

**ÚJABB BIZONYÍTÉKOK A NITROGÉN-MONOXIDNAK AZ
ISZKÉMIÁS PREKONDICIONÁLÁS ANTIARRHYTHMIÁS
HATÁSÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉRE: A PEROXYNITRIT ÉS A
NOS-ENZIMFÜGGŐ NO KÉPZŐDÉS**

Doktori értekezés tézisei

Juhász László

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája

című Doktori Program



Témavezető:

Prof. Dr. Végh Ágnes

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2015

PUBLIKÁCIÓK

A tézisben összefoglalt eredmények a következő publikációk alapján készültek el:

I. **Juhász L**, Kiss A, Nyeső E, Kovács M, Seprényi G, Kaszaki J, Végh Á. Is there a trigger role of peroxynitrite in the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning and peroxynitrite infusion? *Eur J Pharmacol* (2011). 667:306-313. **IF: 2.737**.

II. **Juhász L**, Déri S, Kisvári G, Kiss A, Seprényi G, Gardi J, Végh Á. The effect of ischaemic preconditioning on nitric oxide synthase activity during myocardial ischaemia and reperfusion in anaesthetized dogs. *Curr Res Cardiol* (2014). 2:73-78.

További közlemények:

III. Kiss A, **Juhász L**, Huliák I, Végh Á. Peroxynitrite decreases arrhythmias induced by ischaemia reperfusion in anaesthetized dogs, without involving mitochondrial K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* (2008). 155:1015-24. **IF: 4.902**.

IV. Kiss A, **Juhász L**, Seprényi G, Kupai K, Kaszaki J, Végh Á. The role of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in the anti-arrhythmic effects of preconditioning and peroxynitrite infusion in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* (2010). 160:1263-72. **IF: 4.925**.

V. **Juhász L**, Demeter Haludka V, Seprényi Gy, Kaszaki J, Gardi J, Végh Á. Acute inhibition of monoamine oxidase with pargyline does not modify the severity of ischemia and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs. *J Exp Clin Cardiol* (2013). 1-7. **IF: 1.10**.

BEVEZETÉS

Tanulmány I.

A szívizomzat koszorúér elzáródásából eredő elégtelen vérellátása olyan jellegzetes metabolikus és elektrofiziológiai (iszkémiás) változásokat indít el a szívben, amelyek gyakran végzetes kimenetelű kamrai aritmiákhoz vezetnek. A WHO felmérései alapján, évente több mint 7 millió ember (nők és férfiak egyaránt) veszti életét az iszkémiás eredetű szívbetegség következtében fellépő hirtelen szívhalál miatt. Az akut iszkémiás szívbetegség talaján kialakuló súlyos kamrai ritmuszavarok megelőzésére vagy legalábbis csökkentésére új stratégiák kidolgozására van szükség, s ez mind a mai napig kihívást jelent mind a kísérletes, mind a klinikai kardiológia számára. A prekondicionálás (PC) jelensége egyike ezen új kardioprotektív stratégiáknak, amelyet először Murry és munkatársai 28 évvel ezelőtt írtak le altatott kutyában. Kísérleteikben kimutatták, hogy amennyiben a bal koszorúér circumflexus ágának (LCX) 40 perces okklúzióját megelőzően, ugyanezt az eret 4 x 5 percre elzárták, számottevően csökkent az infarktusz terület nagysága, a szívizom ATP igénye valamint mérséklődött az iszkémia okozta savasodás. A PC kardioprotektív hatását számos kísérletben megerősítették. Ismertté vált, hogy a PC jelentős védelmet nyújt az iszkémia/reperfúzió (I/R) okozta kamrai ritmuszavarokkal szemben, és a reperfúziót követően javítja a kontraktilis funkció helyreállítását. A védőhatás kialakításáért feltehetően a rövid PC ingerek során felszabaduló endogén anyagok a felelősek, amelyek receptor-függő és receptortól független mechanizmusok révén, különböző jelátviteli útvonalakat aktiválnak. Az endogén anyagok közül elsőként azonosították a prosztaciklint, az adenzint, a bradikinint és a nitrogén monoxidot, a PC kardioprotektív hatásában. Újabb kutatási eredmények felvetették annak a lehetőségét is, hogy a nitrogén monoxid (NO) és szuperoxid reakciója során képződő peroxinitrit (PN) szintén szerepet játszhat a PC-kiváltott antiaritmiás hatásban. Patkány izolált szívpreparátumon végzett vizsgálatokból ismert, hogy a PN képződés gátlása húgysavval (UA) a PC alatt az antiaritmiás hatás megszűnését eredményezte. Hasonlóan, az exogén módon alkalmazott PN kardioprotektív hatása is megszűnt UA jelenlétében.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei igazolták, hogy közvetlenül a koszorúér-keringésbe, 100 nM-os koncentrációban juttatott PN, szignifikánsan csökkentette a 25 perces koszorúér okklúzió/reperfúzió során fellépő kamrai aritmiák súlyosságát altatott kutyában. Az ilyen módon előidézett védőhatás mértéke az iszkémiás prekondicionálással és a NO donorok protektív hatásával volt összemérhető. Az a tény, hogy az exogén PN véd az akut I/R okozta aritmiákkal szemben felvetette annak a lehetőségét, hogy az endogén módon képződő PN is

