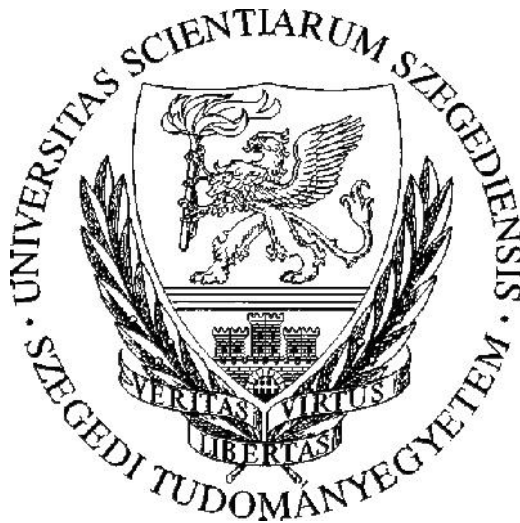


**A PREKONDITIONÁLÁS ÉS A PEROXINITRIT ANTIARITMIÁS HATÁSA:  
A NITROGÉN-MONOXID, A SZUPEROXID ÉS A PEROXINITRIT SZEREPE**

Doktori értekezés tézisei

**Kiss Attila**

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

2010

**KÖZLEMÉNYEK**

1. **Kiss A**, Juhász L, Huliák I, Végh Á. Peroxynitrite reduces ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized dogs without involving mitoK<sub>ATP</sub> channels. *British Journal of Pharmacology* 2008; 155: 1015-1024, Impakt faktor: 4,902.
2. **Kiss A**, Juhász L, Kupai K, Seprényi Gy, Kaszaki J, Végh Á. The role of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in the antiarrhythmic effects of preconditioning and exogenous peroxynitrite. *British Journal of Pharmacology* 2010; 160: 1263-1272, Impakt faktor: 5,204.

## BEVEZETÉS

A szívizomzat iszkémiás károsodása gyakran vezet olyan súlyos kamrai aritmiák megjelenéséhez, amelyek hirtelen szívhalállal végződhetnek. Ez indokolja, hogy az elmúlt évek során a klinikai és a kísérletes kutatások egyik központi kérdése volt olyan új gyógyszeres és nem gyógyszeres stratégiák kidolgozása, amelyek lehetőséget nyújtanak ezen súlyos kamrai aritmiák gyakoriságának csökkentésére, valamint a hirtelen szívhalál megelőzésére.

Az elmúlt huszonöt év igazolta, hogy az akut iszkémia során kialakuló kamrai aritmiák csökkentésének egyik lehetséges és mindmáig talán legeredményesebb módja a szívizomzat endogén protektív mechanizmusán alapuló iszkémiás prekondicionálás (PC), amely során a rövid koszorúér okklúziók/reperfúziók sorozata fokozza a szív toleranciáját az ismételt fellépő, de hosszabb ideig tartó iszkémia, majd az azt követő reperfúzió súlyos következményeivel szemben. A PC markáns antiaritmiás hatásának kialakításában feltehetőleg, a PC okklúziók/reperfúziók alatt felszabaduló endogén protektív anyagok (bradikinin, adenozin, prosztaglandinok, nitrogén-monoxid, reaktív oxigén gyökök) közvetítette mechanizmusok fontos szerepet játszanak.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a PC inger hatására a koszorúerekben képződő bradikinin az ér endothelsejteken lévő bradikinin B2 receptorokat aktiválva, nitrogén-monoxid (NO) képződését váltja ki, amely kitüntetett szerepet játszik a PC korai és késői kardioprotektív hatásnak kialakításában. Ennek az egyik lehetséges mechanizmusa lehet, hogy a NO a szolubilis guanilát cikláz (sGC) enzim aktiválásával emeli a sejtek cGMP szintjét, amelynek következményeképpen az erekben vazodilatáció jön létre, míg a szívizomsejtekben csökken az intracelluláris  $Ca^{2+}$  - amelynek jelentős emelkedése az iszkémia során fokozza az aritmiák megjelenését - egyrészt azért, hogy közvetlenül az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákra hatva, másrészt cAMP lebontását végző cGMP-függő foszfodiészteráz enzim aktivását fokozva gátolja a  $Ca^{2+}$  beáramlást. Mindezek mellett a NO feltételezhetően a protein kináz G (PKG) enzim közvetítésével a mitokondrium belső membránján elhelyezkedő ATP-függő kálium csatornákat (mitoK<sub>ATP</sub>) nyitását eredményezi. Ennek egyik következménye, hogy reaktív oxigén eredetű szabadgyökök (ROS), mint például szuperoxid ( $O_2^-$ ) szabadul föl és részben a protein kináz C (PKC) enzim aktivitásának fokozásával, részben egyéb szignalizációs utakon keresztül hozzájárul a PC kardioprotektív hatásának kialakításához. Továbbá, a NO közvetve ill. közvetlenül is képes befolyásolni a mitokondriális légzési lánc bizonyos fehérjéit, ezáltal csökkenve az iszkémia/reperfúzió (I/R)

