

A peroxinitrit - mátrix metalloproteináz és az eritropoetin receptor szignalizációs jelút iszkémiás szívbetegségben

Dr. Kiss Krisztina

Ph.D. Tézis (összefoglaló)

Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudomány Kar,
Biokémiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Bencsik Péter, PhD, Dr. Csont Tamás, PhD

Szeged

2017

A tézishez kapcsolódó tudományos közlemények

- I. Peter Bencsik, Viktor Sasi, **Krisztina Kiss**, Krisztina Kupai, Marton Kolossvary, Pal Maurovich-Horvat, Tamas Csont, Imre Ungi, Bela Merkely and Peter Ferdinandy: *Serum lipids and cardiac function correlate with nitrotyrosine and MMP activity in coronary artery disease patients*, Eur. J. Clin. Invest. 45 (2015) 692–701
IF: 2,687
- II. **Krisztina Kiss***, Csaba Csonka*, János Pálóczi, Judit Pipis, Anikó Görbe, Gabriella F Kocsis, Zsolt Murlasits, Márta Sárközy, Gergő Szűcs, Christopher P Holmes, Yijun Pan, Ashok Bhandari, Tamás Csont, Mehrdad Shamloo, Kathryn W Woodburn, Péter Ferdinandy, Péter Bencsik: *Novel, selective EPO receptor ligands lacking erythropoietic activity reduce infarct size in acute myocardial infarction in rats*, Pharm. Res. 113 (2016) 62-70
*Megosztott első szerzők.
IF: 4,816

A tézishez nem kapcsolódó tudományos közlemények

- I. **Krisztina Kiss**, Veronika Fekete, János Pálóczi, Márta Sárközy, Zsolt Murlasits, Judit Pipis, Irina A. Kheifets, Julia L. Dugina, Svetlana A. Sergeeva, Oleg I. Epstein, Csaba Csonka, Tamás Csont, Péter Ferdinandy, Péter Bencsik: *Renin-Angiotensin-Aldosterone Signaling Inhibitors—Losartan, Enalapril, and Cardosten—Prevent Infarction-induced Heart Failure Development in Rats*, Altern. Ther. Health. Med. 22(2) (2016) 10-7
IF: 1,327
- II. Brockhoff B, Schreckenber R, Forst S, Heger J, Bencsik P, **Kiss K**, Ferdinandy P, Schulz R, Schlüter KD: *Effect of nitric oxide deficiency on the pulmonary PTHrP system*, J. Cell. Mol. Med. (2016) doi: 10.1111/jcmm.12942
IF: 4,938

Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek epidemiológiája

Európában a kardiovaszkuláris betegségek felelősek az összhalálozás közel 45 százalékáért, ami több mint négy millió emberélet elvesztését jelenti évente. A kardiovaszkuláris betegségeken belül a koszorúér betegségek képviselik a legnagyobb hányadot. Ezen epidemiológiai adatok alátámasztják a jelenleg is intenzíven folyó kardiovaszkuláris kutatások relevanciáját.

A koszorúér betegség és a miokardiális iszkémia patomechanizmusa és rizikó faktorai

Az érlemezsedést (ateroszklerózist) és fő következményét, a koszorúér betegséget, jelenleg krónikus gyulladással betegségnek tekintjük. A fehérvérsejtek az artériák endotél sejtjeihez kitapadva beindítják a gyulladással kaszkádot és a kalcifikációt, így létrehozva az ateroszklerotikus plakkot. A koszorúerek ateroszklerotikus plakkjának ruptúrája szívizom iszkémiához vagy akár akut miokardiális infarktushoz (AMI) vezethet. A koszorúér betegség

komplex patomechanizmusa mellett egyéb rizikótényezők (pl. a dohányzás) és társbetegségek (pl. a hiperlipidémia) befolyásolják a betegség klinikumát. A dohányzás szerepet játszik a kardiovaszkuláris halálozások közel 20 százalékában, férfiakban. A diszlipidémia magas össz-, és LDL- koleszterin, illetve triglicerid szinttel és egyidejűleg alacsony HDL- koleszterin szinttel társul. Az ateroszklerózis és a koszorúér betegség kialakulásához hozzájárul a megnövekedett nitrotirozin (NTyr) képződés is hiperkoleszterinémiás betegekben.

A koszorúér betegség és az AMI diagnosztikus biomarkerei és farmakológiai kezelése

A szérumban lévő lipid értékek (össz-, LDL-, HDL- koleszterin, triglicerid szint) az ateroszklerózis prediktív markereiként használhatók, míg a kardiális troponinok vagy a kreatin-kináz MB izoformája az AMI diagnózisának jelenleg elérhető legjobb biomarkerei. A rizikófaktorok csökkentése a prevenció elengedhetetlen része a koszorúér betegekben (hiperlipidémia kezelése sztatinokkal). Az AMI kezelésére használt gyógyszerek jelenleg a β -receptor blokkolók, angiotenzin-konvertáz-enzim (ACE) gátlók, nitroglicerint, stb. Ennek ellenére az AMI kezelésében a perkután koronária intervenció (PCI) az elsőként választandó eljárás az infarktus méretének csökkentésére. A nagy számú elérhető biomarker és gyógyszer ellenére az AMI prognózisát továbbra is nehéz megbecsülni és továbbra sincs olyan gyógyszer, ami az akut miokardiális infarktus méretét csökkentené. Ezért továbbra is szükség van új molekulák karakterizálására, új kardioprotektív terápiai lehetőségek fejlesztésére, amik segíthetik a koszorúér betegség diagnózisát, terápiáját, illetve prognózisának meghatározását.

