

**OTKA azonosító: 46810**

**Típus: F**

**Támogatott periodus: 2004-2006**

**Vezető kutató: Csont Tamás**

**Kutatóhely: Szegedi Tudományegyetem, Biokémiai Intézet**

**Zsúri: IB1**

## **Szakmai zárójelentés**

**2007**

**Bakteriális lipopoliszachariddal kiváltott késői  
kardioprotekció az iszkémia/reperfúziós károsodással  
szemben**

## **Rövid összefoglaló**

Hazánkban és a civilizált társadalmakban egyaránt, az iszkémiás szívbetegség az egyik leggyakoribb halálokok közé tartozik. A szívizom endogén adaptációs mechanizmusainak támogatása, illetve vizsgálata ezért nagy jelentőségű. Kísérleteink bizonyítják, hogy ez a mechanizmus emberben is hatásos védelmet jelent. Kimutattuk továbbá, hogy a farmakológiai prekondicionálás hatékonyan véd az iszkémiás károsodás ellen. A kis dózisu (0,5 mg/kg) bakteriális lipopoliszachariddal (LPS) előkezelte patkányok szíve 24 órával a kezelés után fokozottabb mértékben áll ellen az iszkémiát követő szívfunkciós károsodásnak. A 24 órás LPS előkezelés megnövelte a szívizom nitrogén-monoxid tartalmát az indukálható nitrogén oxid szintáz fokozott aktivitása révén. A LPS előkezelés hatására szignifikánsan emelkedett a szívizom szuperoxid termelése is a fokozott xantin oxidoreduktáz aktivitás miatt. A szérum nitrotirozin szintje ugyancsak emelkedett az LPS előkezelés hatására, jelezvén a NO és szuperoxid anion reakciója révén képződő peroxinitrit fokozott képződését a szervezetben. A LPS előkezelés növelte a miokardiális cGMP tartalmat is. Eredményeink szerint az oxidatív és nitrozatív stressz, valamint az NO-cGMP szignalizációs út fontos szerepet játszhat a szívizom farmakológiai prekondicionálásában.

## **Short summary**

Ischemic heart disease is one of the most frequent cause of death in the civilized societies, therefore investigation of cardioprotective mechanisms to prevent ischemic damage is essential. We have shown that this protective mechanism is effective in humans. We have also shown that pharmacological preconditioning effectively protects against ischemia/reperfusion injury. 24h pretreatment of rats with bacterial polysaccharides (LPS) has resulted in a protection against ischemia-induced deterioration of cardiac function. A 24h LPS pretreatment increased cardiac nitric oxide content via the induction of the inducible isoform of nitric oxide synthase. LPS pretreatment also increased cardiac superoxide production via an increase in the activity of xanthin oxidoreductase. LPS increased serum nitrotyrosine levels showing increased formation of peroxynitrite from NO and superoxide. In addition, LPS pretreatment increased myocardial cGMP level. Our results suggest, that both oxidative and nitrosative stress play an important role in pharmacological preconditioning of the heart.

## Részletes zárójelentés

### Bevezetés

A civilizált társadalmakban, hazánkat is beleértve, a megbetegedések legnagyobb hányada szív és érrendszeri problémákra vezethető vissza. Ezek közül is talán az iszkémiás szívbetegségnek a legnagyobb a jelentősége, mivel az ide tartozó betegségek a leggyakoribb halálokok közé tartoznak. Az egészségügy két fronton védekezhet, egyrészt a már kialakult koronáriakeringési-, ritmus-, és szívfunkciózavar konzervatív vagy sebészi kezelésével, vagy a tünetekkel járó betegség kialakulásának megelőzésével. Ez utóbbi megoldás lenne követendő mind az egészségügyi ellátás, mind pedig a beteg szempontjából. A megelőzés ugyancsak két síkon valósulhat meg. Egyrészt az iszkémiás szívbetegség kialakulásában döntő szerepet játszó rizikófaktorok (egészségtelen étrend, káros szenvedélyek, stresszes életmód, stb.) kiiktatása a cél, azonban ez nem mindig lehetséges (pl. kooperáció hiánya a beteg részéről, fokozott elvárások a munkahelyen következményes stresszel, időskor, stb.), illetve nehezen kontrollálható. A másik lehetőség a szívizom felkészítése, kondicionálása, vagy "hozzászoktatása" az iszkémiás stresszhez.