hatására nagy mennyiségben felszabaduló kardiotoxikus és aritmogén hatással rendelkező szabadgyökök keletkezését.

Ugyanakkor, számos tanulmány igazolja, hogy az iszkémia és legfőképpen a reperfúzió kezdetén a nitrogén-monoxidból és szuperoxidból peroxinitrit (PN) keletkezik, amely koncentráció függően akár citotoxikus, akár citoprotektív hatással is rendelkezhet. Az I/R hatására nagy mennyiségben keletkező PN reakcióba lép tiolokkal, a lipideket oxidálja és fokozza a szabad zsírsavak szintjét, a fehérjéket oxidálja vagy tirozin/triptofán nitrálás révén inaktíválja, valamint DNS törést okoz. Mindezek a hatások együttesen hozzájárulhatnak az I/R károsodáshoz.

Ezzel szemben, mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben kimutatták, hogy az alacsony koncentráció tartományban alkalmazott PN protektív hatással rendelkezik. Például, kimutatták, hogy a PN csökkenti az infarktusz terület nagyságát, gátolja a trombocita aggregációt, tágítja a koszorúereket, csökkenti a P-szelektin expressziót, elősegíti a koszorúérendothél funkciójának megőrzését, valamint szerepe van a leukocita-endothél és a vérlemezke-leukocita interakció gátlásában. A peroxinitrit hatását az akut iszkémia és reperfúzió során fellépő kamrai aritmiákra, valamint a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák feltételezett szerepét a PN általi védőhatás kialakításban, *in vivo* még nem vizsgálták.

A szakirodalomból ismert, hogy a PC csökkentheti az endogén PN képződést, ennek mechanizmusa és lehetséges kapcsolata és PC antiaritmiás hatásával nem tisztázott. Mivel a peroxinitrit képződés, a NO és a  $\text{O}_2^-$  ekvivalens reakciójának eredménye, a PN keletkezés mérséklődését ezen reaktív molekulák külön-külön vagy együttes csökkenése magyarázhatja. A szuperoxid anion iszkémia és reperfúzió alatti megnövekedett mennyisége összefüggésbe hozható az akut kamrai ritmuszavarok megjelenésével és a miocardium I/R károsodásával. A NO megítélése, mennyiségi változása és szerepe a PC és I/R során korántsem ilyen egyértelmű, amelyet feltehetőleg mérés technikai, species és kísérletes körülmények közötti (*in vivo* vs. *in vitro*) különbségek magyarázhatják. Míg izolált szíven végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy iszkémia hatására jelentősen fokozódik a NO szint, amely az iszkémia súlyosbodását, valamint a PC hatékonyságának csökkenését eredményezheti. Ugyanakkor az *in vivo* kísérletek eredményei, azt igazolják, hogy iszkémia során szignifikánsan csökken a NO szintje és biológia hozzáférhetősége. Továbbá a NO pótlása az I/R során (NO donor, prekondicionálás) antiaritmiás hatást eredményez. Azt azonban, hogy a PC és a PN antiaritmiás, valamint az endogén PN szintet csökkentő hatása, a NO és/vagy  $\text{O}_2^-$  képződés mérséklődés eredménye, még nem vizsgálták.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

**I.** A peroxinitrit 100 nM intracoronáriás infúziója, miképpen befolyásolja az iszkémia/reperfúzió során megjelenő kamrai aritmiákat altatott kutyában?