Szignalizációs jelutak további analízise koszorúér betegségben és miokardiális iszkémiában

❖ A nitro-oxidatív stressz szerepe

A nitro-oxidatív stressz számos kardiovaszkuláris betegség, többek között az iszkémiás szívbetegség (ISZB) patomechanizmusában is szerepet játszik. A nitro-oxidatív stressz központi molekulája a peroxinitrit (ONOO^-), ami szabadgyököket formál, és ezáltal további patológiai reakciókban, kóros enzimaktivációban vesz részt. Aktiválja többek között S-nitrozilációt keresztül a mátrix-metalloproteinázokat (MMP). A peroxinitrit továbbá nitrotirozint (NTyr) képez a szabad tirozin oldalláncokkal, ami a nitroztatív stressz mérhető markere.

❖ A mátrix metalloproteinázok szerepe

A mátrix metalloproteinázok kalcium- és cink-dependens endopeptidázok, melyek szerepet játszanak a tumor metasztázisok képzésében, illetve gyulladásban és a kardiovaszkuláris betegségekben. A szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló MMP-k a zselatinázok közé tartozó MMP-2 és -9, melyeknek fontos szerepük van a miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodásban. Kutatások igazolják, hogy a szérumban lévő MMP-2 jelezheti az infarktus méretét és a

kamrai diszfunkció mértékét ST-elevációs miokardiális infarktuszban (STEMI). Az MMP-2 és az MMP-9 aktiválódása nem csak proteolízis, hanem poszttranszlációs módosítások útján is történhet, amiben a peroxinitrit is nagy szerepet játszik. A koszorúér betegségben szenvedő egyének között a szérumban nitro-tirozin és az MMP-2 és -9 aktivitása közötti korreláció még nem ismert. Továbbá, a szérumban nitro-tirozin, az MMP-k és a szérumban lipid értékek közötti korrelációs kapcsolat nem egységes az irodalomban.

❖ ***Az eritropoetin- indukált protektív jelutak szerepe***

Az eritropoetin (EPO) és hosszú féléletű analógja, a darbepoetin alfa (Dpa) az anémia kezelésében használatos gyógyszerek. Emellett az EPO egy pleiotróp citokin és EPO receptorok (EpoR) találhatóak többek között a szívizomsejtekben is. Az oxidatív stressz indukálja a heterodimer EPO receptorok (EpoR- β cR) kialakulását, ezen keresztül pedig az EPO különböző citoprotektív jelutakat indít el, hozzájárulva így a nitro-oxidatív stressz csökkentéséhez, és a szívizom iszkémia elleni védelméhez. Továbbá az EPO csökkenti az MMP-2 és -9 expresszióját, így képes megelőzni a kollagének és az extracelluláris mátrix degradációját az iszkémiás szívizomban.

❖ ***Nem-eritropoetikus EPO analógok szerepe a miokardiális iszkémia ellen***

Az EPO és a Dpa képes csökkenteni a miokardiális infarktus méretét és javítani a szívizom pumpafunkcióját koronária okklúziót követően állatmodellekben. Az ígéretes preklinikai vizsgálatokra alapozva az EPO-t és a Dpa-t klinikai kísérletekben is vizsgálták az AMI, illetve a szívelégtelenség kezelésében. A klinikai vizsgálatokban azonban az EPO és a Dpa nem csökkentette az infarktus méretét, továbbá olyan thrombotikus mellékhatásokat eredményezett, amik az összhalálozást növelték a vizsgált betegpopulációban, feltehetően a hemopoetikus aktivitás miatt.

Ezért kifejlesztettek olyan nem-hematopoietikus EPO analógokat, mint az aszialoeritropoetin (aszialoEpo) vagy a karbamilált EPO (CEPO), amik az EpoR-mediált protektív hatásokat megőrzik a hemopoézis indukálása nélkül. Ezek az analógok kizárólag a heterodimer EpoR- β cR receptorhoz kötődnek, ami a protektív jelutakat aktiválja, a homodimer EpoR-hoz nem, ami a hemopoézist indítaná be. Az aszialoEpo és a CEPO az EPO módosított analógjai, ezért potenciális antigenitásuk a klinikai gyakorlatban nem elhanyagolható. Ezzel szemben kis peptid analógok csökkenthetik az antigenitást és megfelelő alternatívák lehetnek az EpoR-mediált kardioprotekcióban.

Célkitűzés

A fentiek ismeretében jelen kísérletünk célja

- 1) az ONOO⁻ – MMP jelút korrelációinak karakterizálása elektív PCI-ra kerülő egy-ér koronária betegekben a következők meghatározásával:
 - a szérum nitrotirozin és az MMP-2 és MMP-9 aktivitása közötti korreláció;
 - a szérum lipidek (össz-, LDL- és HDL- koleszterin; triglicerid) és a szérum nitrotirozin, illetve az MMP-2 és MMP-9 aktivitása közötti korreláció;
 - a szérum nitrotirozin, az MMP-2, MMP-9 aktivitás és a bal kamrai ejekciós frakció (LVEF), mint a szívizomfunkció markere közötti korreláció;
 - szérum nitrotirozin, és az MMP-2 és MMP-9 aktivitás különbsége sztatin-naív és sztatinnal kezelt páciensek között;
 - szérum nitrotirozin, és az MMP-2 és MMP-9 aktivitás különbsége nem dohányzó és dohányzó páciensek között
 - további korrelációk a vesefunkciós paraméterek és a nitrotirozin szint, és az MMP aktivitások között.

- 2) az EpoR-mediált kardioprotekció vizsgálata két új, szelektív EPO receptor ligand peptiddel (AF41676 és AF43136) AMI patkány modelljében a következők meghatározásával:
 - az EPO citoprotektív hatása izolált neonatális kardiomiocitákon
 - az EPO és a Dpa infarktus méret csökkentő hatása *in vivo*
 - a nem-eritropoetikus hatású AF41676 és az AF43136 molekulák infarktus méret csökkentő hatása *in vivo*.

