

## Szakmai záróbeszámoló az OTKA K79167 azonosítójú pályázathoz

Jelen OTKA pályázat keretein belül a következő főbb kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen szövetspecifikus génexpressziós változásokat indukál a vaszkuláris nitráttolerancia kifejlődése a szívben, illetve az aortában?
2. A nitroglicerinnel védelmet nyújtani az iszkémia-reperfúziós károsodással szemben a reperfúzió során alkalmazva, illetve vaszkuláris nitráttolerancia kifejlődését követően?
3. A posztkondicionálás jelensége kiváltható-e vaszkuláris nitráttolerancia kifejlődését követően?

A beszámolóban is a fenti pontok alapján mutatjuk be a főbb történéseket, illetve utalunk az eredeti munkatervtől való eltérésekre, módosulásokra.

1. Először is az általunk korábban már használt nitrát-tolerancia modellben ellenőriztük a tolerancia kifejlődését. Ezért a vaszkuláris nitroglicerinnel tolerancia kifejlődése céljából hím Wistar patkányokat 100 mg/kg nitroglicerinnel, illetve annak vivőanyagával, propilénglikolban szuszpendált laktóz-monohidráttal kezeltük szubkután három napon keresztül, naponta háromszor. A vaszkuláris nitroglicerinnel tolerancia kifejlődését a negyedik napon in vivo altatott állatokban teszteltük intravénásan adagolt nitroglicerinnel növekvő dózisaira (1, 3, 10, 30, 100 µg/kg) adott vérnyomásváltozás detektálása révén. A nitroglicerinnel előkezelt állatokban mért bazális hemodinamikai paraméterek jelentősen nem tértek el a vivőanyaggal kezelt patkányok értékeitől, azonban a vérnyomásesés mértéke már alacsonyabb intravénás nitroglicerinnel dózisok hatására is kifejezettebb volt a vivőanyaggal előkezelt csoportban (*Fekete et al., J Cardiovasc Pharmacol. 2013*). Izolált dolgozó patkányszív preparátumon vizsgálva ugyanakkor a szívfunkciót jellemző paraméterekben nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket a két csoportban.

Külön kísérletekben kontroll és vaszkuláris nitrát toleranciának kitett állatokban in vivo gyökfogást követően ESR mérések segítségével meghatároztuk a szöveti nitrogén-monoxid szintet a szívben és az aortában. Azt tapasztaltuk, hogy míg az aortában nem volt különbség a NO szintben a toleráns és kontroll állatok között, addig a szív NO tartalma magasabb volt a toleráns állatokban.

Ezután külön kísérletekben kontroll és vaszkuláris nitráttoleranciának kitett állatokból szíveket és aortákat izoláltunk, majd a szövetmintákat átöblítést követően lefagyasztottuk, Ezután RNS-t izoláltunk és DNS-chip technikával vizsgáltuk a génexpressziós profil változását a kétféle szövetben. Egyes érdekesebb gének változásait valós idejű RT-PCR-rel validáltuk.

A kontrollhoz képest a nitrát toleráns állatok szíveiben 19 (9 növekedett, 10 csökkent), míg aortáiban 11 (hat növekedett, 5 csökkent) gén mRNS-ének mennyisége mutatott változást több ezer gént szűrve a DNS-chip technikával. Számos változást QRT-PCR-rel is sikerült megerősíteni. Az eredményeket elemezve az volt a legszembetűnőbb, hogy szinte az összes nitrát tolerancia kifejlődése következtében expressziós változást mutató gén esetében különbség mutatkozott a változás irányában és/vagy mértékében a kétféle szövet, azaz a szív

és az aorta esetében. Ezek az eredmények jól egybevágnak munkacsoportunk korábbi feltételezéseivel, s arra utalnak, hogy a vaszkuláris nitrát tolerancia kifejlődéséhez vezető nitroglicerinnel kezelés szövetspecifikus hatásokkal rendelkezik, mely a szöveti génexpressziós profil eltéréseiben is megmutatkozik.

A fenti eredményekről "Heart Failure" Konferencián számoltunk be poszterprezentáció formájában, illetve egy angol nyelvű kézirat összeállítása folyamatban van, melyet nemzetközi tudományos folyóirathoz kívánunk benyújtani elbírálásra a közeljövőben.

