

**A rés kapcsolatok szerepének a vizsgálata korai és késői
antiaritmiás hatás kialakításában**

PhD Tézis

Miskolczi Gottfried



Témavezető: Prof. Dr. Végh Ágnes

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
2018**

Bevezetés

Az szívizom akut iszkémiás károsodásának egyik legsúlyosabb következménye azoknak a ritmuszavaroknak a megjelenése, amelyek az estek döntő többségében hirtelen szívhalállal végződnek. Miután az ilyen módon kialakuló aritmiák többsége a betegek kórházba vagy klinikára kerülés előtt lép föl, kezelésük a mai napig jelentős kihívást jelent a kardiológusok számára. Az utóbbi évtizedek klinikai és kísérletes kutatásainak egyik legfőbb célja ezen súlyos kamrai aritmiák patomechanizmusának felderítése, új antiaritmiás gyógyszerek és kezelési stratégiák kifejlesztése.

A koszorúér elzáródást követően az akut kamrai aritmiák két fázisban jelentkeznek; az 1a fázis az okklúziót követő 2-8 percben észlelhető, míg az 1b fázisú aritmiák az okklúzió 15-25 perce körül a legkifejezettebbek. Az 1a fázisú aritmiák kialakulásáért a vér és oxigénhiány következtében fellépő biokémiai változások felelősek, amelyek a celluláris ionegyensúly felborulásához, az akciós potenciál alakjának és az ingerület vezetésének megváltozásához vezetnek. Az 1b fázis során kialakuló kamrai aritmiák kialakulásának hátterében az előbb említettek mellett, a katekolaminok felhalmozódása, a tovább csökkenő pH és ATP áll, amelyeknek jelentős szerepük van a réskapcsolatok záródásában és a súlyos kamrai aritmiák képződésében.

A réskapcsolatok olyan sejtkapcsoló struktúrák, amelyek metabolikus 1kDa-nál kisebb molekulák (például; cAMP, Ca^{2+}) transzportját és elektromos kapcsolatot biztosítanak a szomszédos sejtek között. Ezen túlmenően fontos szerepet töltenek be a sejtek differenciálódásában, az ingerület vezetésében. A réskapcsolatok a sejtmembránban plakkokba tömörülve alakítják ki az ún. „interkaláris lemezt”. A réskapcsolatokat a connexin (Cx) fehérjék alkotják, hat Cx fehérje alkot 1 connexont vagy fél-csatornát, és két félcsatorna alkot egy réskapcsolatot. A pitvari és a kamrai munkaizomsejtekben elsődlegesen a connexin 43 izoformja található, amely egyben a legjobban tanulmányozott connexin izoforma. A réskapcsolatok sejten belüli elrendeződése egyedi mintázatot mutat. A sejtvégeken az interkaláris lemezbe rendeződve nagyobb mennyiségben található, mint a laterális sejtmembránban. Ezen elrendeződési mintázat a hosszirányú ingerületvezetésnek kedvez szemben a keresztirányúval, így biztosítva a homogén ingerületvezetési anizotrópiát. Bizonyos patológias állapotokban, mint például szívelégtelenségben vagy iszkémiás szívbetegségben csökken a Cx43 expressziója, a réskapcsolatok az interkaláris lemezből a

laterális sejtmembránra helyeződnek át. Mindezen folyamatok hozzájárulnak a fokozott aritmia tevékenység kialakulásához.

Kimutattuk, hogy a réskapcsolatok fontos szerepet játszanak a gyors szívingerléssel kiváltott késői antiaritmias hatás kialakításában. A kutya szívének magas frekvenciával történő hajtása 24 órával a 25 perces I/R inzultus előtt, jelentősen csökkentette az iszkémia által kiváltott kamrai aritmiák számát és gyakoriságát, és ezzel párhuzamosan mérséklődtek a réskapcsolatok záródására utaló szöveti impedancia változások. Feltehetőleg a Cx43 foszforillát formájának (nyitott állapot) a megőrzése hozzájárul ahhoz, hogy iszkémia alatt is a sejtek közötti kommunikáció megmaradjon. Továbbá, a gyors szívingerléssel kiváltott prekondicionálás nemcsak a Cx43 foszforilációs szint megváltozását eredményezte, hanem a Cx43 mRNS és fehérje expressziójában is változást idézett elő, ami szintén hozzájárulhat a védőhatás kialakításához.