Anyagok és módszerek

Az ONOO⁻ és az MMP-k korrelációinak karakterizálása koszorúér betegekben

Betegpopuláció és vérminta gyűjtés

A kísérlet során elektív PCI-ra kerülő egy-ér koronária betegekből álló populációt vizsgáltunk. A kísérlet etikai engedély birtokában, a páciensek írásos beleegyezésével történt. A beválasztási kritériumok a következők voltak: 1) II vagy III fokú stabil angina pectorisz a Kanadai Kardiovaszkuláris Társaság osztályozása szerint, 2) Egy-ér koronária betegség angiogrammal meghatározott $\geq 70\%$ -os szűkülettel. A kritériumok alapján 36 páciens vizsgáltunk. A PCI előtt szívultrahang vizsgálat történt a szívizomfunkció monitorozására. A PCI előtt 5 perccel a páciensektől vérmintát gyűjtöttünk a rutin laborparaméterek és a

peroxinitrit szint, illetve az MMP-k aktivitásának meghatározására. A PCI a femoralis artérián keresztül, aspirin és clopidogrel előkezelés után történt.

A rutin laborparaméterek meghatározása

A szérum össz-, LDL-, HDL- koleszterin, a triglicerid, a kreatinin és az urea nitrogén szint enzimátikus módszerrel az SZTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetében került meghatározásra.

Az MMP-2 és az MMP-9 aktivitásának mérése zselatin zimográfiával

Az MMP-2 és MMP-9 aktivitásnak mérése zselatin zimográfiával, vérszérum mintákból történt. 8%-os poliakrilamid gélt zselatinnal kopolimerizáltattuk, és 40 µg fehérjét vittünk fel a gél 1-1 zsebébe. A fehérjék elektroforetikus elválasztása után a géleket Triton X-100 detergenssel mostuk, majd 20 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk az enzimek aktivitásához szükséges puffer oldatban. A géleket Coomassie-kékkel festettük. Pozitív kontrollként humán MMP-2 és MMP-9 tartalmú gyári standard elegyet használtunk. Negatív kontrollként szérum mintákat tartalmazó külön gélseletet kalcium-keletor jelenlétében inkubáltunk. A zselatinolitikus aktivitás a géleken a sötétkék háttérben transzparens sávként jelent meg. A sávok területét és intenzitását értékeltük, az értékeket önkényes egységekben fejeztük ki.

A szérum nitrotirozin szint mérés ELISA módszerrel

A szisztémás peroxinitrit képződés markereként a szérummintákból a szabad nitrotirozin szintet mértük ELISA módszerrel. A mintákat deproteinizáltuk és nitrotirozin elleni antitesttel, illetve nitrotirozin acetilkolin-észterázzal borított plate-eken inkubáltuk egész éjszakán keresztül, majd Ellmans-reagenssel reagáltattuk. A szérum nitrotirozin szintet ng/ml-ben fejeztük ki.

A szívizomfunkció mérése

A PCI előtt a pácienseknél szívultrahang vizsgálat történt GE Vivid 3 ultrahang készülékkel, 3,5-MHz-es transzducerrel. A felvételek standard apikális és parasternalis, két és négy üregi nézetben készültek. Az ejekciós frakciót Simpson módszerrel kalkuláltuk.

Az EpoR-mediált kardioprotekció vizsgálata

A kísérletek etikai engedély (US National Institutes of Health, No. 85-23, 1996) birtokában történtek.

Állatok és tesztanyagok

A kísérletekhez hím Wistar patkányokat (225–370 g) használtunk. A tesztanyagokat (az acetátos vivőanyaggal együtt) az Affymax Inc. állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre, kivéve az eritropoetint (Procrit®, Amgen, Inc.), a darbepoetin alfát (Aranesp®, Amgen

Europe), a B-típusú natriuretikus peptidet (BNP; Sigma-Aldrich) és a ciklosporin A-t (CsA; Sandimmun Neoral®, Novartis Hungária).

A nem-eritropoetikus EPO receptor ligandok karakterizálása

A két szelektív EPO receptor ligand dimer peptidet (AF41676 és AF43136) az Affymax Inc. szintetizálta és tesztelte az előkísérletek során. A tesztanyagok eritropoetikus aktivitását a kulcs aminosavak módosításával csökkentették. Az AF41676 aminosav sorrendje: (AcYACHYGPITNaVCQPPK)₂-IDA (SS:C3-C12), az AF43136 aminosav sorrendje: (AcLYLCRYGRVHNalECQPLRK)₂-DIG (SS:C4-C13). NaI= naftilamin. Az EPO, a Dpa, az AF41676 és az AF43136 EPO receptorhoz történő kötődést receptor kötési módszerrel vizsgálták. Humán EPO receptorokat (HuEpoR-Fc) inkubáltak a tesztanyagok különböző hígításaival és 20,000 cpm ¹²⁵I izotóppal jelzett EPO-val, majd EPO-elleni antitestekkel. Az eritroid kolónia formáló képesség vizsgálatához humán CD34⁺ sejteket inkubáltak EPO, Dpa, AF41676 vagy AF43136 jelenlétében és a több mint 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számlálták. Az eritropoézis stimuláló hatás vizsgálatához egy intravénás (iv.) dózis EPO-t (5000 U/kg), Dpa-t (10 µg/kg), AF41676-ot (10 mg/kg), AF43136-ot (10 mg/kg) vagy vivőanyagot (5 ml/kg) adtak normocitemiás patkányoknak. A retikulocita számot az anyagok beadása előtt, illetve 5 nappal utána határozták meg.

Kísérleti elrendezés

Az EPO citoprotektív hatását szimulált iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált patkány szívizomsejt kultúrán vizsgáltuk. Ezt követően négy kísérletben (kísérlet 1-4) vizsgáltuk az infarktusméret csökkentő hatását az EPO-nak és az EPO analógoknak (Dpa, AF41676 és AF43136) a reperfúzió előtt adva *in vivo* AMI patkány modelljében.