hozzájárulhat a PC kiváltotta antiaritmiás hatás kialakulásához az általunk alkalmazott nagyállat modellben.

Tanulmány II.

A legelső bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a NO mint „trigger” és mint „mediátor” részt vesz a PC kardioprotektív (antiaritmiás) hatásában laboratóriumunkból származik. Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a PC aritmiákkal szembeni védőhatása megszűnik, ha a NO szintézisét végző nitrogén monoxid szintáz (NOS) enzimet L-NAME-mel gátoljuk.

Korábbi kísérleteinkben azt is igazoltuk, hogy altatott kutyában PC hatására, a sinus coronariusból vett vérmintákban a plazma nitrát/nitrit (NO_x) koncentrációja a 25 perces koszorúér okklúzió alatt szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll állatokban, amelyekben az NO_x szintje egy átmeneti emelkedést követően (az okklúzió 7. perce), folyamatosan csökkent. Bár irodalmi adatok utalnak arra, hogy a PC inger (pl. erőteljes fizikai aktivitás) befolyásolhatja a NOS aktivitását és expresszióját, kísérletes bizonyíték nem áll a rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a PC után a NO biológiai hozzáférhetőségének növekedése, a NOS enzim PC általi aktiválásának az eredménye vagy más enzim-független mechanizmusoknak köszönhető. A legújabb szakirodalmi adatok ugyanis arra utalnak, hogy különösen iszkémiás körülmények között, NO ún. „nem-enzimatikus” úton is keletkezhet. Ezek az elsődlegesen izolált szívpreparátumokból származó eredmények azt sugallják, hogy iszkémiás szívizomban a nitritből történő NO képződés a preferált az enzimatis NO produkcióval szemben.

Mindezen előzményeket figyelembe véve kísérleteket terveztünk annak vizsgálatára, hogy PC-t követően, a hosszú iszkémiás inzultus alatt tapasztalható emelkedett NO_x koncentrációk, a NOS enzim aktivitásfokozódásának eredménye és/vagy egy enzim-független mechanizmus is szerepet játszik. Miután nem tudjuk, hogy a PC okklúziók/reperfúziók során keletkező egyéb endogén anyagok, pl. a szuperoxid és a PN szintje, hogyan alakul és miként változik az idő függvényében, és ezek milyen módon hatnak az NO képződésre, kísérleteinken párhuzamosan mértük a szöveti szuperoxid és PN koncentrációk időbeni változását is.

CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben ismertetettek, két tanulmány eredményeit foglalják össze.

A dolgozat első részében (**Tanulmány I**) arra a kérdésre kerestük a választ, vajon a PC okklúziók/reperfúziók során képződő PN „trigger” szerepet játszik-e a PC antiarrhythmias hatásában? Ennek a kérdésnek a megválaszolására olyan kísérleteket terveztünk, amelyekben az állatok a PC okklúziók/reperfúziók alatt, a PN viszonylag szelektív befogószerét, hűgysavat (UA) kaptak. Az így nyert eredményeket a 100 nM-os PN-el kezelt csoporttal vetettük össze. A hűgysavat intravénás infúzióban (0.2 mg/kg/min) 10 perccel a PC okklúziók/reperfúziók előtt és alatt (PC teljes időtartama 20 min) vagy a 100 nM-os intrakoronáriás PN infúzióval egyszerre adtuk.

A dolgozat második részében (**Tanulmány II**) azt vizsgáltuk, vajon a PC hatására kialakuló kedvező NO biológiai hozzáférhetőség, a NOS enzim aktivitásában bekövetkező változások következménye vagy más NOS enzimtől független mechanizmus(ok) is szerepet játszhatnak. Ennek eldöntésére, olyan kísérleteket terveztünk, amelyekben meghatároztuk a NOS enzim aktivitásának idő-függő változását és ezzel párhuzamosan követtük a plazma NOx, valamint szöveti szuperoxid és NT képződést kontroll és prekondicionált kutyákban.

MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és műtéti beavatkozások

Kísérleteinket mindkét nemhez tartozó, átlagosan 19 ± 5 kg (Tanulmány I) és 18 ± 4 kg (Tanulmány II) súlyú keverék kutyákon végeztük. Az altatás bevezetésére pentobarbitált ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ iv.) alkalmaztunk, majd a jobb femorális vénába vezetett katéteren keresztül a narkózist kloralóz-uretán keverékével tartottuk fenn (60 and 200 mg kg^{-1} iv.). A jobb femorális artériába vezetett polietilén katéteren keresztül az artériás vérnyomást (szisztolés, diasztolés és közép), míg a bal artéria carotison keresztül a bal kamrába vezetett katéter segítségével a bal kamrai szisztolés és végdiasztolés nyomásváltozásokat valamint balkamrai dP/dt értékeket határoztuk meg. A mellkas-nyitást követően (5. bordaköz), a bal koszorúér artéria elülső leszálló ágát (LAD), az első marginális ágtól proximálisan, későbbi okklúzió céljára kipreparáltuk. Az okklúzió helyétől disztálisan, ugyanezen ér egyik kisebb oldalágába kanült vezetettünk, amely a pH 8.4-es sóoldat vagy a peroxinitrit infúzió beadására szolgált. A jobb juguláris vénán keresztül katétert vezetettünk a sinus coronáriusba a plazma nitrát/nitrit (NOx) szintjének meghatározására. A hűgysavat intravénás infúzióban, a bal juguláris vénába helyezett katéteren adtuk.

2. A kamrai aritmiák meghatározása

A kamrai aritmiák számát és gyakoriságát az II-es elvezetésű EKG-ról, a Lambeth konvenció alapján értékeltük. Így a 25 perces okklúzió alatt meghatároztuk a kamrai extraszisztolék (VPBs) és kamrai tachikardiás epizódok (VT; 4 vagy annál több egymás utáni VPBs) számát, valamint a VT és kamrafibrilláció (VF) gyakoriságát. Reperfúzió során csak a VF és túlélés gyakoriságát vizsgáltuk.

3. Az iszkémia súlyosságának meghatározása

A szívizom iszkémia súlyosságát két paraméterrel, az epikardiális ST-szakasz és az elektromos aktiváció inhomogenitásának változásával jellemeztük. Mindkét paramétert a bal kamra felszínére, az iszkémiás terület feltételezett középpontjába varrt kompozit elektróddal vizsgáltuk. Az elektród az epikardiális felszín 24 pontjáról gyűjti össze és összegzi az R hullámokat. Normál perfúzió és oxigénellátottság esetén minden pont egyszerre aktiválódik, amelynek az eredménye egyetlen R hullám. Iszkémiát követően, a szívizom csökkent perfúziója következtében a rostok aktivációja inhomogénné válik, amely az összesített R hullám kiszélesedésében és felrostozódásában nyilvánul meg. Az inhomogenitás mértékét az első és utolsó R-hullám közötti idő elteltével jellemeztük, és ms-ban fejeztük ki. A kompozit elektródon elhelyezett négy unipoláris elvezetés segítségével elektrogrammot regisztráltunk, amelyen az iszkémiás területen belüli ST-szakasz változását mV-ban mértük.

4. Plazma nitrát/nitrit (NO_x) meghatározás

A plazma nitrát/nitrit (NO_x) szinteket Griess-reakcióval határoztuk meg. A kísérletek különböző időpontjaiban a sinus coronarius-ból vett vérmintákat 15 percig 4°C-on 10 000 g-n centrifugáltuk. Ezt követően a plazmát β-NADPH, FAD, és nitrát-reduktáz enzimmel 30 percig 37°C-on inkubáltuk. A nitrát nitritté történő enzimatisz átalakítása után a reakcióelegyet Griess reagenssel további 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A keletkező azo-vegyület abszorpcióját spektrofotométerrel 540 nm-es hullámhosszon határoztuk meg. A NO_x koncentrációjának meghatározásához standardként NaNO₂-t és NaNO₃-t használtunk.

