

Az OTKÁ-hoz 2003.-ban „*A prekondicionálás korai és késői antiarrhythmias hatásában szerepet játszó mechanizmusok farmakológiai és molekuláris vizsgálata*” címmel benyújtott pályázatban vázolt kutatási tervet végrehajtása során a következő eredményeket értük el

A prekondicionálás kardioprotektív hatásában szerepet játszó mechanizmusok vizsgálata során 1992.-ben elsőként vetettük fel a nitrogén monoxid (NO) szerepét a prekondicionálás kardioprotektív hatásában. Kimutattuk, hogy a NO mint trigger és mint mediátor is részt vesz a prekondicionálással, az ischaemia és reperfüzió (I/R) során fellépő súlyos kamrai arrhythmiaakkal szemben, kialakítható korai és késői védőhatásban. Vizsgálatainkban, altatott kutyákban, prekondicionáló ingerként rövid ideig tartó koszorúér okklúziókat, a jobb kamrán keresztül magas frekvenciájú szívingerlést vagy futószalagon fokozatosan erősödő fizikális terhelést alkalmaztunk 20 perccel (korai) vagy 24 órával (késői) a koszorúér okklúziót/reperfüziót (teszt ischaemia) megelőzően. A 2003 és 2007 között eltelt 4 éves kutatási periódusban a NO trigger és mediátor szerepét vizsgáltuk a fizikális terheléssel végzett prekondicionálás késői kardioprotektív hatásában. Kísérleteinkben a szelektív és specifikus iNOS gátló etil-metil-isothioureát (AEST), valamint a specifikus de nem szelektív nitrogén oxid szintáz (NOS) enzimet gátló L-NAME-t használtuk. Kimutattuk, hogy mind a fizikális terhelés előtt alkalmazott L-NAME, mind a terhelést követően, de az okklúzió előtt adott AEST csökkentette a fizikális terhelés antiarrhythmias hatását, amely arra utal, hogy a NO triggerként és mediátorként is részt vesz a prekondicionálás késői antiarrhythmias hatásának kialakításában. Eredményeinket 2003.-ban hazai és külföldi kongresszusokon ismertettük és 2005.-ben a Life Science-ben közöltük (1). A NO késői antiarrhythmias hatásban játszott szerepét igazolták azok a kísérleteink is, amelyekben kimutattuk, hogy a per os alkalmazott PDE gátló sildenafil (Viagra), csökkenti a 24 óra múlva előidézett ischaemia és reperfüzió során megjelenő arrhythmiaikat. Eredményeinket kongresszusi előadásban ismertettük és a British Journal of Pharmacology-ban „Rapid Communication”-ként közöltük (2).

Ugyancsak elsőként mutattuk ki, hogy a prekondicionálás antiarrhythmias hatásában szerepet játszanak a vazodilatátor hatású prostanoidok (*Végh és mtsi., 1990*). Jelen kísérleteinkben a prosztaciklin részvételét tanulmányoztuk a fizikális terheléssel kialakítható prekondicionálás késői antiarrhythmias hatásában. Kimutattuk, hogy a ciklooxygenáz enzimgátló celecoxib a futtatás késői antiarrhythmias hatását számottevően nem befolyásolja. Eredményeinket 2004.-ben a European Journal of Pharmacology-ban publikáltuk (3). A különböző ingerekkel (koszorúér okklúzió, szívingerlés, fizikális terhelés) kiváltható prekondicionálás korai és késői antiarrhythmias hatásáról, 2005. februárjában, a törökországi Antalyában megrendezett NATO Advanced Research Workshop-on, felkért előadásban számoltunk be, amelynek anyagát a Journal of Experimental and Clinical Cardiology közlemény formájában publikálta (4).