Az EPO direkt kardio-citoprotektív hatásának vizsgálata

Ahhoz, hogy az EPO direkt, nem-eritropoetikus hatását vizsgáljuk, újszülött patkányokból izolált szívizomsejt kultúrákat 150 perc szimulált iszkémiának, majd 120 perc szimulált reperfúzióknak tettünk ki, és különböző dózisu EPO-val (1, 10, 100, 500 U/ml) kezeltük. Pozitív kontrollként BNP-t használtunk 10⁻⁸M dózisban. A sejtelhalást az acetátos vivőanyaggal kezelt csoporthoz viszonyítottuk.

Az EPO és az EPO analógok infarktus méret csökkentő hatásának vizsgálata

Az *in vivo* kísérletekben (kísérlet 1–4) az állatokat véletlenszerűen csoportokba osztottuk és a kísérletek alatt regisztráltuk a csoportokon belüli összhalálozást. *Kísérlet 1:* Az EPO-t 5000 U/kg bólus injekcióban adtuk 5 perccel a reperfúzió előtt intraperitoneálisan (ip.) vagy iv. annak érdekében, hogy a két beadási mód hatását összehasonlítsuk. Pozitív kontrollként a BNP-t használtuk 10 nmol/kg bólus+2 nmol/kg/perc iv. infúzióban 15 percig az iszkémia 25. percétől.

Az acetátos vivőanyagot, mint negatív kontrollt, 5 perccel a reperfúzió előtt adtuk iv. *Kísérlet 2:* Ahhoz, hogy a hosszú féléletidejű EPO analóg Darbepoetin alfa dózis-hatását vizsgáljuk, a Dpa-t az iszkémia 15. percében adtuk 2,5, 5, 15 és 25 µg/kg bólusban iv. A pozitív kontroll BNP-t és a negatív kontroll acetátos vivőanyagot a Kísérlet 1-gyel megegyező módon adtuk. *Kísérlet 3:* Az AF4176 dózis-hatásának vizsgálatára a tesztanyagot 0,3, 1, 3, 10 és 20 mg/kg iv. bólusban 5 perccel a reperfúzió kezdete előtt adtuk. A pozitív és negatív kontroll anyagokat azonos módon adtuk, mint a Kísérlet 1-ben. *Kísérlet 4:* Az AF43136-ot két dózisban teszteltük, hogy a potenciálisan hipotenzív hatását vizsgáljuk. A tesztanyagokat 10 és 30 mg/kg iv. bólus infúzióban adtuk 5 percen keresztül az iszkémia 25. percétől kezdve. A pozitív kontroll CsA-t (10mg/kg), és vivőanyagát (fiziológiás sóoldat), valamint az acetátos vivőanyagot a tesztanyaggal azonos módon adtuk.

Szimulált iszkémia/ reperfúzió izolált neonatális szívizomsejt kultúrán

Az újszülött patkányok szíveit izoláltuk és tripszin oldatban emésztettük. A fibroblasztok eliminációja után a szívizomsejteket 24-lyukú plate-eken (10^5 sejt/cella), 1 ml növesztő médiumban tenyésztettük és normoxiás körülmények között inkubáltuk (37°C, 95% levegő és 5% CO₂ gázkeverék). A szöveti iszkémia előidézésére hipoxiás kamra (37°C, 95% N₂ és 5% CO₂) és hipoxiás oldat kombinációját használtuk 150 percen keresztül. A sejteket EPO, BNP vagy acetátos vivőanyag kezelésnek tettük ki a hipoxia ideje alatt. A kezelést követően 120 perc reperfúzió következett növesztő médiumban és normoxiás inkubátorban. A kísérlet végén tripánkék festéssel viabilitási tesztet végeztünk. A sejteket Bürker kamrában számoltuk és az elhalt (kék) sejtek arányát az össz-sejtszám ismeretében határoztuk meg.

Az akut miokardiális infarktus in vivo patkány modellje

A patkányokat pentobarbitállal altattuk és lélegeztettük. A kísérlet alatt a vérnyomást, standard 3 végtagi EKG-t és a testhőmérsékletet monitoroztuk. A hemodinamikai adatokat a kísérlet elején, az iszkémia 29. percében és a reperfúzió 120. percében regisztráltuk. A jobb femoralis artériát kanüláltuk a tesztanyagok beadása céljából. A mellkas megnyitása után a bal leszálló koronáriát 30 percre leszorítottuk (iszkémia), majd 120 perc reperfúzió következett. A reperfúzió végén a szíveket izoláltuk, az infarktus méretét trifeniltetrazolium-klorid (TTC) festéssel határoztuk meg. A kiértékeléshez digitális planimetriát használtunk (InfarctSize™ 2.5 verző, Pharmahungary, Szeged). A rizikózónát a bal kamra területének arányában, az infarktus méretét a rizikózóna arányában határoztuk meg.

Statisztika

Az adatokat az átlag ± standard deviáció (SD), illetve az átlag szórása (SEM) értékekkel fejeztük ki, szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékeket vettük. A korrelációs analízis a Pearsons

korrelációs koefficiens, a bootstrap konfidencia intervallum és lineáris regressziós analízis segítségével történt. A különböző csoportok összehasonlítására két mintás t-próbát, illetve varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. A halálozást Khi-négyzet próbával, illetve azt követő Fisher-féle egzakt teszttel határoztuk meg.

Eredmények

Az ONOO⁻ és az MMP-k korrelációinak karakterizálása koszorúér betegekben

A szérum nitrotirozin és az MMP-2 és MMP-9 aktivitása közötti korreláció

Az MMP-9 aktivitás pozitívan korrelált a szérum nitrotirozin szinttel ($r= 0,535$, $p= 0,010$); míg a nitrotirozin és az MMP-2 aktivitása között nem volt szignifikáns korreláció.