**II.** Vajon a PN aritmiákra gyakorolt hatásában szerepet játszanak-e a mitokondriális ATP-függő kálium ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) csatornák? Ennek eldöntésére a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák szelektív gátlószert, az 5-hydroxydecanoate-ot (5-HD) alkalmaztuk.

Kimutattuk, hogy a peroxinitrit intracoronáriás adása, a prekondicionáláshoz hasonlóan, mérsékelte az akut I/R okozta kamrai aritmiákat, valamint a hosszú okklúzió/reperfúzió során keletkező endogén peroxinitrit mennyiségét. Annak eldöntésére, hogy ennek hátterében milyen mechanizmus állhat további kísérleteket terveztünk. Ezek során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy

**III.** Vajon a prekondicionálás és a peroxinitrit endogén peroxinitrit képződést csökkentő hatása a szuperoxid és/vagy a nitrogén-monoxid képződés mérséklődésének az eredménye?

## MÓDSZEREK

### 1. Kísérleti állatok és műtéti beavatkozás

Kísérleteinket mindkét nemhez tartozó, átlagosan  $20,5 \pm 3,3$  kg súlyú, keverék kutyákon végeztük. A bevezető altatást pentobarbitallal (30 mg/kg i.v) végeztük, majd a további narkózist kloralóz-uretán keverékével (60 ill. 200 mg/kg) tartottuk fenn. A jobb femoralis artériába vezetett polietilén katéteren keresztül mértük az artériás vérnyomás (szisztolés és diasztolés) változásait, míg a jobb vena femoralisba helyezett kanül a további altatószer adására szolgált. A bal arteria carotison keresztül katétert vezetünk a bal kamra üregébe, amelynek segítségével a balkamrai szisztolés (LVSP) és végdiasztolés (LVEDP) nyomásváltozásokat, valamint a balkamrai kontraktilitás és relaxáció sebességét jellemző pozitív és negatív  $dP/dt_{\max}$  értékeket határoztuk meg. A bal vena jugularison keresztül polietilén katétert vezetünk a sinus coronariusba, amelynek segítségével közvetlenül a szívből vénás vért gyűjtöttünk és mértük a plazma nitrát/nitrit (NOx) szintjét. A mellkas és a pericardium megnyitását követően, a bal coronária artéria elülső leszálló ágát (LAD), az első marginális ágtól proximálisan kiproparáltuk, az ér alá lazán fonalat vezetünk, amelynek a leszorításával miocardiális iszkémiát idéztünk elő. Az okklúzió helyétől disztálisan a LAD egyik kisebb oldalágába kanült vezetünk, ezen keresztül történt a PN, az 5-hydroxydecanoate (5-HD) és a sóoldatok intracoronáriás infúziója.

### 2. Kamrai aritmiák és az iszkémia súlyosságának meghatározása

Az okklúzió és reperfúzió során fellépő kamrai aritmiákat II-es elvezetésű EKG-ről, a Lambeth konvenció alapján értékeltük. Ennek megfelelően a kamrai extraszisztolék (ES) és kamrai tachicardiás (VT) epizódok számát, a VT és a kamrafibrilláció (VF) gyakoriságát. A kamrai tachicardiát négy vagy annál több egymást követő ES-ként definiáltuk. Az okklúziót követő reperfúzió során csak a VF és a túlélés gyakoriságát vizsgáltuk.

A szív elektromos folyamatainak vizsgálatához a bal kamra felszínére, az iszkémiás terület feltételezett középpontjába úgynevezett kompozit elektródot varrtunk. Az elektród a szív epikardiális felszínének 24 pontjáról gyűjti és összegzi az R hullámokat. Megfelelően perfundált és oxigenizált szívizomban minden pont egyszerre aktiválódik, amely egyetlen R hullámot eredményez. Iszkémiában, a szívizom csökkent vérellátása következtében a rostok aktivációja inhomogénné válik, amely az összegzett R hullám kiszélesedésében és felrostdozódásában nyilvánul meg. Az elektromos inhomogenitás mértékét az első és utolsó R hullám közötti idő elteltével jellemeztük, és ms-ban fejeztük ki. Ugyanezen a kompozit

elektródon elhelyezett két unipoláris elvezetés segítségével az epikardiális felszínről elektrogrammot regisztráltunk és az ST-szakasz változását mV-ban fejeztük ki.