A réskapcsolatoknak a gyors szívingerléssel kiváltott késői antiaritmias hatásban betöltött szerepére egy további, az eddigieknél közvetlenebb bizonyíték lehet a réskapcsolatok farmakológiai gátlásának az aritmia képződésre gyakorolt hatásának a vizsgálata. Jelen munkánkban célja volt annak a megállapítása, hogy a réskapcsolatok farmakológiai gátlása az iszkémiát megelőzően, milyen módon befolyásolja a gyors szívingerléssel késői antiaritmias hatását. Ennek a vizsgálatához a réskapcsolatok szelektív gátlószerét a carbenoxolont (CBX) alkalmaztuk.

Kutatócsoportunk úttörő munkát végzett a prekondicionálás kardioprotektív hatásának vizsgálatában. Az elmúlt három évtizedben, számos kísérletben is kimutatták, hogy a nitrogén monoxid (NO) kulcsfontosságú trigger és mediátor szerepet játszik a különböző ingerekkel (rövid koszorúér okklúziók, szívingerlés, fizikális terhelés) kiváltott prekondicionálás korai és késői antiaritmias hatásában. Hasonlóképpen a NO leadására képes molekulák (NO donorok) a prekondicionáláshoz hasonló védőhatást hoznak létre, amelyben a réskapcsolatok számottevő szerepet játszanak.

Számos kísérlet igazolta, hogy a NO, számos egyéb hatása mellett, szabályozza a réskapcsolatok működését, amely mechanizmus hozzájárulhat a prekondicionálás aritmiákkal szembeni védőhatásához. Kísérletes bizonyítékkal rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy a szerves nátrium nitrit számottevő antiaritmias hatással rendelkezik, azonban a mechanizmus még nem teljesen ismert. Jelen kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a nátrium nitrit réskapcsolatokra gyakorolt hatása szerepet játszik-e a prekondicionálás által kiváltott antiaritmias hatás kialakításában.

Célkitűzések

A tézisben ismertetett munkáinkban két kérdésre kerestük a választ:

I. Vajon a réskapcsolatok szerepet játszanak-e a gyors szívingerléssel kiváltott késői antiaritmiás hatás kialakításában?

Ennek a megválaszolására olyan kísérleteket terveztünk, amelyekben gyors szívingerléssel prekondicionált kutyákban az iszkémiát megelőzően a réskapcsolatokat, azok viszonylag szelektív gátlószerével a carbenoxolonnal (CBX) zártuk, és vizsgáltuk, hogy ez miképpen módosítja a szívingerlés késői antiaritmiás hatását.

II. A nátrium nitrit antiaritmiás hatásában a réskapcsolatok szerepet játszanak-e?

Az értekezés ezen részében ismertetett munkában azt vizsgáltuk, hogy nátrium nitrit immáron ismert antiaritmiás hatásában a réskapcsolatoknak milyen szerepük van.