A szérum lipidek és a nitrotirozin, illetve az MMP aktivitások közötti korreláció

A szérum összkoleszterin, LDL- koleszterin és triglicerid szint pozitívan, ($r= 0,582$, $p= 0,003$; $r= 0,552$, $p= 0,008$; $r= 0,471$, $p= 0,023$), míg a HDL- koleszterin negatívan ($r= -0,455$, $p= 0,033$) korrelált a szérum nitrotirozinnal. A szérum MMP-2 aktivitás pozitívan korrelált az össz- és az LDL- koleszterin szinttel, ($r= 0,550$, $p= 0,015$ és $r= 0,448$, $p= 0,028$); habár a triglicerid szint és a HDL- koleszterin szint nem mutatott szignifikáns korrelációt az MMP-2 aktivitással. A szérum lipidek egyike sem korrelált az MMP-9 aktivitással.

A szívizomfunkció és a nitrotirozin, illetve az MMP aktivitások közötti korreláció

A szérum nitrotirozin szint negatívan korrelált az ejekciós frakcióval ($r= -0,548$, $p= 0,010$). Az MMP-2 aktivitás és az ejekciós frakció nem mutatott korrelációt, míg az MMP-9 aktivitás szintén negatívan korrelált a szívizom funkcióval ($r= -0,732$, $p= 0,0002$). A negatív korreláció arra utal, hogy a csökkent szívizom funkció emelkedett nitrotirozin szinttel és MMP-9 aktivitással társul.

A szérum nitrotirozin, illetve az MMP aktivitások a sztatinnal kezelt betegekben

A 36 vizsgált páciens közül 15 részesült sztatin kezelésben a kísérlet alatt. A sztatinnal kezelt csoportban a szérum nitrotirozin szint szignifikánsan alacsonyabb volt a sztatinnal nem kezelt (sztatin-naív) csoporthoz képest ($13,6 \pm 5,1$ ng/ml vs. $23,5 \pm 4,5$ ng/ml; $p < 0,05$). Az MMP-2 és az MMP-9 aktivitás nem mutatott szignifikáns különbséget a sztatinnal kezelt és a sztatin-naív csoportban.

A szérum nitrotirozin, illetve az MMP aktivitások a dohányzó betegekben

A kísérlet alatt 11 páciens volt aktív dohányos, míg 17 páciens soha nem dohányzott. A szérum nitrotirozin szint nem volt szignifikánsan különböző a dohányzó és nem dohányzó csoportban. Az MMP-2 aktivitás szignifikánsan emelkedett volt a dohányzó páciensek vérmintáiban a nem dohányzókéhoz képest. ($45,5 \pm 8,5$ vs. $22,4 \pm 4,6$ önkényes egység;

$p < 0,05$). Az MMP-9 aktivitás nem volt szignifikánsan különböző a dohányzó és nem dohányzó csoportban.

A vesefunkció és a nitrotirozin, illetve az MMP aktivitások közötti korreláció

Mivel a renális diszfunkció a koronária betegségek egyik komoly komplikációja lehet, vizsgáltuk a vesefunkció és a peroxinitrit–MMP útvonal markerei közötti korrelációkat. A szérumban kreatinin pozitívan korrelált a nitrotirozinnal ($r = 0,422$, $p = 0,036$), azonban az MMP-2 vagy MMP-9 aktivitással nem. Az urea nitrogén szint pozitívan korrelált az MMP-9 aktivitással ($r = 0,423$, $p = 0,035$), azonban az MMP-2 aktivitással vagy a nitrotirozin szinttel nem. A szérumban kreatinin negatívan korrelált az ejekciós frakcióval ($r = -0,503$, $p = 0,009$).

Az EpoR-mediált kardioprotekció vizsgálata

A tesztanyagok eritropoetikus aktivitása

A tesztanyagok eritropoetikus aktivitásának mérését az Affymax Inc. munkatársai vizsgálták (ldd fent). Az EPO, a Dpa és az AF43136 nagy affinitással, ($EC_{50} = 7, 12, 27$ pM), míg az AF41676 mérsékelt aktivitással ($EC_{50} = 1240$ pM) kötődött az EPO receptorhoz. Az EPO és a Dpa a CD34⁺ sejteket nagy hatékonysággal differenciálta eritroid prekursor irányban ($EC_{50} = 2, 14$ pM), míg az AF41676 és az AF43136 esetében ehhez 3-4 nagyságrenddel magasabb mennyiségre volt szükség. A retikulocitózist (az eritropoézis markere) az EPO és a Dpa szignifikánsan stimulálta az acetátos vivőanyaghoz képest ($762 \pm 146, 1056 \pm 104$ vs. $373 \pm 24,3 \times 10^9$; $p < 0,05$), míg az AF41676 és az AF43136 nem mutatott ilyen hatást ($284 \pm 51,3, 286 \pm 57, \times 10^9$ vs. $373 \pm 24,3 \times 10^9$).

Az EPO hatása a sejtelhalásra

Az EPO 100 U/ml dózisban szignifikánsan csökkentette az elhalt sejtek arányát (közel 16%-kal) a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest szimulált iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált neonatális szívizomsejt kultúrán. A pozitív kontroll BNP közel 30%-kal csökkentette az elhalt sejtek arányát.

Az EPO hatása az infarktus méretére és a hemodinamikára (Kísérlet 1)

Az EPO 5000 U/kg dózisban, a reperfúzió kezdete előtt iv. adva szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét (közel 24%-kal) a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest, míg az ip. beadási mód kevésbé volt effektív (közel 11%-os, nem szignifikáns infarktusméret-csökkenés). A pozitív kontroll BNP közel 47%-kal csökkentette az infarktus méretét a vivőanyaghoz képest. A BNP szignifikánsan csökkentette az artériás középnyomást (MABP) az iszkémia alatt,

viszont az EPO nem volt hatással a MABP-ra. A túlélési arányban nem volt különbség a csoportok között.