### **3. Szöveti nitrotirozin meghatározás Western-blot és ELISA módszerekkel**

A reperfüzió 1-2. percében szívsvöveti mintát vettünk és a mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$  tároltuk. A peroxinitrit képződésére utaló nitrotirozin (NT) mennyiségét Western-blot analízissel és ELISA módszerrel határoztuk meg. A fagyasztott homogenizáló puffer, valamint proteáz gátló jelenlétében homogenizáltuk, majd centrifugáltuk ( $10000\text{g}$ ). A mintákhoz  $\text{CuSO}_4$ -et adtunk és  $37^{\circ}\text{C}$ -on 30 percen keresztül inkubáltuk. A standard Bovine Serum Albumin (BSA) kalibráció alapján a 30 perc inkubációt követően a fehérje koncentrációt WINREAD program segítségével határoztuk meg, majd  $20\ \mu\text{g}$  fehérjét futtatunk 8%-os poliakrilamid gélen és blottoltuk PVDF membránra. A membrán 5%-os milk TBS-TWEEN-vel történő blokkolása után az elsődleges antitesttel (anti-nitrotirozin monoklonáris egér antitest) egy éjszakán át, majd azt követően másodlagos antitesttel 45 percen keresztül inkubáltuk. A membránra ECL Plus reagens elegyet pipettáztunk, majd a membránokat előhívó tálcára helyeztük és sötét szobában Röntgen-filmre hívtuk elő. A kapott fehérje sávok intenzitását Quantity One programmal értékeltük és önkényes skálán fejeztük ki.

Az ELISA módszer során az elsődleges antitesthez (anti-nyúl IgG) kapcsolódó másodlagos antitestet (acetilkolin észteráz precoated; egér anti-nyúl IgG) Ellman's-reagens segítségével mutattuk ki. A nitrotirozin mennyiségét ng mg/protein értékben fejeztük ki.

### **4. Plazma és szöveti nitrát/nitrit meghatározás**

A nitrogén-monoxid kimutatására, a nitrogén-monoxidnak a vérben oxigénnel keletkezett stabilis termékét a nitrát/nitrit ( $\text{NO}_x$ ) szintet Griess-reakcióval határoztuk meg. A kísérletek különböző időszakában vett vérmintákat centrifugáltuk ( $10000\text{g}$ ). A minták nitrát-nitrit enzimatis konverziója során a plazma mintához pH 7,5 puffert, NADPH-t, FAD-ot és nitrát reduktazt adtunk. A reakcióelegyet 30 percig  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, majd az enzim indukálta nitritképződés kimutatására a mintákhoz Griess-reagenst adtunk, 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, spektrofotométeren ( $546\ \text{nm}$ ) mértük. A nitrit kimutatása a mintákhoz Griess-reagenst adtunk. A kapott eredményeket  $\mu\text{mol/L}$  fejeztük ki.

A szívsvöveti mintákat a reperfüziót követően azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük. A fagyasztott homogenizáló puffer, valamint proteáz gátló jelenlétében homogenizáltuk. Az ultrahangos feltárást követően a homogenizátumot 30 percen keresztül centrifugáltuk ( $20000\text{g}$ ). A kiindulási fehérje koncentrációt a centrifugálás során kapott felülúszóból

határoztuk meg a Lowry-módszer alapján. A szívsvöveti minták nitrát/nitrit tartalmát a plazma NO<sub>x</sub>-hoz hasonlóan határoztuk meg és a kapott eredményeket nmol/mg proteinben fejeztük ki.