Anyagok és módszerek

- Kloralóz és uretán keverékével altatott nyitott mellkasú kutyákon, bal elülső leszálló artéria (LAD) preparálása és lefogása 25 perces iszkémia előidézése céljából
- Jobb karma szívingerlése 4x5 percen keresztül 240 ütés/perc frekvenciával
- Carbenoxolon infúzió 50 és 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dózisban
- NaNO_2 infúzió 0.2 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ dózisban
- Hemodinamikai paraméterek mérése
- Iszkémia súlyosságát jelző paraméterek mérése: epikardiális ST-szakasz változása, teljes aktivációs idő (TAT) mérése térképező elektróddal
- Kamrai aritmiák meghatározása: extraszisztolék száma, tachikardiás epizódok száma és gyakorisága, valamint a kamrafibrilláció gyakorisága
- Szöveti ellenállás meghatározása szöveti impedancia méréssel
- Metabolikus kapcsolat vizsgálata kettős fluoreszcens festék permeabilitás vizsgálattal
- Cx43 fehérje foszforilációs mintázat vizsgálata Western- blot technikával
- Cx43 celluláris eloszlásának vizsgálata immunofluoreszcens festéssel

Eredmények

I. A réskapcsolatok szerepe a gyors szívingerléssel kiváltott késői antiaritmiás hatásban **A carbenoxolon és a 25 perces koszorúér okklúzió hemodinamikai hatása**

A carbenoxolon intrakoronáriás infúziója az okklúziót megelőzően nem befolyásolta a főbb hemodinamikai paramétereket. A koszorúér okklúzió hatására az artériás vérnyomás, a

balkamrai szisztolés nyomás (LVSP), valamint a pozitív és negatív dp/dt értékek, minden csoportban közel azonos mértékben csökkentek. Ugyanakkor a balkamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) mind a négy csoportban szignifikánsan emelkedett. A szívfrekvencia az okklúzió alatt számottevően nem változott.

A kamrai aritmiák száma és gyakorisága 25 perces koszorúér okklúzió alatt

A kontroll csoportban nagy számban keletkeztek extraszisztolék, tachikardiás epizódok és mind az okklúzió, mind a reperfúzió során számos állatban kamrafibrilláció lépett fel. A 24 órával korábban végzett szívingerlés szignifikánsan csökkentette ezen aritmiák számát és gyakoriságát. A carbenoxolon mindkét koncentrációja számottevően gyengítette a szívingerlés antiaritmiás hatását; a szer jelenlétében emelkedett az extraszisztolék és tachikardiás száma, a tachikardia és a kamrafibrilláció gyakorisága.

Az extraszisztolés aktivitás és a szöveti ellenállás alakulása a 25 perces koszorúér okklúzió alatt

Altatott kutyában a 25 perces koszorúér elzárást követően az akut aritmiák, jelen esetben az extraszisztolék, két fázisban (1a, 1b), mindkét fázis alatt meglehetősen nagy számban jelentkeznek. Ezzel párhuzamosan a szöveti ellenállás meredeken emelkedik, amely emelkedés az 1b fázisú aritmiák megjelenése előtt a legkifejezettebb, jelezve a réskapcsolatok záródását. Szívingerelt állatokban az extraszisztolék száma mind az 1a mind az 1b fázisban jelentősen csökkent és a szöveti ellenállás emelkedésének meredeksége és abszolút értéke is szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll állatokban. Carbenoxolon jelenlétében a szívingerelt állatokban a szöveti ellenállás emelkedése ismét fokozódott és az extraszisztolék száma emelkedett. Az $50\mu\text{M}$ -os koncentrációjú CBX hatására csak az 1b fázisú aritmiák száma emelkedett, míg a $100\mu\text{M}$ koncentráció adását követően mind az 1a, mind az 1b fázisban szignifikánsan fokozódott az ektópiás aktivitás.

Az iszkémia súlyosságának alakulása a 25 perces koszorúér okklúzió alatt

Az iszkémia súlyosságát a totál aktivációs idő (TAT) és az epikardiális ST-szakasz változásaival jellemeztük. Kontroll állatokban a koszorúér okklúziót követően mindkét paraméter gyorsan és meredeken emelkedett. Ez az iszkémiás változás szignifikánsan kisebb volt a 24 órával korábban szívingerelt állatokban. Carbenoxolon kezelés hatására mind a TAT, mind az epikardiális ST-szakasz változása kifejezettebb volt, mint a kezeletlen szívingerelt kutyákban és hasonlóan alakult, mint a kontroll állatokban.