5. A szöveti szuperoxid képződés meghatározása

A szuperoxid képződést dihydroethidine (DHE) fluoreszcens festési eljárással határoztuk meg. A DHE sejten belül szuperoxid jelenlétében fluoreszcens ethidiummá oxidálódik, és a DNS-hez kötődik. Az iszkémiás területről származó szövetmintákból (0,5 x 0,5 x 2 cm,

Tissue-tekbe ágyazva) kriosztáttal 20 μm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket 1 μM (pH 7,4-es foszfát pufferben feloldott) DHE-vel inkubáltuk 37 °C-on, 30 percen keresztül. A negatív kontroll mintákat a DHE festést megelőzően thiol tartalmú antioxidánssal, N-acetil ciszteinnel (100 mM) blokkoltuk. Szemi-kvantitatív analízis céljából konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Olympus FV1000) 10-15 felvételt készítettünk a DHE-vel festett és negatív kontroll mintákról. A fluoreszcens jeleket ImageJ szoftver segítségével értékeltük és a kapott intenzitás értékeket önkényes skálán ábrázoltuk.

6. Nitrotirozin meghatározása Western blottal

A peroxinitrit (PN) képződés markereként használt nitrotirozin (NT) mennyiségét Western blottal határoztuk meg. 20 μg fehérje mintát 8%-os poliakrilamid gélen szétválasztottunk, majd a gélből a fehérjesávokat PVDF membránra blottoltuk (100 V, 400 mA, 120 min). A membránt a blokkolást (5 %-os tej) követően elsődleges (1:1000 hígítás; egér anti-NT monoklonális antitest) majd másodlagos (1:1000 hígítás; HRP-konjugált nyúl anti-egér IgG) antitesttel inkubáltuk. A membránok kemilumineszcens jelét ECL Plus kittel röntgen filmre hívtuk elő. A NT jelek intenzitását ImageJ szoftver segítségével számszerűsítettük és az álműtött állatok %-ban fejeztük ki.

7. Nitrogén monoxid szintáz (NOS) enzim aktivitás mérése

A NOS enzim aktivitását (Tanulmány II) RIA kit (Cayman Chemical) segítségével a gyári tájékoztatóban megadott előírások alapján határoztuk meg. A módszer a radioaktív [^3H] L-arginin NOS enzim általi [^3H] L-citrullinná történő biokémiai átalakításán alapszik. A szövetmintákból (100 mg szívpor) fehérjét izoláltunk; a mintákhoz jégen homogenizációs puffert adtunk majd 4 °C-on 15 percig 10000g-n centrifugáltunk. Ezt követően a felülúszót a reakció eleggyel szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk. Folyadék szcintillációs számlálóval (WizardTM) a reakció során keletkező radioaktív citrullin mennyiségét detektáltuk melyet pmol citrullin/min/mg fehérje egységben fejeztünk ki.

8. Kísérleti protokoll

Tanulmány I.

Kísérleteinket altatott kutyák tizenegy csoportjában végeztük. A műtéti beavatkozásokat követően 20 percet hagytunk a hemodinamikai és vérgáz paraméterek stabilizálódására. Miokardiális iszkémiát valamennyi csoportban a LAD 25 perces okklúziójával idéztünk elő, melyet gyors reperfüzió követett. A prekondicionált állatokban ezt megelőzően ugyanezen

eret 2x5 percre lefogluk húgysav jelenlétében (UA+PC; n=8) és hiányában (PC; n=10). A húgysav infúziót (0.2 mg/kg/min) a juguláris vénán keresztül 30 perccel a hosszú okklúziót megelőzően adtuk. További két csoportban a kutyák intrakoronáriás infúzióban 100 nM koncentrációban peroxinitritet kaptak (sebesség: 0.5 ml/min) húgysav jelenlétében (UA+PN; n=8) és hiányában (PN, n=10). A PN-t tartalmazó fecskendőket fóliával tekertük körbe annak érdekében, hogy az oldatot megóvjuk a fény általi lebomlástól. Kontrollként két csoportot használtuk, amelyekben a kutyák pH 8,4-es fiziológiás sóoldatot (C1; n=14) vagy húgysavat (UAC; n=9) kaptak az I/R előtt. További öt csoportban, az NT képződés meghatározás érdekében, mind az UA-val kezelt és kezeletlen állatok szívét a 2x5 min pH 8,4-es sóoldat (C2; n=4), a PN infúziók (PN; n=3; UA+PN; n=3), valamint PC eljárást (PC; n=4; UA+PC; n=3) követően állítottuk le. A hosszú okklúzióknak is alávetett csoportokban, a reperfüzió 2. percéig túlélő állatokat túlaltattuk, majd az iszkémiás területről származó mintákban ugyancsak meghatároztuk az NT szinteket.

Tanulmány II.