Kamatoztatva a DNS-chip technikával nyert tapasztalatainkat, a szívizom génexpressziójának változását egy olyan szisztémás metabolikus modellben (ZDF patkány) is megvizsgáltuk, amelyről ismert, hogy a szív endogén adaptációs mechanizmusai károsodnak bennük. Számos gén expressziójának változását írtuk le, s az eredményekből született egy publikáció nemzetközi tudományos folyóiratban (*Sárközy et al., Cardiovasc Diabetol. 2013*).

2. A pályázat következő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy nitroglicerinnel, a klinikumban is használt jól ismert NO-donor molekulával, mérsékelhető-e a reperfúziós károsodás a szívben.

Előzetes kísérleteinkben egy primer neonatális patkány kardiomiocita tenyészet tesztrendszerben vizsgáltuk, hogy egy másik NO-donor molekula (S-adenozil-penicillamin: SNAP) rendelkezik-e citoprotektív hatással. Hipoxia-reoxigenizációt követően a SNAP kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtelhalást (*Görbe et al. Basic Res Cardiol. 2010*). A SNAP védő hatását felfüggesztette a protein kináz G farmakológiai gátlása. Ezek az eredmények biztatóak voltak a nitroglicerinnel valószínűsített infarktus méretet csökkentő hatásának szempontjából, ezért a kísérleteket izolált szívpreparátumokon folytattuk.

A vaszkuláris nitroglicerinnel tolerancia kifejlődése céljából hím Wistar patkányokat 100 mg/kg nitroglicerinnel, illetve annak vivőanyagával kezeltük szubkután három napon keresztül, naponta háromszor. A kontroll és vaszkuláris nitráttoleranciának kitett állatokból szíveket izoláltunk és ex vivo oxigenizált Krebs-Henseleit perfúziós oldattal perfundáltunk Langendorff szerint állandó hidrosztatikai nyomással. A szíveket ekvibrációt követően 30 perc regionális iszkémiának (bal leszálló koronária lezárítás), majd 120 perc reperfúzióval tettük ki. A szívek egy-egy csoportját különböző időpontoktól kezdve a kísérlet végéig  $10^{-7}$  M nitroglicerinnel tartalmú Krebs-Henseleit pufferrel perfundáltuk. Az egyik csoportban a nitroglicerinnel perfúziót a koronária lezárítást megelőzően, egy másik csoportban az iszkémia 25-dik percében, a harmadikban pedig a reperfúzió legelején kezdtük meg. Mindezeket a csoportokat iszkémia-reperfúzióval kitett csoportokkal vetettük össze az infarktus méretre gyakorolt hatásuk tekintetében. Azt tapasztaltuk, hogy a nem-toleráns állatokból származó szíveken az iszkémiát megelőzően, és az iszkémia 25-dik percében megkezdett nitroglicerinnel kezelés egyaránt szignifikáns mértékben csökkentette az infarktus méretét. Ugyan a reperfúzió elején megkezdett nitroglicerinnel kezelés is tendenciójában csökkenő infarktus méretet eredményezett, azonban ez nem bizonyult szignifikánsnak az iszkémia/reperfúziós csoporthoz képest. Ennek oka feltehetően az, hogy a reperfúzió korai szakaszában, amely a legfontosabb meghatározója a későbbi infarktus kialakulásának, a szer még nem lehet jelen a sejtekben a kívánatos koncentrációban. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy az olyan állatokból származó szíveken, amelyekben előzetesen vaszkuláris nitrát tolerancia alakult ki, egyik nitroglicerinnel kezelés sem mérsékelte az infarktus méretet. Ezek az eredményeink azt sugallják, hogy a nitroglicerinnel alkalmazása közvetlenül a reperfúzió visszaállítását

megelőzően mérsékelheti az infarktus méretét, s áttételesen a későbbi szövődményeket, aminek klinikai jelentősége is lehet.

Sajnálatos módon az utóbbi években a Szegedi Tudományegyetem Állatházában ismételten kiújuló fertőzések miatt (melyek egyébként mára a tenyésztés megszüntetéséhez vezettek) a kísérleti állatok beszerzése meglehetősen drágává és nehézkessé vált. Ezért a nitroglicerinnel kardioprotektív hatásának mechanizmusát szívizom sejt kultúrákon szeretnénk volna megvizsgálni. A kezdeti kísérletek biztatóan alakultak, úgy tűnt, hogy a sejtes modellben is az izolált szíven látott protektív hatást fogjuk tapasztalni, azonban többszöri ismétlést követően kiderült, hogy a nitroglicerinnel hatásának reprodukálhatósága igen rossz, ezért a mechanizmus farmakológiai megközelítéssel történő vizsgálatára a sejtes módszer nem alkalmas, így ezt a vonalat leállítottuk. Megvizsgáltuk viszont a nitroglicerinnel perfundált szívekben a STAT3 foszforilációs szintjét, valamint a szöveti nitro-tirozin mennyiségét, azonban egyik paraméterben sem találtunk különbségeket a csoportok között.