A Dpa hatása az infarktus méretére és a hemodinamikára (Kísérlet 2)

A Dpa dózis-hatás görbéje 5 µg/kg esetében mutatott maximális infarktus méret csökkentő hatást a vivőanyaghoz képest. A Dpa infarktus méret csökkentő hatása hasonló volt a pozitív kontroll BNP hatásához (mindkettő esetében közel 33%). A Dpa többi dózisének hatása között nem volt szignifikáns különbség a vivőanyaghoz viszonyítva. A BNP és a Dpa 5 µg/kg dózisa szignifikánsan csökkentette a MABP-t az iszkémia alatt, míg a Dpa 15 µg /kg dózisa a MABP-t szignifikánsan növelte a reperfúzió végére a vivőanyaghoz képest. A túlélési arányban nem volt különbség a csoportok között.

Az AF41676 hatása az infarktus méretére és a hemodinamikára (Kísérlet 3)

Az AF41676 dózis-hatás görbéjén a 0,3, 1, 3 és 10 mg/kg dózisek szignifikánsan csökkentették az infarktus méretét, ezen belül is a 3 mg/kg volt a leghatékonyabb a vivőanyaghoz képest (közel 46%-os csökkentés). A BNP, mint pozitív kontroll szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét, közel 25%-kal. A BNP és a 10 és 20 mg/kg AF41676 csökkentette a MABP-t az iszkémia alatt a vivőanyaghoz képest. Az AF41676 20 mg/kg dózisa csökkentette a szívfrekvenciát az iszkémia 29. percében és a 10 mg/kg dózis csökkentette a MABP-t a reperfúzió végén. Az AF41676 10 és 20 mg/kg átmeneti hipotenzív hatása ellenére a túlélésben nem volt különbség a csoportok között.

Az AF43136 hatása az infarktus méretére, a hemodinamikára és a túlélésre (Kísérlet 4)

Az AF43136 10 mg/kg dózisa szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét, közel 30%-kal, a vivőanyaghoz képest. A 30 mg/kg esetében az infarktus méret adatok nem voltak megbízhatóak a magas halálozás következtében kialakult alacsony elemszám miatt (n=2). A pozitív kontroll CsA szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét, közel 23%-kal, a vivőanyagához képest. Az AF43136 30 mg/kg dózisa szignifikánsan csökkentette a MABP-t az iszkémia alatt, míg a 10 mg/kg növelte a MABP-t a reperfúzió 120. percében a vivőanyaghoz képest. Az AF43136 30 mg/kg dózisa szignifikánsan csökkentette az állatok túlélését a vivőanyaghoz képest.

Diszkusszió

A kísérletek fő eredményeinek összefoglalása

Jelen kísérletek célja az ONOO⁻ – MMP útvonal és az EPO receptor-mediált szignalizációs útvonalak vizsgálata volt iszkémiás szívbetegségben. Kísérleteink során a szérum nitro tirozin pozitívan korrelált az MMP-9 aktivitással viszont az MMP-2-vel nem. Átfogó vizsgálatot

készítettünk a szérumban NTyr, az MMP-2, az MMP-9 és a lipid panel egyes komponensei közötti korrelációs kapcsolatokról. Negatív korrelációt találtunk a NTyr, az MMP-9 aktivitás és a szívfunkció között. A sztatin kezelés vagy az aktív dohányzás hatással volt a szérumban NTyr szintre, illetve az MMP-k aktivitására. Végül korrelációs összefüggéseket találtunk a NTyr, az MMP-k aktivitása és a szívműködés, illetve a vesefunkciós paraméterek között.

Megerősítettük, hogy az EPO-indukált citoprotekció független az eritropoetikus aktivitástól szimulált iszkémia/reperfúzió esetében. Az EPO és a Dpa szignifikánsan csökkentették az infarktus méretét AMI *in vivo* patkány modelljében. A kísérlet fő újdonsága, hogy az AF41676 dózis-függő módon csökkenti az infarktus méretét, illetve az AF43136 is bír infarktusméret-csökkentő hatással, azonban magasabb dózisének súlyos, mortalitást növelő mellékhatása jelent meg.

A szérumban nitrotirozin korrelációja az MMP aktivitásokkal

Kísérletünkben pozitív korrelációt találtunk a szérumban NTyr és az MMP-9 aktivitása között, a NTyr szint és az MMP-2 aktivitás viszont nem mutatott korrelációt. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a peroxinitrit aktiválja az MMP-eket humánban is. Az, hogy a peroxinitrit és az MMP-2 aktivitás között miért nem találtunk korrelációt, még nem teljesen tisztázott. Egyik lehetséges magyarázat, hogy míg az MMP-9 nagy mennyiségben fordul elő a leukocitákban, addig az MMP-2 egy intracelluláris enzim a kontraktilis szövetekben, ami többek között akut miokardiális iszkémia/reperfúzió hatására szabadul fel. Jelen kísérletben a vizsgált páciensek még nem szenvedtek akut iszkémiás károsodást a mintavétel időpontjáig.

A szérumban lipidek korrelációja a nitrotirozinnal és az MMP aktivitásokkal

A hiperlipidémia a kardiovaszkuláris betegségek jól ismert rizikófaktora. Kísérletünkkel kimutattuk, hogy a NTyr pozitívan korrelál az össz- és az LDL-koleszterin, illetve a triglicerid szinttel, és negatívan korrelál a HDL-koleszterinnel. Korábbi kísérletek szintén alátámasztják a NTyr és az LDL-koleszterin pozitív korrelációját hiperkoleszterinémias betegekben. Jelen kísérletünkben az MMP-2 aktivitás és az össz- és LDL-koleszterin szint között pozitív korrelációt találtunk, viszont az MMP-2 aktivitás és a HDL-koleszterin, illetve a triglicerid szint között nem tudtunk korrelációt kimutatni. Irodalmi ismereteink szerint eddig egyetlen klinikai kísérletben sikerült negatív korrelációt kimutatni a szérumban MMP-2 aktivitás és a HDL-koleszterin szint között koronária betegekben. Kísérletünkben az MMP-9 aktivitás és a lipid panel értékei között nem találtunk korrelációt. Ezzel szemben két korábbi kísérletben koronária betegekben az MMP-9 szint pozitívan korrelált az LDL-koleszterinnel és a trigliceriddel, igaz ezek a kísérletek az MMP-9 aktivitását nem vizsgálták.

