváltott prekondicionálás késői antiaritmiás hatásában

1. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a szív jobb kamrán keresztüli ingerlése milyen változást idéz elő a Cx43 expressziójában, a szívingerlést követően különböző időpontokban vett szívszöveti mintákban meghatároztuk a Cx43 mRNS és fehérje mennyiségét. Eredményeink azt mutatták, hogy a Cx43 mRNS mennyisége 6 órával a szívingerlés után jelentősen csökkent, míg az ingerlést követően 12 órával kifejezett mRNS expressziót figyeltünk meg, ami 24 órával az ingerlési protokoll után helyreállt. Ezzel összhangban a Cx43 összfehérje mennyiségében 12 órával a stimulus után jelentős, közel 50%-os csökkenést figyeltünk meg. Immunhisztokémiai vizsgálat során a 12 órás mintákban az szívizomsejtek közötti interkaláris lemezben a Cx43 mennyisége csökkent, megváltozott celluláris lokalizációt nem tapasztaltunk. A Cx43 fehérjeszintje 24. órával a szívingerlést követően helyreállt. A koszorúérokklúzió sem a kontroll sem a szívingerelt állatokban nem okozott Cx43 mRNS- vagy fehérjemennyiségbeli változást.
2. Az iszkémiás területre elhelyezett 31 unipoláris elektróddal mértük az iszkémia súlyosságát jelző paramétereket. A kontroll csoporttal szemben, ahol a koszorúérokklúzió jelentős ST-szakasz eleváció és aktivációs idő növekedését eredményezett, a szívingerelt állatokban méréselődött az ST-szakasz eleváció és javult az ingerület vezetése, amit a totál aktivációs idő csökkenése jelzett.
3. A kontroll csoporttal ellentétben ahol jelentős ektópiás aktivitást nagyszámú tachicardiás epizódot és alacsony túlélési arányt figyeltünk meg, a 24 órával előzőleg szívingerléssel prekondicionált állatokban szignifikánsan kevesebb extraszisztolés tachicardiás epizód jelentkezett és az állatok jelentős része túlélte az iszkémiás/reperfúziós beavatkozást.
4. A szöveti impedancia mérésével megállapítottuk az elektromos sejt-sejt kapcsolat minőségét. A kontroll csoportban az iszkémia hatására – a szöveti ellenállás növekedése és fáziseltolódás alapján – a réskapcsolatok záródása következtében a sejtek közötti

elektromos kapcsolat jelentősen gátlódott. Ezzel ellentétben a 24 órával előzőleg prekondicionált csoportban a szöveti ellenállás növekedése és a fáziseltolódás szignifikánsan mérséklődött.

5. A szívimsejtek közötti metabolikus kapcsolat a 25 perces iszkémia hatására szignifikánsan csökkent ellenben a szívingerelés az iszkémia okozta metabolikus szétkapcsolódást mérsékelte. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a Cx43 foszforilációs állapotában is, ahol az iszkémia indukált defoszforilációt, a prekondicionálás meggátolta.
6. Az immunhisztokémiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a kontroll szívmintákban iszkémia hatására az interkaláris lemez strukturális változáson ment keresztül, szerkezete megbomlott, és ez a változás a reperfüzió hatására tovább fokozódott. Amennyiben 24 órával megelőzően szívingerlést végeztünk, az interkaláris lemezek szerkezeti változásai nem jöttek létre.
7. Mivel 12 órával a szívingerlés után számottevő Cx43 fehérje csökkenést figyeltünk meg, amely iszkémiás körülmények között feltehetően fokozottabb ingerületvezetési zavarokhoz vezet, így megvizsgáltuk, hogy amennyiben ekkor a LAD-ot elzárjuk, miképpen alakulnak a kamrai aritmiák. Azt tapasztaltuk, hogy a szívingerlést követő 12. órában megfigyelt csökkent Cx43 expresszióhoz fokozott aritmiatevékenység és markáns szöveti impedancia változások társultak.

Összefoglalás

- A NO donor SNP a belőle felszabaduló NO-on keresztül a réskapcsolatok iszkémia alatti módosításával fejtheti ki antiaritmias hatását, feltehetően az által hogy megőrzi a Cx43 foszforilációs állapotát, ezáltal mérsékli az elektromos és metabolikus szétkapcsolódás mértékét.
- A gyors kamrai szívingerlést követően a Cx43 expressziója mRNS és fehérjeszinten is időfüggő változásokat mutatott: 6 órával a szívingerlés után a Cx43 mRNS szintje, 12 órával a fehérjeszint jelentősen csökkent, azonban 24 órával a szívingerlést követően mind a mRNS, mind a fehérjeszint normalizálódott. A 12 óránál megfigyelt csökkent Cx43 fehérjeszint fokozott réskapcsolatzáródással és aritmiákkal párosult, ha ebben az időszakban idéztünk elő iszkémiát. A szívingerléssel prekondicionált állatokban a koszorúérokklúzió során csökkent a kamrai aritmiák súlyossága, feltehetően azért, hogy a réskapcsolatok iszkémia alatti záródása mérséklődött. Továbbá a szívingerelt állatokban elmaradt az iszkémi reperfüziót követően az interkaláris lemez strukturális változása.

A disszertáció alapját képező irodalmak:

1. Gönczi M, Papp R, Kovács M, Seprényi Gy, Végh Á. (2009) Modulation of gap junction by nitric oxide contributes to the antiarrhythmic effect of sodium nitroprusside? *Br J Pharmacol* **156**:786-793.
2. Gönczi M, Kovács M, Seprényi Gy, Végh Á. (2012) The involvement of gap junctions in the delayed phase of the protection induced by cardiac pacin gin dogs. *Clin Sci (Lond)* **123**:39-51.