## 5. Szöveti szuperoxid meghatározás

A szuperoxid anion meghatározását dihydroethidiummal történő (DHE) festéssel határoztuk meg. A DHE a O<sub>2</sub><sup>-</sup> jelenlétében ethidium-bromiddá oxidálódik és fluoreszcens jelként detektálható. A kísérletek végén vett szívsvöveti mintákat Tissue-tek-be ágyazva folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, ezt követően -80°C-on tároltuk és a fagyasztva metszés előtt 24 órával helyeztük át -20°C-ra. Kriosztáttal 20 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk és 10<sup>-6</sup> mol/L DHE-vel inkubáltunk 37°C-on 30 percen keresztül. Negatív kontrollként a DHE festést megelőzően a mintákat N-acetil ciszteinnel szobahőmérsékleten inkubáltuk. Konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Olympus FV1000) egy mintáról 10-15 felvételt készítettünk szemikvantitatív analízis céljából, melyeket ImageQuant<sup>TM</sup> program (Molecular Dynamics) segítségével értékeltük és a kapott intenzitást önkényes skálán ábráztuk.

## 6. Kísérleti protokoll

Kísérleteinket altatott kutyák kilenc csoportjában végeztük. A műtéti beavatkozást minden csoportban 30 perces stabilizációs periódus követte. Néhány csoportban az állatok pH 8,4-es sóoldatot kaptak (peroxinitrit oldószere) intracoronáriás infúzióban (0,5 ml/min) 10 percig a LAD okklúziót megelőzően. Hét állat álműtött kontrollként szolgált, amelyben nem történt koszorúér lefogás, ezen csoportban szívsvöveti mintát vettünk a plazma és szöveti NO<sub>x</sub>, valamint a szöveti NT és O<sub>2</sub><sup>-</sup> meghatározás céljából.

Az állatok további csoportjában miocardiális iszkémiát a LAD 25 perces lefogásával idéztünk elő, amelyet gyors és hirtelen reperfúzió követett. Két csoport szolgált kontrollként, az első csoportban (n = 12) az állatok 30 percen keresztül pH 7,4 sóoldatot kaptak (5-HD oldószere), amelyet a LAD 25 perces okklúziója és reperfúziója követett. A kontroll állatok másik csoportja (n = 14), 2 x 5 percen keresztül a peroxinitrit oldószert (pH 8,4 sóoldatot) kapta intracoronáriás infúzióban (0,5 ml/min). A kutyák további csoportjában (PC; n = 13), 5 perccel a 25 perces LAD okklúziót megelőzően az eret, 5 perces megszakításokkal, 2 x 5 percre lefogtuk. Négy állatban közvetlenül a PC ingert követően a szívet megállítottuk és szívsvöveti mintát vettünk; további kilenc állatban a PC okklúziókat/reperfúziókat 25 perces LAD okklúzió és reperfúzió követte. Peroxinitritet 34 állat kapott 100 nM intracoronáriás (0,5



ml/min) infúzióban, a 25 perces LAD okklúziót megelőzően, 5 perces megszakítással 2 x 5 percen keresztül. Négy kutyában közvetlenül a PN infúziókat követően szívszöveti mintát vettünk, 19 állatban a PN infúziókat követően 5 perccel a LAD-ot 25 percre lefogtuk. Tizenegy kutyában a tizenkilencből a peroxinitrit infúzió előtt 10 perccel valamint az alatt  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák szelektív gátlószerét, 5-HD adtuk ugyancsak intracoronáris infúzió formájában (5-HD+PN;  $n = 8$ ;  $150 \mu\text{g/kg/min}$  és  $n = 3$ ;  $300 \mu\text{g/kg/min}$ ,  $0,5 \text{ ml/min}$ ). További három állat csak 5-HD-ot ( $150 \mu\text{g/kg/min}$ ) kapott a koszorúér okklúziókat megelőzően 30 percen keresztül.

## EREDMÉNYEK

1. A pH 8,4-es sóoldat, a  $100 \text{ nM}$  koncentrációjú PN és az 5-HD ( $150$  és  $300 \mu\text{g/kg/min}$ ) intracoronáriás infúziója szignifikánsan nem befolyásolta a mért hemodinamikai értékeket a 25 perces LAD okklúziót megelőzően. A koszorúér lefogást követően mindhárom csoportban szignifikánsan eltéréseket tapasztaltunk a hemodinamikai eredményekben, azonban az LVEDP, és a kamrai kontrakcióra utaló  $dP/dt$  értékek szignifikánsan különböztek a kontroll csoporttól a PC, PN és 5-HD+PN csoportok esetén.