Ezen utóbbi eshetőség kiaknázására, maga a természet is kínál egy lehetőséget, mivel a szívizom rendelkezik egy endogén adaptációs képességgel, melyet iszkémiás prekondicionálásnak neveznek (Murry et al., 1986; Baxter et al., 1996). E jelenség során enyhe iszkémiás epizódusok hatására a szívben tolerancia fejlődik ki az iszkémiás károsodással szemben. A prekondicionálás kardioprotektív hatása két fázisban jelentkezik. A korai (klasszikus) prekondicionálás a kiváltó inger követően percekben belül megjelenik, azonban csak pár óráig tart. A prekondicionálás késői fázisa viszont a kiváltó stresszhatást követően 24-72 óráig figyelhető meg. Az utóbbi évek erőteljes kutatásai ellenére a prekondicionálás mechanizmusa mindmáig nem kellően tisztázott és meglehetősen ellentmondásos. Ennek okai többek között eltérő állatmodellekben, a prekondicionálás kiváltásának sokféle módjában, valamint a direkt bizonyítékok alacsony számában keresendő (Baxter et al., 1996). A prekondicionálást az iszkémián kívül sokféle más stresszhatással is ki lehet váltani. Ennek különösen nagy a klinikai jelentősége, hiszen az iszkémiás szívbetegség során amúgy is károsodott szívizom további iszkémiának való kitétele komoly veszélyeket rejthet magában, továbbá szinte lehetetlen megjósolni, hogy mikor fog bekövetkezni koronáriaelzáródás. A farmakológiai prekondicionálás viszont hatalmas klinikai potenciállal bír, s nem utolsósorban széles betegcsoporton, könnyedén alkalmazható. Ezért a prekondicionálás mechanizmusának pontosabb megértése igen fontos lehet olyan gyógyszerterápiák megvalósítására, amelyek célja a szívizom védelme a károsodástól.

felkutatása és gyógyszermolekulák fejlesztése szempontjából, melyek hatásosan képesek a szívizmot felkészíteni egy esetleges infarktus káros hatásainak túlélésére.

### **Prekondicionálás a humán szívizomban**

Az iszkémiás prekondicionálás vizsgálata elsősorban állatkíséretes modelleken nyugszik. A humán szívizom prekondicionálhatósága ezért sokáig kérdéses maradt, noha ez igen fontos a jelenség klinikai jelentőségének megítélése szempontjából. Mivel az iszkémiás prekondicionálás a klinikumban csak korlátozott körülmények között vizsgálható, relatíve kevés tanulmány született betegekben a prekondicionálás vizsgálatára. Ráadásul ezen tanulmányok sok esetben ellentmondó eredményekkel zárultak (Ungi et al., 2005). Ezen problémák tisztázására szívkatéterezés során ismételt ballonos koronáritágításon átesett betegekben vizsgáltuk a ballon felfújása (koronária mechanikus tágítása, iszkémia) alatt kifejlődő ST eleváció mértékét az intrakoronáriásan elvezetett EKG-n. A ballont 2 perc elteltével leengedtük (reperfúzió), majd megismételtük az értágítást még két alkalommal. Így egy klasszikus iszkémiás prekondicionáló protokollt tudtunk létrehozni humán szívizomban. Azt tapasztaltuk, hogy az ismételt érelzárások során a kifejlődő ST eleváció mértéke csökken, ami a humán szívizom iszkémiához való alkalmazkodási képességét jelzi (Ungi et al., 2005). Arra is fény derült azonban, hogy a magas szérum koleszterin koncentrációval rendelkező betegekben a prekondicionálás védő hatása elvész (Ungi et al., 2005).

### **Farmakológiai prekondicionálás**

Az iszkémiás prekondicionálás gyakorlati alkalmazása korlátokba ütközik, speciális feltételeket igényel, és veszélyeket rejt magában. Ezért ebben a formájában valószínűleg klinikailag soha nem lehet kiaknázni a benne rejlő lehetőségeket. Prekondicionálást azonban meglehetősen sokféle stimulussal ki lehet váltani. Gyakorlati szempontból az egyik legígéretesebb a kémiai anyagokkal kiváltott úgynevezett farmakológiai prekondicionálás lehet. Ilyenkor egy kívülről bevitt kémiai anyag hivatott beindítani a prekondicionálásra jellemző molekuláris mechanizmusokat, ami végső soron a szívizom iszkémiatűrő képességét fokozza.