Kísérleteinket altatott kutyák hét csoportjában végeztük, csoportonként 3-5 állattal. A műtéti beavatkozásokat 30 perces stabilizálódási periódus követte. Szívizom iszkémiát az összes csoportban (kivéve az álműtött csoport), a bal koszorúér artéria elülső leszálló ágának (LAD) okklúziójával idéztünk elő. Három csoport szolgált kontrollként. Ezekben a csoportokban az állatok túlaltatását követően szívszöveti mintákat vettünk a 30 perces stabilizálódási periódus végén (C0; n=5) vagy a koszorúér okklúzió 5. (C1; n=4) és 25. percében (C2; n=3). További négy csoportban a kutyákat a LAD 2x5 perces okklúziójával (5 perc reperfüzióval megszakítva) prekondicionáltuk. Ezekben a csoportokban az eutanáziát követően mintát vettünk a második PC okklúzió végén (PC1; n=5), és 5 perccel később (PC2; n=4), valamint a hosszú iszkémia 5. (PC3; n=4) és 25. percében (PC4; n=3). A LAD területéről származó mintákból a NOS enzim aktivitását és szöveti szuperoxid képződését mértük. A kísérletek különböző időpontjaiban a sinus coronáriusból vérmintákat gyűjtöttünk a plazma NOx szintjeinek meghatározásához.

EREDMÉNYEK

I/1. A kontroll csoportban, a LAD okklúzióját követően nagy számban jelentkeztek kamrai extraszisztolék és tachikardiás epizódok (a kutyák több mint 90%-a), valamint az állatok 50 %-a kamrafibrillációban elpusztult az okklúzió alatt és egyetlen állat sem élte túl a kombinált okklúziós/reperfúziós inzultust. Iszkémia hatására az epikardiális ST-szakasz valamint az elektromos aktiváció inhomogenitásának mértéke is szignifikánsan emelkedett, melyek maximális változásukat az okklúzió 5. perce körül érték el. Mind a PC, mind a PN 100 nM koncentrációjú infúziója jelentősen csökkentette a koszorúér okklúzió kiváltotta kamrai ritmuszavarok súlyosságát és növelték a reperfúzió alatti túlélés arányát. Továbbá, az iszkémia súlyosságát jellemző paraméterek változása is szignifikánsan kisebb volt a PC és PN-nel kezelt csoportokban. Míg a húgysav (UA) számottevően nem befolyásolta a PC antiaritmiás és anti-iszkémiás hatását, addig szinte teljes mértékben megszüntette a PN védőhatását. Érdekes módon az UA intravénás infúziója az okklúzió/reperfúzió előtt adva, önmagában is kardioprotektív hatásúnak bizonyult.

I/2. Mind a rövid PC okklúziók /reperfúziók, mind a PN infúziók sorozata egyaránt jelentős NT képződést eredményezett. Ez a hatás húgysav jelenlétében teljes mértékben megszűnt. A 25 perces okklúzió/reperfúziót követően a NT szintje jelentős mértékben megemelkedett, de ez a PC és PN-nel kezelt kutyákban szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a kontroll állatokban. Húgysavval történő kezelést követően csak a PN NT-képződést csökkentő hatása szűnt meg, a PC védőhatása továbbra is megmaradt. Érdekes módon az UA önmagában is csökkentette a hosszú I/R-t követő NT képződést.

I/3. Mind a PC okklúziók, mind a hasonló időtartamú PN infúziók növelték a NO metabolitok (nitrát/nitrit) szintjét, és ez az emelkedés a hosszú iszkémia alatt is fennmaradt. Ezzel szemben a kontroll kutyák NOx értékei az okklúzió végére jelentősen lecsökkentek. A húgysav adása egyik csoportban sem befolyásolta számottevően az NO képződést a hosszú okklúzió előtt, sem pedig azt követően a PC kutyákban, azonban teljesen eltüntette a PN NOx szintet megtartó hatását.

I/4. A kombinált I/R inzultust követően markáns szuperoxid képződést tapasztaltunk, mely szignifikánsan csökkent a PC és PN kezelés hatására. Húgysav jelenlétében a reaktív oxigén gyökképződés csökkenése továbbra is megmaradt a PC csoportban, azonban megszűnt a PN csoportban. A húgysav önmagában is mérsékelte a I/R okozta szuperoxid képződést.

II/1. Az iszkémiának alávetett kontroll kutyák mintáiban a NOS aktivitása átmenetileg fokozódott (okklúzió 5. perc; C1), majd amennyiben az okklúziót 25 percig fenntartottuk, az enzim aktivitása az okklúzió végére (C2) jelentősen lecsökkent. A PC okklúziók (2x5 perc, közötté 5 perces reperfúzió) fokozták a NOS aktivitását (PC1), de ez a növekedés újabb 5 perc elteltével, már az alapaktivitás értékére csökkent (PC2). PC kutyákban hosszú iszkémia hatására a NOS enzim aktivitása ismét emelkedett (PC3), és ez az aktivitásfokozódás az okklúzió telje 25 perces időtartama alatt fenn is maradt (PC4).