2. A koszorúér lefogását követően a kontroll kutyákban a kamrai aritmiák nagy számban és gyakoriságban jelentkeztek és egyetlen állat sem élte túl a kombinált I/R inzultust. Az iszkémia súlyosságát jellemző paraméterek, így az epikardiális ST-szakasz változás és az elektromos aktiváció inhomogenitása egyaránt gyorsan és meredeken emelkedett a kontroll csoportban. Ezzel szemben a PN  $100 \text{ nM}$ -os 2 x 5 perces intracoronáriás infúziója, a prekondicionáláshoz hasonlóan szignifikánsan csökkentette a kamrai aritmiák számát és gyakoriságát. A PN hatására ugyancsak mérséklődött az iszkémia súlyossága. Így az epikardiális ST-szakasz, valamint az elektromos aktivációs inhomogenitás iszkémia során bekövetkező emelkedésének meredeksége és abszolút értéke szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban. Továbbá a peroxinitrittel kezelt csoportban, jelentős mértékben csökkent az I/R-t követő endogén peroxinitrit képződést jellemző NT szintje.

3. Munkacsoportunk korábbi kísérletei arra utalnak, hogy a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák nyitása szerepet játszik a PC antiaritmiás hatásában. Ezzel ellentétben jelen vizsgálatunk azt mutatták, hogy az 5-HD jelenlétében ( $150 \mu\text{g/kg/min}$  és  $300 \mu\text{g/kg/min}$ ) a PN antiaritmiás és antiiszkémiás, valamint a nitro-tirozin képződést csökkentő hatása szignifikánsan nem változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák nyitása nem szükséges a PN antiaritmiás hatásához.

4. További kísérletekben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az endogén PN képződés mérséklődés a prekondicionált és peroxinitrittel kezelt csoportokban a csökkent NO és/vagy  $O_2^-$  képződés csökkenésének az eredménye.

Korábbi kísérleteinket megerősítve a PC és a PN kezelés egyaránt mérsékelte az I/R során megjelenő kamrai aritmiákat és az iszkémia súlyosságát. A koszorúér lefogás hatására a plazma NOx szintje a kontroll csoportban a kezdeti emelkedést követően (5-12 min) az okklúzió végére jelentősen csökkent és szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az okklúzió előtti érték. Mind a mind a PC okklúziók/reperfúziók, mind a PN infúziók hatására a plazma NOx szintje szignifikánsan emelkedett és az iszkémia teljes időtartama alatt ezen a szinten maradt. Reperfúzió hatására a plazma NOx szintek mindhárom csoportban, míg a szöveti NOx szintek csak a prekondicionált és a peroxinitrittel kezelt csoportokban emelkedtek. Ugyanakkor, a kontroll állatokhoz képest reperfúzió kezdetén mért szöveti  $O_2^-$  szignifikánsan csökkent a PC és PN csoportokban. Ennek eredményképpen a NT képződés jelentősen mérséklődött.

## MEGBESZÉLÉS

### ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

**I.** Kísérleteinkben elsőként mutattuk ki, hogy *in vivo* altatott kutyában a peroxinitrit 100 nM intracoronáriás infúziója a prekondicionáláshoz hasonlóan jelentősen csökkentette a miocardiális I/R során fellépő kamrai extraszisztolék számát, és mérsékelte a súlyosabb kamrai aritmiákat, így a kamrai tachikardia és a kamrafibrilláció gyakoriságát, valamint az iszkémiás károsodás mértékére utaló epikardiális ST-szakasz és elektromos aktivációs inhomogenitást.

**II.** Eredményeink arra utalnak, alapján, a prekondicionálással ellentétben a peroxinitrit antiaritmiás hatásában a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák nyitása nem játszik döntő szerepet, ugyanis a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatorna blokkoló 5-HD jelenlétében a PN antiaritmiás hatása jelentősen nem változott.