A szívizomfunkció korrelációja a nitrotirozinnal és az MMP aktivitásokkal

Kísérletünkkel az irodalomban elsőként írtuk le, hogy a szívizomfunkció markere, a bal kamrai ejekciós frakció negatívan korrelál a nitrotirozin szinttel koronária betegekben. Ez alapján feltételezhető, hogy a nitro-oxidatív stressz káros hatással van a szívizomfunkcióra, melyet preklinikai kísérletek is alátámasztanak. Kimutattuk továbbá, hogy az ejekciós frakció negatívan korrelál az MMP-9 aktivitással, az MMP-2 esetében viszont nem találtunk korrelációt. Korábbi kísérletek igazolják, hogy az MMP-2 és az MMP-9 fehérje szérumszintje korrelál az ejekciós frakcióval miokardiális infarktuson átesett, vagy szívelégtelenségben szenvedő betegekben.

A nitrotirozin szint a sztatinnal kezelt páciensekben

A sztatinek az endogén koleszterinszintézis gátlói, melyek képesek csökkenteni a nitro-oxidatív stresszt. Ezt alátámasztandó, kísérletünkben csökkent nitrotirozin szintet találtunk a sztatinnal kezelt koronária betegek szérumában, viszont nem találunk különbséget az sztatín kezeléshez kapcsolódóan az MMP aktivitásokban. Ezzel ellentétben korábbi kísérletek kimutatták, hogy kéthónapos pravastatin kezelés csökkenti az MMP-2 és az MMP-9 aktivitását koronária betegekben.

Az MMP-2 aktivitás dohányzó páciensekben

Jelen kísérletünkben az MMP-2 aktivitása szignifikánsan magasabb volt a dohányzó páciensek szérumában, az MMP-9 aktivitásában viszont nem volt különbség. Korábbi klinikai kísérletekben az MMP-2 és -9 megnövekedett génexpressziós szintjét, illetve magasabb proMMP-2 és proMMP-9 fehérjeszintet találtak dohányzó páciensek vérében, viszont ezekben a kísérletekben az MMP-k aktivitását nem mérték. Annak ellenére, hogy a cigarettafüst tartalmaz peroxinitritet és peroxinitritképző ágenseket, hozzájárulva ezzel a megnövekedett nitro-oxidatív stresszhez, jelen kísérletünkben a peroxinitrit mennyisége nem különbözött a dohányzó páciensek mintáiban a nem-dohányzókéhoz képest.

A vesefunkció korrelációja a nitrotirozinnal és az MMP aktivitásokkal

Korábbi tanulmányok alapján a renális diszfunkció hozzájárul a mortalitáshoz miokardiális infarktuson átesett betegekben. Annak ellenére, hogy urémiás vagy súlyos bal kamrai diszfunkcióban szenvedő betegek nem vettek részt jelen kísérletünkben, a szérum kreatinin és az ejekciós frakció között negatív korrelációt találtunk a vizsgált populációban. Továbbá pozitív korrelációt mutattunk ki a kreatinin és a nitrotirozin szint, illetve az urea nitrogén és az MMP-9 aktivitása között. Eredményeink alapján a megnövekedett nitrotirozin szint és az MMP-9 aktivitás jelezhet kezdődő renális diszfunkciót még a miokardiális infarktus kialakulása előtt.

Az EPO kardioprotektív hatása

Jelen kísérletünkben az EPO, az eritropoetikus hatásától függetlenül védő hatást mutatott szívizomsejteken szimulált iszkémia/reperfúzióval szemben. Ezen eredményeink megerősítik az EPO korábban igazolt citoprotektív és anti-apoptotikus hatását szívizomsejteken. *In vivo* kísérletünkben az intravénásan beadott EPO csökkentette az akut miokardiális infarktus méretét az intraperitoneális beadással ellentétben, patkány modellben. Korábbi kísérletek az intraperitoneálisan adott EPO infarktusméret-csökkentő hatásáról számolnak be. Ezen eltérő eredmények magyarázatai lehetnek a farmakokinetikai különbségek, illetve a kezelés különböző időben történő alkalmazásából származó eltérések.

A Dpa dózis-függő hatása AMI-ban

Az irodalomban elsőként vizsgáltuk a Dpa dózis-hatás görbáját a reperfúzió előtt adva. Az irodalomban a Dpa infarktusméret-csökkentő dózisa meglehetősen széles tartományban mozog (2,5-30 µg/kg). Kísérletünk eredménye alapján a Dpa 5 µg/kg dózisa is elegendő az infarktusméret csökkentéséhez AMI patkány modelljében.

Az AF41676 és az AF43136 kardioprotektív hatása

Jelen kísérletünk egyik fő újdonsága, hogy a két új, nem-eritropoetikus EPO receptor ligand peptid, az AF41676 és az AF43136 csökkenti az infarktus méretét a reperfúzió előtt adva AMI *in vivo* patkány modelljében. Az AF41676 széles dózis spektruma bizonyult hatékonynak (0,3–10 mg/kg). Annak ellenére, hogy az AF41676 magasabb dózisa (10 és 20 mg/kg) csökkentették az artériás vérnyomást, nem befolyásolták a túlélést. Ezzel szemben az AF43136 csökkentette az infarktus méretét 10 mg/kg dózisban, a magasabb dózis beadását követően viszont olyan gyors vérnyomáscsökkenést tapasztaltunk, amely szignifikánsan növelte a letalitást. Az AF41676 és az AF43136 az EPO receptorhoz kötődnek anélkül, hogy az eritropoézist stimulálnák, ezért feltételezhetően az EpoR-mediált citoprotektív jelutakon keresztül hatnak.