A fenti eredmények alapján egy kézirat publikálásra került, egy elkészítése pedig a korai fázisában tart.

3. A pályázat következő célkitűzése volt megvizsgálni, hogy a vaszkuláris nitrát tolerancia kifejlődése során a reperfüziós károsodást mérséklő új eljárás, az iszkémiás poszt-kondicionálás, megőrzi-e kardioprotektív hatását. A kérdés vizsgálata klinikai jelentőséggel bír (*Csont T. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010*).

Kontroll és vaszkuláris nitrát-toleranciának kitett állatokból szíveket izoláltunk és ex vivo oxigenizált Krebs-Henseleit perfúziós oldattal perfundáltunk Langendorff szerint állandó hidrosztatikai nyomással. A szíveket ekvibrációt követően 30 perc koronária leztorításnak, majd 120 perc reperfüzióval tettük ki. Egy-egy csoportban a reperfüzió kezdetekor 10<sup>''</sup> reperfüzió + 10<sup>''</sup> iszkémia ciklusait alkalmaztuk 6-szor ismételve az iszkémiás poszt-kondicionálás kiváltása céljából. A perfúziós protokoll végén trifenil-tetrazolium-kloridos festés segítségével meghatároztuk a szívekben kifejlődő infarktus mértékét. Azt tapasztaltuk, hogy a nem-toleráns állatokból származó szíveken az iszkémiás poszt-kondicionálás szignifikánsan mérsékelte az infarktus méretét, azonban az olyan állatokból származó szíveken, amelyekben előzetesen vaszkuláris nitrát tolerancia alakult ki, az iszkémiás poszt-kondicionálás jelensége nem volt megfigyelhető (*Fekete et al., J Cardiovasc Pharmacol. 2013*).

Mivel több kutatócsoport szerint a reperfüziós károsodás enyhítésében komoly szerepet játszanak a RISK (Reperfusion-Induced Salvage Kinases) jelátviteli útvonal tagjai, ezért külön kísérletekben megvizsgáltuk ezeknek a kinázoknak az aktiválódását modellünkben. Azonban a poszt-kondicionálás sem a nem-toleráns, sem a toleráns csoportokban nem változtatta meg egyik általunk vizsgált RISK kináz és down-stream targetjük (Akt, Erk 1-2, eNOS) foszforilációját sem, valamint a nitrát toleranciának sem volt hatása a RISK útvonalra (*Fekete et al., J Cardiovasc Pharmacol. 2013*). Később az úgynevezett SAFE kardioprotektív útvonal tagjának, a STAT3-nak az aktiválódását is vizsgáltuk, ám itt sem találtunk szignifikáns különbségeket a csoportok között.

Emellett a poszt-kondicionálás kiváltásának lehetséges alternatíváit is teszteltük, mivel az iszkémiás poszt-kondicionálás során nehezen kontrollálható, hogy a reperfüzió valóban bekövetkezik-e, holott ez kulcsfontosságúnak tűnik a beavatkozás hatékonyságához. Ezért izolált szíveken megvizsgáltuk, hogy a reperfüzió kezdetén alkalmazott nagyfrekvenciás ingerlés (600 ütés/perc), az iszkémiás poszt-kondicionáláshoz hasonlóan képes-e az infarktus

méretet csökkenteni. Eredményeink azt mutatták, hogy a nagyfrekvenciás ingerléssel létrehozott prekondicionálás is hatékonyan mérsékelte a szívizomelhalást.

Külön kísérletsorban megvizsgáltuk azt is, hogy a prekondicionálás kardioprotektív hatása megtartott-e a szívben krónikus urémia állapotában, amiről ugyancsak ismert hogy számos szisztémás metabolikus változással jár együtt (valamelyest hasonlóan a nitrát toleranciához, mely bizonyos szövetekben ugyancsak jelentős változásokat idéz elő egyes biokémiai folyamatokban). Azt tapasztaltuk, hogy bár a hosszú ideig fennálló urémia sok metabolikus markert szignifikánsan megváltoztatott, a prekondicionálás infarktus méretre gyakorolt hatását nem befolyásolta (*Kocsis et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012*).