**III.** Kimutattuk, hogy a PC és PN alkalmazását követő csökkent endogén PN képződés elsődlegesen a szuperoxid keletkezés mérséklődésének tulajdonítható. Továbbá feltételezzük, hogy a NO szintjének és biológia hozzáférhetőségének iszkémia alatti megőrzése jelentős szerepet játszik az antiaritmiás hatásban. Feltehetően azért, hogy a NO szabályozza a reperfüziót követő káros  $\text{O}_2^-$  és a NT képződést.

Eredményeink alátámasztják, azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint az exogén módon az iszkémia és/vagy reperfüziót megelőzően alkalmazott, kis koncentrációjú PN kardioprotektív hatással rendelkezik. Bár a PN kardioprotektív, antiaritmiás hatásának mechanizmusa továbbra sem ismert. Feltételezhető, hogy PN-ből felszabaduló NO jelentős szerepet játszik a védőhatás kialakításában.

A PN antiaritmiás hatásának feltételezhető mechanizmusa lehet, hogy NO donorként hozzájárul az iszkémiás/reperfüziós kamrai aritmiák csökkenéshez. Ezt a feltételezést erősítik meg korábbi kísérleteink, amelyekben az NO donorok (nicorandil, isosorbide mononitrát, nitroprusside nátrium) hatására jelentősen mérséklődnek az I/R során megjelenő kamrai aritmiák. Ismert, hogy NO fokozza a sGC aktiválását, ezáltal csökkenti az iszkémia hatására képződő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet, a katekolaminok felszabadulását, a ROS képződését, amely mechanizmusok hozzájárulhatnak a PN antiaritmiás hatásának kialakításában.

Másrészt a nitrogén-monoxid a különböző fehérjéket és ioncsatornákat (SERCA2a, L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna vagy a mitokondriális F1-ATPáz) S-nitrozilálja, amely mechanizmus függetlenül a sGC aktivásától.

A nitroziláció eredménye, hogy a sfehérjék, enzimek aktivitása módosulhat, többek között a SERCA2a aktivitása fokozza a  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt a szarkoplazmás retikulumba, valamint az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák gátlása mérsékli a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlását; mindkét mechanizmus a I/R alatti  $\text{Ca}^{2+}$  túlterhelés és aritmiák csökkenését eredményezheti.

Továbbá, a nitrogén-monoxid képes szabályozni a mitokondriális szuperoxid képződést. Korábbi eredmények bizonyítják, hogy a NO általi protein kináz (PKG, PKC) aktiváció a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  nyitása szuperoxid szabadul föl, amely szerepet játszik a prekondicionálás védőhatásában. A munkacsoport korábbi eredményei alapján ismert, hogy a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  blokkolása a PC okklúziókat/reperfúziókat megelőzően 5-HD-val (150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) megszüntette a prekondicionálás antiaritmiás, kardioprotektív hatását. Ezzel ellentétben eredményeink azt mutatják, hogy a PN antiaritmiás hatása független a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák nyitásától. Ugyanis az 5-HD a PN antiaritmiás és antiiszkémiás hatását sem 150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  sem 300  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  mennyiségben döntően nem befolyásolta. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a PN valószínűleg egyéb szignalizációs utakon fejt ki hatását.