II/2. A plazma NO_x szintek a NOS enzim aktivitásához hasonlóan változtak. A LAD okklúzió hatására az NO_x szintek átmenetileg emelkedtek (iszkémia 7. perc; C1), majd a 25 perces okklúzió végére csökkentek. PC beavatkozást követően (PC1 és PC2) az NO_x plazma koncentrációi emelkedtek, melyek fennmaradtak, sőt még tovább is nőttek az ezt követő hosszú iszkémia időtartama során (PC3 és PC4).

II/3. A kontroll csoportban a LAD okklúzió 25. percében vett mintákban (C2) jelentős szuperoxid képződést tapasztaltunk, amely arra utal, hogy számottevő ROS képződés már az iszkémia késői fázisában is megindul. A szuperoxid produkciója a hosszú okklúzió alatt szignifikánsan kisebb volt a PC (P3 és PC4) kutyákban, mint a kontroll állatokban, bár a PC okklúziók/reperfúziók sorozata önmagában emelte a szuperoxid szinteket (PC1 és PC2).

II/4. Az álműtött kontroll csoporthoz képest, a 25 perces iszkémia szignifikánsan növelte az NT képződést (C2), mely a PC csoportokban, feltehetően a PC beavatkozások (PC1 és PC2) következtében ugyancsak emelkedő és kumulálódó stabil produktum lévén, az ezt követő hosszú okklúzió alatt (PC3 és PC4) sem változott számottevően.

ÖSSZEFOGLALÁS

Új tudományos eredmények

Tanulmány I.

1. Kimutattuk, hogy a rövid koszorúér okklúziók és reperfúziók sorozatával kiváltott prekondicionálás (PC) szignifikáns peroxinitrit (PN) képződést eredményez. Ugyanakkor eredményeink arra utalnak, hogy a PC általi PN képződés nem elengedhetetlen kiváltó tényezője a PC antiaritmiás hatásának, ugyanis a védőhatás akkor is fennállt, ha a PC inger alatt húgysavat adva a keletkezett PN-t „befogtuk”.
2. Ezzel ellentétben, az exogén módon alkalmazott PN aritmiákkal szembeni védőhatása húgysav jelenlétében teljes mértékben megszűnt.
3. Eredményeink rámutattak arra is, hogy a húgysav számottevő antiaritmiás hatással rendelkezik, amelynek hátterében az UA antioxidáns tulajdonságai állhatnak.

Tanulmány II.

Kísérletink igazolták, hogy hosszabb ideig (25 perc) fennálló iszkémiában, a NO biológiai hozzáférhetősége szorosan kapcsolódik a NOS enzim funkciójához. Ezt a megállapítást támasztják alá azok az eredményeink, melyek szerint

- (a) a hosszú iszkémia alatt csökken a NOS enzim aktivitása, ezáltal a NO mennyisége is, és ezzel párhuzamosan fokozódik a szuperoxid és NT képződés.
- (b) PC inger hatására a NOS gyorsan aktiválódik és ez az aktivitásfokozódás a rákövetkező hosszabb iszkémia alatt is fennmarad. Ennek következtében a NO termelése, ezáltal a biológiai hozzáférhetősége jelentős mértékben javul a hosszabb iszkémia alatt, és ez számottevően hozzájárul a ROS képződés csökkentéséhez .

Feltételezzük, hogy mind a NOS enzim aktiváció következtében javuló NO kínálat, mind az általa szabályozott ROS képződés csökkenés, fontos szerepet tölt be PC aritmiákkal szemben megnyilvánuló védőhatásában.

Az **I. Tanulmány** során levont következtetéseink azokra a megfigyelésekre alapozódnak, hogy bár mind a PC, mind az exogén módon alkalmazott PN kimutatható NT képződést eredményez, a PN „befogó” húgysav jelenlétében alkalmazott protektív hatású ingerek (PC és PN adás) csak a PN adás általi hatásokat (antiaritmiás, anti-iszkémiás, NO megőrző, szuperoxid képződést gátló) szüntetik meg, a PC kiváltotta védőhatások húgysav jelenlétében is kimutathatók.

Ebből kézenfekvőnek adódott a következtetés, hogy a PN alacsony koncentrációban hiába rendelkezik kardioprotektív hatással, az endogén úton (PC inger hatására) képződő PN nem szükséges a PC hatás kiváltásához.