Korábbi kísérletekben a módosított EPO analógok (CEPO, aszialoEpo, vagy a piroglutamát hélix B felszíni peptid (pHBSP vagy ARA 290, mely az EPO béta láncának 11 aminosavát tartalmazza) az EPO protektív hatásait megtartották eritropoetikus aktivitás nélkül, viszont potenciálisan magasabb antigenitással rendelkezhetnek. Ezzel szemben az AF peptidek a linker molekulákon és diszulfidhidakon keresztül rendelkeznek az EPO receptorhoz nagy komplementaritású felszínnel. Mindezen eredmények alapján az általunk vizsgált nem-eritropoetikus EPO analóg peptidek ígéretes kardioprotektív szerek lehetnek az akut miokardiális infarktus kezelésében.

Konklúzió

A kísérletek új eredményei

Kísérleteinkkel az irodalomban elsőként írtuk le, hogy (i) a szérum nitrotirozin korrelál az MMP-9 aktivitással, (ii) a szérum lipid paraméterek korrelálnak a nitrotirozin szinttel és az MMP-2 aktivitással, (iii) a szívizomfunkció korrelál a nitrotirozinnal, az MMP-9 aktivitással és a kreatinin szinttel, valamint (iv) a kreatinin korrelál a nitrotirozinnal és az urea nitrogén korrelál az MMP-9 aktivitással egy-ér koronária betegekben.

Kísérleteinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy a nem-eritropoetikus EPO receptor ligand peptidek, az AF41676 és az AF43136, csökkentik az infarktus méretét akut miokardiális infarktus patkány modelljében.

Jövőbeni tervek

Eredményeink alátámasztják, hogy a nitrotirozin és az MMP-2 és MMP-9 aktivitások prediktív vagy diagnosztikus értékkel bírhatnak iszkémiás szívbetegekben, és a nitro-oxidatív stressz, illetve az MMP aktivitások csökkentése akár terápiás lehetőséget is jelenthet. Ennek érdekében átfogó, nagy elemszámú klinikai vizsgálatok szükségesek. Továbbá, a nem-eritropoetikus EPO receptor ligandok potenciális kardioprotektív szerek lehetnek akut miokardiális infarktus kezelésében. Ehhez további kísérletek szükségesek a szerek biztonságosságára és hatékonyságára vonatkozóan.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a következő szervezeteknek a projektek pénzügyi támogatásáért: Egészségügyi Minisztérium [ETT 476/2009], Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok [NKFP_06_A1-MMP_2006; HURO/ 0901/137/2.2.2 – HU-RO TRANS-MED; TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005; TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 és BAROSS-DA07-DA-TECH-07-2008-0041], Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Bencsik Péter), Pharmahungary Csoport, valamint az Affymax Inc. a Pharmahungary Csoporton keresztül.

Köszönetemet fejezek ki Professzor Dr. Dux Lászlónak, az SZTE ÁOK Biokémiai Intézet vezetőjének, hogy Intézetében dolgozhattam.

Különösen hálás vagyok témavezetőim, Dr. Bencsik Péter és Dr. Csont Tamás, áldozatos munkájáért, melyet a PhD tanulmányaim során kaptam tőlük.

Köszönöm Professzor Dr. Ferdinandy Péternek a lehetőséget, hogy kutatásaimat az általa vezetett Kardiovaszkuláris Kutatócsoportban végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Ungi Imre docens úrnak és Dr. Sasi Viktornak a klinikai vizsgálatban biztosított humán vérmintákért, illetve Dr. Földesi Imrének a laboratóriumi mérésekért.

Külön köszönöm az Affymax Inc. munkatársainak, Kathryn W. Woodburn-nek, Mehrdad Shamloo-nak és Christopher P. Holmes-nak, és a Pharmahungary Csoport munkatársainak, hogy a tesztanyagokat rendelkezésünkre bocsátották és a tudományos közlemény elkészülésében pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

Köszönöm a munkáját minden szerzőtársamnak, akik a tudományos közlemények létrejöttében közreműködtek.

Köszönöm továbbá volt és jelenlegi kollégáimnak, barátaimnak a támogatását, akik munkám során segítettek.

Végül köszönöm a családomnak kitartó biztatását és támogatását.



Kardiovaszkuláris Kutatócsoport
Szegei Tudományegyetem, ÁOK, Biokémiai Intézet
6720 Szeged, Dóm tér 9.
www.cardiovasc.com

Dr. Bencsik Péter
egyetemi adjunktus
SZTE ÁOK Biokémiai Intézet &
Pharmahungary 2000 Kft.
6724 Szeged, Dóm tér 9.
Tel: +36 30 355 7083
email: bencsik.peter@med.u-szeged.hu

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Péter Bencsik, Viktor Sasi, **Krisztina Kiss**, Krisztina Kupai, Márton Kolossváry, Pál Maurovich-Horvat, Tamás Csont, Imre Ungi, Béla Merkely, Péter Ferdinandy.
Serum lipids and cardiac function correlate with nitrotyrosine and MMP activity in CAD patients.

Eur J Clin Invest. 2015;45(7):692-701. doi: 10.1111/eci.12458.

Mint a fent megadott tudományos közlemény első szerzője kijelentem, hogy a kézirat létrehozásához Dr. Kiss Krisztina a következőkkel járult hozzá:

- 1) Betegekből származó adatok összegyűjtése, rendszerezése és kiértékelése
- 2) Szakirodalmazás a tudományos közlemény publikálhatóságának érdekében
- 3) A tudományos közlemény egyes részeinek megírása

Továbbá hozzájárulok, hogy jelen közlemény tartalmát Dr. Kiss Krisztina felhasználja PhD értekezésének elkészítéséhez.

Szeged, 2016. január 20.


Dr. Bencsik Péter
első szerző