Connexin 43 foszforilációjának változása a szívingerlését és a CBX beadását követően

Az álműtött kontroll állatokban a Cx43 foszforilált és defoszforilált formája közel azonos mértékben oszlik meg, általában a foszforilált kissé magasabb, mint a defoszforilált forma. A LAD 25 perces elzárását követően az arány a defoszforiláció irányába tolódik el, azaz a defoszforilált forma emelkedik a foszforilált forma pedig csökken. Szívingerlés hatására a foszfo/defoszfo arány helyreáll és hasonló mintázatot mutat, mint a nem iszkémiás kontroll állatokban. Carbenoxolon jelenlétében a szívingerelt állatokban, hasonlóan az iszkémiás kontrollhoz, a Cx43 defoszforiláció fokozódik.

A réskapcsolatok permeabilitásának alakulása szívingerlés és CBX adást követően

A réskapcsolatok permeabilitásának iszkémia okozta változásait ún. „kettős festési” módszerrel vizsgáltuk. A nem iszkémiás kontrollhoz képest, az iszkémiás csoportban a sejtek közötti metabolikus kommunikáció jelentősen csökkent. Szívingerelt állatokban a GJ permeabilitás nagymértékben megőrződött és hasonló volt, mint a normoxiás kontroll csoportban. Carbenoxolon kezelést követően, a szívingerelt állatokban a permeabilitás, az iszkémiás kontrollhoz hasonlóan, csökkent.

Az interkaláris lemez szerkezeti változásai gyors szívingerlést és a CBX adását követően

Iszkémia hatására, a LAD területről vett mintákban, összehasonlítva a normál vérellátású LCX területből vett mintákkal, az interkaláris lemez kontúrjai elhalványodtak és elmosódottá váltak. Ezek az iszkémiás területen belüli szerkezeti elváltozások a szívingerlés hatására nem voltak észlelhetők. A carbenoxolon mindkét koncentrációban hasonló szerkezeti eltéréseket idézett elő az interkaláris lemezben, mint az iszkémia, ráadásul mind az iszkémiás LAD, mind a nem iszkémiás LCX területeken, jelezve, hogy a CBX önmagában is átrendeződést okozhat a réskapcsolatok szerkezetében.

II. A réskapcsolatok szerepe az nátrium nitrit antiaritmiás hatásában

A nátrium nitrit és a 25 perces koszorúér okklúzió hemodinamikai hatása

A nátrium nitrit infúziója, az LVEDP kivételével, egyik csoportban sem befolyásolta a főbb hemodinamikai paramétereket. Koszorúér okklúzió hatására az artériás vérnyomás, a balkamrai szisztolés nyomás (LVSP), valamint a pozitív és negatív dp/dt értékek, minden csoportban közel azonos mértékben csökkentek, míg a balkamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) emelkedése a nitrit kezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban. A szívfrekvencia az okklúzió alatt számottevően nem változott.

A kamrai aritmiák száma és gyakorisága koszorúér okklúzió és reperfúzió alatt

A kontroll csoportban a LAD lefogását követően nagy számban fordultak elő kamrai aritmiák. A NaNO₂ infúzió mindkét csoportban szignifikánsan csökkentette az extraszisztolék és a VT epizódok számát, valamint a VT és a kamrafibrilláció (VF) gyakoriságát.