A fenti eredményekből nemzetközi szakfolyóiratban megjelent 2 közlemény, elfogadásra került egy további kézirat, és egy másik kézirat írása folyamatban van. Emellett az eredményeket bemutattuk nemzetközi és hazai szakmai konferenciákon is (pl. Kyotóban megrendezett International Society for Heart Research világkongresszuson; a Magyar Kardiológusok Társasága éves kongresszusa). A projektekbe bekapcsolódó TDK hallgatók két szakdolgozatot nyújtottak be és védtek meg, valamint sikerrel szerepeltek helyi, valamint az Országos Tudományos Diákköri Konferencián (első helyezés). Továbbá a projektekbe bekapcsolódó egyik TDK hallgató (Pipicz Márton, aki időközben PhD hallgatóként is résztvevő kutatója lett a projektnek) az Országos Tudományos Diákköri Tanácstól „Pro Scientia” Aranyérmét, a vezető kutató pedig Mestertanár Aranyérem elismerésben részesült.

## **Közlemények:**

### **Cikk**

Fekete V; Murlasits Z; Aypar E; Bencsik P; Sárközy M; Szénási G; Ferdinandy P; Csont T. Myocardial postconditioning is lost in vascular nitrate tolerance. JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY. POST ACCEPTANCE, 10 May 2013, doi: 10.1097/FJC.0b013e3182993ae0

Sarkozy M, Zvara A, Gyemant N, Fekete V, Kocsis GF, Pipis J, Sz Cs G, Csonka C, Puskas LG, Ferdinandy P, Csont T. Metabolic syndrome influences cardiac gene expression pattern at the transcript level in male ZDF rats. CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY 12:(1) p. 16. 2013

Kocsis GF, Sárközy M, Bencsik P, Pipicz M, Varga ZV, Paloczi J, Csonka C, Ferdinandy P, Csont T. Preconditioning protects the heart in a prolonged uremic condition. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY. 303(10):H1229-36. 2012

Csont T. Nitroglycerin-induced preconditioning: interaction with nitrate tolerance. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 298:(2) pp. H308-H309. 2010

Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P. Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. BASIC RES CARDIOL;105(5):643-50. 2010

T. Csont, Z. Murlasits, D. Ménesi, J.Z. Kelemen, P. Bencsik, V. Fekete, G. Szénási, L. G. Puskás, P. Ferdinandy. Differential effects of vascular nitrate tolerance on the gene expression pattern of rat heart and aorta. (in preparation), 2013

**Abstract:**

Zoltán V. Varga, Gabriella F. Kocsis, Márton Pipicz, Péter Ferdinandy, Tamás Csont  
Rapid Ventricular Pacing-Induced Postconditioning Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury:  
The Role of Peroxynitrite. ISHR European Section Meeting 2011, Haifa, Israel

Varga Zoltán, Kocsis F. Gabriella, Pipicz Márton, Ferdinandy Péter, Csont Tamás. A gyors kamrai paceléssel kiváltott poszt kondicionálás csökkenti az infarktus méretét és a reperfüziós aritmiák gyakoriságát izolált patkányszíven. Magyar Kardiológusok Társasága Kongresszusa 2011, Balatonfüred

Csont T, Fekete V, Murlasits Z, Aypar E, Bencsik P, Sarkozy M, Varga ZV, Ferdinandy P. Myocardial postconditioning is lost in vascular nitrate tolerance. Cardiovasc Res. 93 (Suppl 1): S72-S72. 2012. Frontiers in CardioVascular Biology, London, UK

**Szakdolgozat:**

Pipicz Márton: A reperfüzió kezdetén alkalmazott periodikus gyors kamrai ingerlés csökkenti az iszkémia reperfüziós károsodást: a peroxinitrit szerepe., SZTE ÁOK Biokémiai Intézet; Témavezető: Csont T., 2012

Békefi László: A poszt kondicionálás kardioprotektív hatása: a vaszkuláris nitrát-tolerancia szerepe. SZTE ÁOK Biokémiai Intézet; Témavezető: Csont T., 2011