## **A. Bakteriális lipopoliszachariddal (endotoxin) kiváltott prekondicionálás**

A generalizált gyulladással járó betegségek (pl. bakteriális vagy virális fertőzések, szervkilökődés, égési sérülés, intesztinális iszkémia, trauma, hemorrágia, stb) következtében egy jellegzetes tünetegyüttes alakul ki amelyet "systemic inflammatory response syndrome" (SIRS)-nek neveznek, s egyik jellegzetes tünete a szívfunkció erőteljes csökkenése, mely gyakran halálos kimenetelű lehet. Az endotoxin sokkban, a SIRS egyik formájában, ugyancsak súlyos szívfunkciózavar figyelhető meg (Ungureanu-Longrois et al., 1995). Kísérletes adatok mutatják, hogy endotoxin kezelés következtében akut szívelégtelenség alakulhat ki (4-10 óra elteltével) (Zingarely et al., 1997), azonban később (24-72 órával a kezelés után) a prekondicionálás késői protektív hatásához hasonló védelmet okoz (Maulik et al., 1995). A nem toxikus endotoxin származékoknak így komoly klinikai jelentősége lehet iszkémiás szívbetegségben (Elliot et al., 1996).

Saját eredményeink is azt bizonyítják, hogy a nagyobb dózisu endotoxin (4 mg/kg) előkezelés a szív funkcionális károsodását okozza 3-12 órával a kezelést követően, ami fordított arányosságban áll a plazmában mérhető mátrix metalloproteináz-9 aktivitással, mely elsősorban keringő fehérvérsejtekben fejeződik ki (Lalu et al., 2004).

Ugyancsak saját kísérleteinkben kontroll és 0.5 mg/kg endotoxinnal (*S. Typhimurium*) kezelt patkányokat használtunk. Az előkezelést követően 24 órával a szíveket az állatokból izoláltuk, majd *ex vivo* 30 perces tesztelő iszkémiának, s azt követő reperfüziónak tettük ki. Dolgozó szívperfüzió során, az iszkémiát követően vizsgáltuk a szívfunkció romlását. Az endotoxin kezelést követően meghatároztuk az oxidatív stressz mértékét a szívben. A kis dózisu endotoxin kezelés szignifikánsan javította a szív funkcióját jellemző paraméterek, úgymint az aorta átáramlás, a bal kamrában kifejlődő nyomás, a bal kamrai végdiasztolés nyomás emelkedés, valamint a szívizom kontraktilitására jellemző  $+dp/dt$  értékeit (Csont et al., 2006).

Mivel az iszkémia során megszüntetjük a szívizom oxigénellátását, majd a reperfüzió során azt hirtelen helyreállítjuk, a szöveti oxigén tenzió, valamint az oxigén metabolizmusban részt vevő enzimatis szereplők aktivitásában markáns változások állhatnak be. Ezért az oxidatív stressznek igen nagy szerepet tulajdonítanak az iszkémia-reperfüziós károsodás létrejöttében. Azonban nem csak a károsodás kifejlődésében, hanem a károsodáshoz való alkalmazkodási reakciók kiváltásában is szerepet játszhatnak az oxidatív stresszért felelős mechanizmusok. Vizsgáltuk ezért, hogy az endotoxin előkezelés hogyan változtatja meg a reaktív oxigén és nitrogén intermedierek képződését a szívben. Azt tapasztaltuk, hogy a nitrogén oxid (NO) szintje a szívben megemelkedett az endotoxin előkezelés

következtében, ami részben a szignifikánsan megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -független NO szintáz aktivitásnak tudható be (főként az indukálható izoforma aktivitása), mivel a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő konstitutív NO szintáz aktivitásban nem detektáltunk különbséget. Megjegyzendő azonban, hogy az iszkémia során a szívizomban akkumulálódó NO mennyiségét az endotoxin előkezelés nem befolyásolta. Mivel a NO intracelluláris hatásaiért jórészt a szolubilis guanilát cikláz aktiválását, s az így fokozott mértékben keletkező ciklikus guanozin-monofoszfátot (cGMP) teszik felelőssé, megvizsgáltuk, hogy az endotoxin előkezelés befolyásolja-e a szív cGMP tartalmát. Az endotoxin előkezelés szignifikánsan megemelte a szöveti cGMP szintet, valamint mérsékelte az iszkémia által indukált cGMP szint csökkenést. Ez a mechanizmus feltehetően hozzájárul a kardioprotektív hatáshoz.