Extraszisztolék eloszlása és a szöveti ellenállás alakulása a 25 perces koszorúér okklúzió alatt

Kontroll kutyákban a LAD elzárását követően a szöveti ellenállás gyorsan emelkedett és a fázisszög meredeken csökkent, amelyet különösen az 1b fázisban fokozott ektópiás aktivitás követett. Ezzel szemben azokban a kutyákban, amelyek nátrium nitrit infúziót kaptak az okklúzió előtt és alatt, az iszkémia kiváltotta meredek impedancia változások jelentős mértékben csökkentek, és ezzel párhuzamosan az extraszisztolék száma is szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll állatokban. Amennyiben a nátrium nitritet 10 perccel a reperfúzió előtt adtuk, az elektromos impedancia emelkedés mértéke, és ezzel együtt az 1b fázisú aritmiák megjelenése, szignifikánsan csökkent. Ezen utóbbi eredmények arra engednek következtetni, hogy az infúzió megkezdése után szinte azonnal észlelhetők a nitrit réskapcsolatokra gyakorolt hatásai.

Az epikardiális ST-szakasz és a totál aktivációs idő (TAT) változása a LAD 25 perces okklúziója során

Kontroll kutyákban a LAD elzárását követően mindkét iszkémiát jellemző paraméterben gyors és meredek emelkedés következett be, amely a maximumát az okklúzió 5. percében érte el. Nátrium nitrit mindkét beadást követően az ST-szakasz és a TAT emelkedése szignifikánsan kisebb volt, mint az iszkémiás kontroll csoport állataiban.

Összefoglalás

1. Kimutattuk, hogy a réskapcsolatok szerepet játszanak a gyors szívingerlés késői antiaritmiás hatásában, ugyanis a réskapcsolatok iszkémiát megelőző zárása carbenoxolonnal, csökkentette a szívingerlés aritmiákkal szembeni késői védőhatását.

2. Elsőként igazoltuk altatott kutyamodellben, hogy a nátrium-nitrit 0,2 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ koncentrációban számottevő antiaritmiás hatással rendelkezik. Feltételezzük, hogy a védőhatás kialakulása a nitritből felszabaduló nitrogén monoxidnak tulajdonítható, amely számos mechanizmuson keresztül befolyásolhatja az iszkémia és reperfúzió okozta aritmiákat. Jelen vizsgálataink rámutattak arra, hogy az egyik ilyen mechanizmus a réskapcsolatok működésének nitrit (NO) általi szabályozása.

A disszertáció alapját képező irodalmak:

1. Végh Á, Gönczi M, Miskolczi G, Kovács M. Regulation of gap junction by nitric oxide influence the generation of arrhythmias resulting from acute ischemia and reperfusion in vivo, *Frontiers in PHARMACOLOGY*, 4, **2013**.06. 4:76, eCollection.
2. Kovács M, Kiss A, Gönczi M, Miskolczi G, Seprényi Gy, Kaszaki J, J. Khor M, Murphy E, Végh Á. Effect of sodium nitrite on ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized: Is protein S-nitrosylation involved?, *PLOS One*, **2015**. 24: 10:0122243
3. Miskolczi G, Gönczi M, Kovács M, Seprényi Gy, Végh Á. Further evidence for the role of gap junctions in the delayed antiarrhythmic effect of cardiac pacing, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2015**. 93: 545-553
4. Miskolczi G, Gönczi M, Kovács M, Végh Á. Examination of the effect of sodium nitrite on gap junction function during ischaemia and reperfusion in anaesthetized dogs, *Acta Biologica Hungarica*, **2017** 68: 34-49

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Végh Ágnes kijelentem, hogy a Miskolczi Gottfried PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - „Regulation of gap junctions by nitric oxide influences the generation of arrhythmias resulting from acute ischaemia and reperfusion in vivo (2013)” - című publikációban a pályázónak a tudományos eredmények elérésében meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más PhD fokozatmegszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

.....
Prof. Dr. Végh Ágnes
Egyetemi tanár

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Kovács Mária kijelentem, hogy a Miskolczi Gottfried PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - „Effect of Sodium Nitrite on Ischemic and Reperfusion-Induced Arrhythmias in Anaesthetized Dogs: Is Protein S-Nitrosylation Involved? (2016)” - című publikációban a pályázónak a tudományos eredmények elérésében meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más PhD fokozatmegszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

.....
Dr. Kovács Mária