Ugyanakkor, jelentős eredményként értékelhető, hogy mind a PC, mind a PN szignifikánsan csökkentette a hosszú I/R hatására képződő NT mennyiségét, amely vagy a NO vagy a  $\text{O}_2^-$  képződés mérséklődének köszönhető. Ezt a hipotézist egy második kísérlet sorozatban vizsgáltunk. Altatott kutya modellünkben a 2 x 5 perces peroxinitrit infúziók és a prekondicionáló okklúziók/reperfúziók hatására a plazma  $\text{NO}_x$  szintje jelentős mértékben emelkedett, amely emelkedés a 25 perces koronária okklúzió során megtartott volt és szignifikánsan különbözött a kontroll csoporttól, amelyben a  $\text{NO}_x$  szintek az okklúzió végére jelentősen csökkentek. Ezek az eredmények ellentétben állnak azokkal a korábbi, elsődlegesen *in vitro* kísérletekből kapott eredményekből, amelyekben kimutatták, hogy iszkémia során fokozódik a NO képződés és ez hozzájárul az I/R károsodáshoz. Feltételezésünk szerint a PC és PN adás hatására a plazma és a szöveti  $\text{NO}_x$  szintek megtartása fontos szerepet játszik ezen beavatkozások antiaritmiás és antiiszkémiás hatásában. Az eredmények különbözőségére több magyarázat is lehet: legkézenfekvőbb az *in vivo* és *in vitro* kísérletek közötti eltérések, továbbá a biológia mintavétel (vér, szívszövet) ideje és térbeli lokalizációja, valamint a NO szintjének meghatározása. Mindezek mellett, ismert, iszkémia során a szívizomban jelentősen csökken a nitrogén-monoxid szintáz működéséhez szükséges oxigén és redukált kofaktorok (NADPH,  $\text{BH}_4$ ) mennyisége, valamint a fokozódik az úgynevezett uncoupled NOS aktivitás; mindkét mechanizmus a NO szintjének és biológiai hozzáférhetőségének mérséklődését eredményezheti.

Kísérleteinkben a NO szintjének és biológiai aktivitásának okklúzió alatti megőrzése, feltehetően a reperfúziót követő jelentős mértékű  $O_2^-$ , valamint az NT képződés csökkenésével hozzájárul a PC és PN antiaritmiás hatásához.

Eredményeink összegzésekképpen elmondható, hogy altatott kutyában az exogén peroxinitrit, a prekondicionáláshoz hasonlóan, szignifikánsan csökkenti az I/R során megjelenő kamrai aritmiákat és az iszkémia súlyosságát. A peroxinitrit számottevő antiaritmiás és antiiszkémiás hatásnak a kialakításában a prekondicionálással ellentétben a  $mitoK_{ATP}$  csatornák nem játszanak döntő szerepet. Ugyanakkor, a PC és a PN hatására bekövetkező csökkent endogén PN képződés elsődlegesen a szuperoxid produkció mérséklődésének tulajdonítható, amely a nitrogén-monoxid szintjének és biológiai hozzáférhetőségének I/R alatti megőrzésével együtt szerepet játszhat az antiaritmiás és antiiszkémiás hatás kialakulásában.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával és köszönettel tartozom:

Témavezetőmnek *Prof. Dr. Végh Ágnesnek*, akire bármikor számíthattam a doktori munkám során, mind tudományos, mind egyéb kérdésekben. Útmutatása, nemcsak a PhD munkámban nyújtott hasznos segítségét, hanem segítségével megismerhettem a logikus, lényegre törő kutatói gondolkodásmódot.

*Prof. Dr. Varró Andrásnak* a SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének a lehetőségért, hogy intézetében dolgozhattam az elmúlt évek során.

*Prof. Dr. Ferdinándy Péternek* és munkacsoportjának az SZTE ÁOK Biokémia Intézetben, különösképpen *Huliák Ildikónak* (jelenlegi munkahely: SZTE TTIK) és *Dr. Kupai Krisztinának*, a molekuláris vizsgálatokban nyújtott segítségért és szakmai tanácsokért.

*Dr. Kaszaki Józsefnek* és munkatársainak (*Mester Csilla, Markó Edina, Kovács Lilla*) SZTE ÁOK Sebészeti Intézetből és *Dr. Seprényi Györgynek* az SZTE ÁOK Biológia Intézetéből, akikre munkatársként és barátként egyaránt támaszkodhattam.

*Bakó Erikának* és *Biczókné Battancs Irénnek*, az állatkísérletek során nyújtott kiváló szakértelmet, segítséget valamint a munkán kívüli kötetlen beszélgetéseket.

A labor további munkatársainak: *Lacinak, Marcinak, Marcsinak* és *Tanácsné Goda Klárinak*, akikre a munkában és azon kívül egyaránt számíthattam.

Végül, de nem utolsósorban a legnagyobb köszönet *családomnak*, hogy szeretetükkel, megértésükkel nyugodt biztos háttérrel biztosították a doktori munkámhoz.