A PC és PN közvetítette kardioprotektív hatások a hasonlóságok mellett, alapvető mechanizmusbeli különbségekkel is rendelkeznek. Például korábbi kísérleteink igazolták a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatornák szerepét a PC antiaritmiás hatásában, ugyanakkor ezek jelentőségét a PN védőhatásában nem sikerült igazolnunk, ugyanis ellentétben a PC-vel, a PN kardioprotektív hatását a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatorna-gátló 5-HD nem befolyásolta.

További magyarázatként szolgálhat a különbség a PC ingerek eltérő erőssége, *in vitro* és *in vivo* körülmények között; azaz bizonyos PC protokoll képes-e endogén PN képződést előidézni. Korábbi munkáink alapján ismert, hogy egyetlen, 5 perces okklúziós/reperfúziós inzultus hatására nem képződik kimutatható mennyiségű szuperoxid. Ahhoz, hogy altatott kutyában, a vérből a szuperoxid kimutatható legyen, legalább 2 x 5 perces tartó PC okklúziós/reperfúziós ciklus szükséges. Ennek az egyik oka feltehetően az, hogy *in vivo* körülmények között a PC a ROS generálással párhuzamosan aktiválja az antioxidáns enzim rendszereket (pl. Mn szuperoxid-dizmutáz) is, amelyek eliminálva a szuperoxidot, közvetve a PN csökkenését eredményezik.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy *in vivo* kísérletekben a PC kardioprotektív hatásának kialakításában a PN-n kívül más, a PC ingerek hatására keletkező egyéb endogén anyagok, köztük a NO, játszanak elsődleges szerepet.

Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a húgysav a plazma teljes antioxidáns kapacitásának mintegy 60%-ért felelős; számos oxigén eredetű szabadgyökkel (oxigén, hidroxil gyök, oxo-hem, peroxil gyök) is képes reakcióba lépni, de „befogja” a PN protonálódott formáját, a peroxinitrózus savat is. Miután az UA antiaritmiás hatásának pontos

mechanizmusa nem ismert, nem zárható ki, hogy az antiaritmiás hatásban a szer antioxidáns tulajdonságai jelentős szerepet játszanak.

Az értekezés második részét jelentő vizsgálatokban (**Tanulmány II**) kimutattuk, hogy a NOS gyorsan, már 5 perces koszorúelzárást követően aktiválódik (C1) és ez az NO termelődés emelkedésében is megnyilvánul. A gyors NOS aktivációban az iszkémia hatására bekövetkező citoszolikus kalcium koncentráció növekedését és az ezt követő NOS foszforilációt feltételezzük. Ugyanakkor, az iszkémia hosszabb fennállása esetén (25 perc) a NOS aktivitása csökken és az NO termelés gátlódik (C2). Bár az NO hozzáférhetőség hosszú iszkémia alatti csökkenése megfeleltethető a NOS aktivációban bekövetkező csökkenésnek, az sem zárható ki, hogy az NOx szint csökkenésének egyik oka az, hogy az NO egy része az iszkémia alatt is képződő (különösen annak későbbi fázisában, amikor a NOS enzim a limitált oxigén-szubsztrát-és kofaktor ellátás miatt szétkapcsolódik) szuperoxiddal PN-t képez.

Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a PC gyorsan aktiválja a NOS-t, azonban ez az aktiváció viszonylag gyorsan visszaáll a normál szintre. Ezt mutatják azok az eredmények, hogy 2 x 5 perces PC okklúzió (PC1) után az enzim aktivitás kisebb volt, mint az egyszeri 5 perces okklúziót (C1) követően. Feltételezzük, hogy ennek oka a két rövid okklúziós periódus közé beiktatott 5 perces reperfüzió, mely során az enzim gyorsan deaktiválódik. Mindennek ellenére a plazma NOx szintek emelkedettek maradtak, és ez feltehetően szerepet játszik abban, hogy a hosszú iszkémia bekövetkezése során az enzim gyorsan újra aktiválódik és az enzim aktivált állapota ekkor hosszabb ideig fennáll (PC3 és PC4). A PC inger követően ugyancsak emelkedett maradt a szuperoxid és NT szintje, felvetve ezen gyökök szerepét a PC hatás kiváltásában. Másrészt az sem zárható ki, hogy a PC inger alatt képződő ROS szabályozza a NOS-t, és ezáltal hozzájárul ahhoz, hogy az enzim aktivitása közvetlenül a második PC okklúziót követően csökkenjen. Szakirodalmi adatok utalnak arra, hogy a ROS túltermelése deaktiválja a NOS-t és ezáltal csökkenti a szabad NO-t és elősegíti a PN képződést. Az is ismert, hogy bizonyos körülmények között a NO túltermelés negatív visszacsatolással, ugyancsak képes a NO enzimatis úton történő szintézisét befolyásolni.