Számos irodalmi adat igazolja, hogy a reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepet játszanak a prekondicionálás korai és késői ischaemiás károsodást, valamint a reperfüziót követő kontraktilitási diszfunkciót (miokardiális stunning) csökkentő hatásában. Ezzel szemben kevés, zömében ellentmondásos adat áll rendelkezésünkre a ROS-nak a prekondicionálás antiarrhythmias hatásában betöltött szerepére vonatkozóan. Ezért, altatott kutyákon végzett okklúziós/reperfüziós modellünkben, vizsgáltuk a ROS szerepét a prekondicionálás korai antiarrhythmias hatásában. Kimutattuk, hogy rövid koszorúér okklúziókkal prekondicionált szívekben, a prekondicionáló okklúziók felengedését követően chemilumineszcenciával detektálható szabadgyök képződés észlelhető, amelyet a gyökfogó merkaptopropionilglicin (MPG) közömbösíteni képes. Ennek ellenére az MPG a prekondicionálás antiarrhythmias

hatását számottevően nem befolyásolta. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy „*in vivo*” körülmények között a reaktív szabadgyökök nem elengedhetetlenül szükségesek a prekondicionálás antiarrhythmias hatásának kialakításához. Eredményeinket kongresszusi előadásban, illetve a közlemény formájában ismertettük (5)

A NO és a ROS a prekondicionálás antiarrhythmias hatásában játszott szerepének tanulmányozását célozták azok a legújabb kísérleteink is, amelyekben a két erősen reaktív szabadgyök reakciójából képződő peroxinitrit hatását vizsgáltuk az I/R során fellépő arrhythmiaakra. Kimutattuk, hogy a kis koncentrációban (100 nM) közvetlenül a koszorúér keringésbe infúzió formájában bejuttatott peroxinitrit, a prekondicionáláshoz hasonló módon, csökkentette az okklúzió és reperfúzió során fellépő kamrai arrhythmia súlyosságát. Ezekben a kísérletekben meghatároztuk a peroxinitrit képződésre utaló nitrotyrosin mennyiségét Western-blot módszerrel. Eredményeink azt mutatták, hogy mint a rövid (2 x 5 perc) koszorúér okklúziókkal végzett prekondicionálás, mind a peroxinitrit hasonló időtartamú intracoronariás infúziója, szignifikánsan csökkentette a hosszú (25 perc) okklúziós/reperfúziós inzultus végén meghatározott endogén peroxinitrit képződés mértékét. Ezeket az eredményeinket hazai (6) és nemzetközi (7, 8) kongresszusokon ismertettük, és a közeljövőben publikálni fogjuk.

Az elmúlt négy évben kutatómunkánk másik nagyobb témakörét a gap junkciós csatornáknak az arrhythmogenezisben játszott szerepének vizsgálata jelentette. Irodalmi adatok utaltak arra, hogy a gap junkciós csatornák funkciójának megváltozása (nyitott/zárt állapot) jelentős mértékben hozzájárulhat a különböző kardiovaszkuláris kórképek kialakulásához. 2005.-ben vizsgálatokat kezdtünk annak a megállapítására, hogy a gap junkciós csatornák milyen mértékben vesznek részt az ischaemia/reperfúzió során fellépő kamrai arrhythmia keletkezésében. Tanulmányoztuk azt is, hogy vajon a prekondicionálás (PC) módosítja-e a gap junkciós csatornák működését, és amennyiben igen, akkor ez összefüggésbe hozható-e a prekondicionálás antiarrhythmias hatásával. Eredményeink arra utalnak, hogy a szívizom gap junkciós csatornáinak az ischaemia előtti szétkapcsolása (zárása) a specifikus, csak a gap junkcionális csatornákon ható carbenoxolonnal (CBX), hasonló antiarrhythmias hatást idéz elő, mint a rövid koszorúér okklúziókkal végzett prekondicionálás. Ezzel szemben, ha a prekondicionálást carbenoxolon jelenlétében végeztük, az ischaemia során az arrhythmia száma és súlyossága fokozódott, azaz az önmagukban antiarrhythmias hatású ingerek együtt alkalmazása gyengítette, illetve megszüntette a protektív hatást. A mechanizmus felderítése érdekében az *in vivo* kísérletekben mértük a szöveti impedancia változását, amely a gap junkciós csatornák elektromos vezetőképességében bekövetkező változásokról szolgáltat információt. Továbbá az ischaemiás periódus végén vett szöveti mintákban meghatároztuk a gap junkciós csatornákat felépítő speciális fehérje, a connexin43 (Cx43) foszforilációs mintázatában bekövetkező változásokat Western blottal, valamint a szöveti permeabilitás (metabolikus kapcsolat) változását „kettős festés” módszerrel. Mind az „*in vivo*” kísérletekben mért impedancia változások, mind az „*in vitro*” módszerekkel végzett vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a kontroll állatokban mérhető, különösen az Ib fázisú arrhythmia megjelenését közvetlenül megelőző erőteljes rezisztenciaemelkedés (gap junkció záródás) a prekondicionált, illetve a carbenoxolonnal kezelt állatokban elmaradt, illetve mérséklődött, míg a CBX + PC állatokban hasonló volt, mint a kezeletlen kontrollban. Hasonlóképpen a PC és a CBX-szel külön-külön kezelt állatokban a CX43 foszforilált formája (gap junkció nyitott állapotát jellemzi) és a szöveti permeabilitás megőrződött szemben a kontroll és a PC + CBX együttes adását követően, ahol a csatornák fokozott záródása következtében a permeabilitás csökkent és a Cx43 defoszforilált formája nagyobb mennyiségben fordult elő. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a gap junkciós