Az utóbbi években egyértelművé vált, hogy a NO reakcióba lép az egyes kórállapotokban fokozott mértékben termelődő szuperoxid gyökkel (pl. iszkémia-reperfúzió), s a rendkívül citotoxikus peroxinitrit képződéséhez vezet (Beckman & Crow, 1993). Ezért a NO kardiovaszkuláris hatásait nem szabad a szuperoxid termelődés és peroxinitrit képződés figyelembevétele nélkül szemlélni (Szabo et al., 1996). Megvizsgáltuk ezért a szívizomban termelődő szuperoxid mennyiségét. Az endotoxin előkezelés szignifikánsan növelte a szuperoxid képződést a szívben. Biokémiai vizsgálataink arra utalnak, hogy ennek hátterében az emelkedett xantin oxidoreduktáz aktivitás állhat, mely enzim a sejtszintű szuperoxid termelődés egyik fő faktora. Egy másik jelentősebb potenciális szuperoxid termelő enzim, a NAD(P)H oxidáz aktivitása nem változott ugyanis szignifikánsan, mint ahogy nem változott a szuperoxid elbontásáért felelős fő antioxidáns enzim, a szuperoxid dizmutáz aktivitása sem. Mivel mind a NO, mind a szuperoxid szintje megemelkedett az endotoxin kezelés következtében, talán nem meglepő, hogy a szérum nitro tirozin szintje is emelkedést mutatott, mely az egyik leggyakrabban használt markere az endogén peroxinitrit képződésnek (Csont et al, 2006). Ezen eredményeinket ezidáig nemzetközi konferencián mutattuk be, folyóiratcikk készítése jelenleg van folyamatban.

### ***B. Farmakológiai prekondicionálás 3-nitro-propionsavval***

A farmakológiai prekondicionálás modellezésére kísérleteinkben egy másik anyagot, a 3-nitro-propionsavat (3NP) is vizsgáltuk, mint egy lehetséges prekondicionáló farmakont. Korábban már leírták, hogy 3NP alkalmazásával sikerült védelmet kifejteni az iszkémiás károsodás ellen a központi idegrendszerben. Patkányokból izolált szíveket 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfúciónak tettünk ki, majd trifenil-tetrazólium-kloridos festéssel meghatároztuk a túlélő és az elhalt szövet arányát. A 3NP-vel kezelt

patkányokból származó szívek iszkémia tűrése szignifikánsan jobb volt, ami a túlélő szövetek nagyobb arányában mutatkozott meg (Turan et al, 2006).

## Referenciák

Baxter, G.F., Marber, M.S., and Yellon, D.M. (1996) Myocardial stress response, cytoprotective proteins and the second window of protection against infarction. In: *Myocardial Preconditioning*, 233-250. Edited by Wainwright, C.L. and Parratt, J.R., Austin, Texas, R.G. Landes Company.

Beckman JS and Crow JP (1993) Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* **21**, 330-334.

Csont T, Fodor G, Sarvary L, Bencsik P, Ferdinandy P. (2006) Involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in the delayed cardioprotection induced by lipopolysaccharides. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 930-930. (abstract)

Elliott GT, Comerford ML, Smith JR, and Zhao L (1996) Myocardial ischemia/reperfusion protection using monophosphoryl lipid a is abrogated by the ATP-sensitive potassium channel blocker, glibenclamide. *Cardiovasc Res* **32**, 1071-1080

Lalu MM, Csont T, Schulz R. (2004) Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med.* **32**:1332-7.

Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman RM, Kagan VE, Kisin E, Tyurin V, Cordis GA, and Das DK (1995) Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am J Physiol* **269**, C907-C916

Murry C, Jennings R, and Reimer K (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136.

Szabó C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* **6**, 79-88

Turan N, Csonka C, Csont T, Giricz Z, Fodor G, Bencsik P, Gyongyosi M, Cakici I, Ferdinandy P. (2006) The role of peroxynitrite in chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in rat hearts. *Cardiovasc Res.* **70**:384-90.

Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA, and Smith TW (1995) Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **27**, 155-167.

van der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, and Cross CE (1995) Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* **329**, 341-349.

Ungi I, Ungi T, Ruzsa Z, Nagy E, Zimmermann Z, Csont T, Ferdinandy P. (2005) Hypercholesterolemia attenuates the anti-ischemic effect of preconditioning during coronary angioplasty. *Chest*. **128**:1623-8.

Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, Salzman AL, and Szabo C (1997) The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxin shock. *Br J Pharmacol* **120**, 259-267.