Mint utaltunk arra, amennyiben a PC kutyákat újabb okklúzióknak vetettük alá, a NOS aktivitása és az NOx mennyisége ismét gyorsan emelkedett (5 min; PC3), de ellentétben a kontroll csoporttal, ezekben a kutyákban, mindkét változó értéke a hosszú okklúzió végén is emelkedett maradt, míg a szuperoxid képződés mértéke jelentősen csökkent. Eredményeink a NOS aktivitásának és termékeinek egyidejű méréséből (amely a Tanulmány II egyik előnye)

azt mutatják, hogy a PC minden bizonnyal NOS funkcióját megőrizve növeli a NO hozzáférését és mérsékli a ROS túltermelését a hosszú I/R során.

In vitro tanulmányokból ismert, hogy a NOS aktivitás foszforilációs utakon keresztül szabályozódik, pl. az eNOS szerin 1176 oldalláncának foszforilációja az enzim aktivitását fokozza. Hasonlóképpen, poszt-transzlációs módosítások, mint pl. a fehérje-fehérje kölcsönhatások is alapvető szerepet tölthetnek be a NOS regulációjában. Mindennek ellenére, a NOS funkció PC általi megőrződésének mechanizmusa nem ismert, valójában ennek vizsgálata nem képezte kísérleteink tárgyát. Mindössze csak találgathatunk, hogy a PC a NOS iszkémia alatti szétkapcsolódásának megakadályozásával hatást gyakorolhat az enzim működésére. A NOS elegendő mennyiségű szubsztrát és kofaktor jelenlétében- mint pl. a tetrahydrobiopterin (BH₄), NADPH, FAD és FMN- elsődlegesen NO-t termel. Ezek közül a BH₄ tűnik kulcsfontosságú kofaktornak a NOS működéséhez azáltal, hogy stabilizálja a NOS doméneket, növeli a szubsztrát affinitását az enzimhez és gátolja a NOS eredetű szuperoxid termelést. Napjainkban vált ismertté, hogy iszkémiás körülmények között a BH₄ hozzáférhetősége csökken, és elsődlegesen ez, nem pedig az elégtelen szubsztrát mennyisége vezet ahhoz, hogy a NOS NO helyett szuperoxidot termel. Patkányban az iszkémiás prekondicionálás növelte a BH₄ koncentrációját, mely arra enged következtetni, hogy a PC a BH₄ szint emelése révén megakadályozza a NOS szétkapcsolódását és megőrzi a NOS elsődleges funkcióját (NO termelés) még a hosszú iszkémia ideje alatt is. Bár jelen kísérleteinkben a BH₄ koncentrációkat nem mértük, okkal feltételezhetünk hasonló mechanizmust az általunk használt *in vivo* aritmia modellben.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetemet témavezetőmnek, **Prof. Dr. Végh Ágnesnek**, aki folyamatos támogatásával, szakmai tapasztalatával és gyakorlati tudásával nyújtott segítséget számomra tanulmányaim során valamint a tézis megírásában.

Hálával és köszönettel tartozom **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, az SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, aki lehetőséget biztosított, hogy kutatómunkám az Intézetében elvégezhessem.

Köszönettel tartozom **Dr. Kiss Attilának**, akivel az *in vivo* kísérleteket elkezdtük.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Kisvári Gábornak** és **Dr. Kovács Máriának**, akik segítséget nyújtottak az *in vitro* kísérletek befejezésében (NOS aktivitás mérés, nitrotirozin meghatározás Western blottal).

Köszönetet szeretnék mondani **Bakó Erikának** és **Biczókné Irénnek** az *in vivo* kísérletek során nyújtott rendkívüli precíz munkáért.

Külön köszönetet mondok kooperációs partnereinknek, **Dr. Seprényi Györgynek** (SZTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet) a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokban nyújtott folyamatos segítségért, **Dr. Gardi Jánosnak** (I. számú Belgyógyászati Klinika) a NOS aktivitás meghatározásáért, és **Dr. Kaszaki Józsefnek** (SZTE ÁOK Sebészeti és Műtéttani Intézet) az NOx mérésekért.

Végül köszönet illeti **Prof. Dr. Ferdinándy Pétert** és az SZTE ÁOK Biokémiai Intézet munkatársait a PN szintéziséért.