csatornák részleges zárása, történjen ez akár rövid prekondicionáló okklúzióval vagy a carbenoxolonnal, olyan folyamatokat indít el, amelyek a hosszú ischaemiás periódus alatt gátolják a csatornák további szétkapcsolását, csökkentik az ischaemiás területen belül az elektromos inhomogenitás mértékét és, ezáltal az arrhythmia kialakulását. Ugyanakkor, ha a prekondicionálást carbenoxolon jelenlétében végezzük, azaz a gap junctionális csatornák szétkapcsolása erőteljesebb az ischaemiát megelőzően, az arrhythmiaakkal szembeni védőhatás megszűnik, feltehetően azért, hogy a prekondicionálás során képződő, és a védőhatás kialakításához szükséges „trigger” vagy „mediátor” molekulák sejtek közötti transzportja gátlódik. Ezeket az eredményeinket számos hazai és nemzetközi kongresszuson ismertettük és 2007.-ben a Cardiovascular Researchben közöltük (9). Melepő eredményeket kaptunk azon vizsgálataink során, amikor a carbenoxolont közvetlenül az ischaemia előtt kezdtük adni és a koszorúér okklúzió teljes időtartama alatt fenntartottuk. Ebben az esetben is a carbenoxolon antiarrhythmia hatásának bizonyult, és ez arra utal, hogy a gap junctionális csatornák ischaemia előtti zárása meghatározó mechanizmus a védőhatás kialakításában, és ezt a hatást a szer okklúzió alatti alkalmazása már nem befolyásolja. Ezekből az eredményeinkből készült közleményt a *Cardiologia Hungarica* közlésre elfogadta (10).

Kevésbé sikeresek voltak azok a kollaborációban végzett vizsgálataink, amelyek a prekondicionálás hatására genetikai szinten bekövetkező változások vizsgálatát célozta. Ezekben a kísérletekben, prekondicionáló ingerként magas frekvenciájú szívingerlést végeztünk, majd 24 óra múlva a koszorúér elzárásával ischaemiát idéztünk elő. A kísérlet végén vett szövetszövetmintákból gén-chip technikával vizsgáltuk a prekondicionálás hatására kialakuló eltéréseket, az ép, illetve az ischaemiás szívmentákhöz képest. Az ép szívekhez képest a közel 2000 vizsgált génből kb. 40 gén mutatott eltérést ischaemia hatására, és ezekből kb. 16 gén változott prekondicionálás után. Az eredmények igazolására kvantitatív-PCR vizsgálatok is történtek, amelyek nem minden esetben igazolták vissza a chip eredményeket. Az adatok értékelése és értelmezése jelenleg is folyik.

Kísérletes munkánkat nagymértékben hátráltatta, hogy 2006. júniusában egyik laboratóriumunkban a hűtőszekrény zárlata miatt tűz keletkezett, aminek következtében a munkacsoport három laboratóriuma, a benne lévő nagyértékű műszerekkel együtt, közel 40 millió forintértékben károsodott. Az *in vivo* és a molekuláris vizsgálatainkhoz használt vegyszereink szinte teljes mértékben (kb. 5 millió forint) megsemmisültek. A károk rendezése több mint fél évet vett igénybe, így csak 2007. elején tudtuk a kísérleteinket tovább folytatni. Mindezen nehézségek ellenére, a munkacsoport diplomás és szakdolgozó tagjainak áldozatos munkájának köszönhetően, a kutatásainkat sikeresen végeztük, amelyet kongresszusi részvételeink illetve közleményeink is jeleznek. Kutatómunkánk sikeres teljesítéséhez köszönjük az OTKA támogatását.