

**A peroxinitrit és a capsaicin-szenzitív érző idegek
szerepe a szívizom stressz adaptációjában**

Dr. Bencsik Péter

Ph.D. tézis összefoglaló

**Kardiovaszkuláris Kutatócsoport
Biokémiai Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem**

2008

BEVEZETÉS

Rövid iszkémiás epizódok megnövelik a szív és más szövetek tűrőképességét egy későbbi, hosszabb iszkémiával szemben. Ezt a jelenséget nevezzük iszkémiás prekondicionálásnak. A prekondicionálás hatására iszkémia/reperfúziót követően csökken az infarktus mérete, javul a szívfunkció, valamint csökken az aritmiák előfordulása. Számos egyéb mediátor mellett a nitrogén-monoxid (NO), reaktív oxigén származékok, mint a peroxinitrit (ONOO⁻), és antioxidáns enzimek szerepét feltételezik a klasszikus prekondicionálás kialakulásában. Tanulmányunkban a ONOO⁻ klasszikus prekondicionálásban betöltött szerepére kívántunk rávilágítani.

A ONOO⁻ egy erőteljes oxidáns szabadgyök, mely in vivo körülmények között extrém gyors arányban keletkezhet a NO és a szuperoxid-anion (O₂^{-•}) nem-enzimatis reakciójának következtében, melynek csak a diffúzió szab határt. Mára már széles körben elfogadottá vált a megnövekedett ONOO⁻ képződés oxidatív és nitrozatív stresszt okozó szerepe számos kardiovaszkuláris és egyéb patológiás állapotokban. Azonban azt is kimutatták, hogy az endogén ONOO⁻ termelődés stressz-válaszreakciókat aktiválhat és triggerként szerepelhet a patkány szívmusculus stressz adaptációjában.

A kémiai prekondicionálás egy új, gyakorlatban jól alkalmazható lehetőség kardioprotekció kialakítására. A „kémiai prekondicionálás” kifejezést először Riepe és Ludolph használta az általuk agyszövetben 3-nitropropionsavval (3-NPA) létrehozott hipoxiás tolerancia kialakítására. A 3-NPA egy növényi mycotoxin, mely irreverzibilis gátlószere a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusban ill. a mitokondriális elektrontranszportlánc II komplexében megtalálható szukcinát-dehidrogenáz enzimnek. A 3-NPA hatásmechanizmusa szorosan kapcsolódik a reaktív oxigén gyökök, különösen a ONOO⁻ termelődéséhez. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a ONOO⁻ képes triggerelni az iszkémiás prekondicionálás kialakulását, valamint, hogy a prekondicionálás csökkenti a NO, O₂^{-•} és ONOO⁻ túltermelődését egy későbbi iszkémia/reperfúziós károsodás során, ezáltal védelmet indukálva a miokardiumban. Habár a 3-NPA kémiai prekondicionálást indukáló hatása jól ismert agyszövetben, nagyon kevés információ áll rendelkezésre a szívmusculus 3-NPA indukálta kémiai prekondicionálásával kapcsolatban.

Ellentétben a szívmusculus adrenerg és kolinerg beidegzésével, jóval kevesebb figyelem fordítódik a miokardium gazdag érző beidegzésének funkcionális jelentőségére. A szenzoros idegek NO és vazoaktív peptid (pl. CGRP, Substance P) tartalmuknál fogva erőteljesen

befolyásolják a szív funkcióját és adaptív reakcióit. A vékony szenzoros idegek hatékony érzékelő berendezésként működnek; stimulálhatóságukat iszkémia, hipoxia, laktát, kálium és alacsony pH hatására transzmittereik felszabadulása jelzi. Nagyon kevés adat található azonban a szenzoros idegek fiziológias és patológias szerepéről a szívizom sejtszintű folyamatainak szabályozásával kapcsolatban. Hasonlóképp ismeretlen a szenzoros neuropátia kialakulásának mechanizmusa olyan betegségekben (pl. diabetes mellitus, obesitas, stb.), melyek rizikó tényezői lehetnek kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának.

A capsaicin egy igen szelektív szenzoros neurotoxin, amely a primer szenzoros idegsejtek egy morfológiailag jól definiált csoportjának funkcionális gátlását, ill. fizikai pusztulását okozza. Capsaicin segítségével kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a szív szenzoros idegei fontos szerepet játszanak a szívizom iszkémiás stressz adaptációjában, mint pl. az iszkémiás prekondicionálásban, valamint a szívizom NO-cGMP rendszerének szabályozásában. Ezért úgy tűnik, hogy a capsaicinre érzékeny szenzoros idegek hozzájárulnak a szívizom fiziológias és patológias működésében szerepet játszó számos összetett sejtszintű folyamat szabályozásához. Azonban a capsaicin-szenzitív érző idegek és a capsaicin receptor (TRPV1) pontos szerepe a szívizom ép és kóros állapotaiban nagyrészt tisztázatlan. A hagyományos biokémiai és farmakológiai megközelítések mindez ideig elégtelennek bizonyultak a szenzoros idegek eliminálásának hatására bekövetkező kulcsmozzanatok felderítésében. Meglepő továbbá, hogy eddig még nem történt kísérlet szisztémás capsaicin kezelés által kiváltott szenzoros kemodenerváció hatására bekövetkező génexpressziós változások felderítésére semmilyen szövetféleségben sem. Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy szisztémás capsaicin kezelés hatására károsodik a szívizom relaxációja a bazális NO tartalom csökkenésének kíséretében, azonban a háttérben álló folyamatok még tisztázatlanok. Csökkent bazális NO tartalom csökkent ONOO⁻ termelődéshez vezethet, mely csökkenést okozhat a szarkoplazmás retikulum Ca²⁺-ATPáz 2a (SERCA2a) S-nitrozilációjának mértékében, amely a miokardium relaxációs zavarához vezethet. Kimutatták, hogy a SERCA Cys349 aminosaván ONOO⁻ által történő nitroziláció aktiválhatja az enzimet. Okkal feltételezhetjük tehát, hogy a szenzoros kemodenerváció hatására lecsökkent NO termelődés károsodott szívizom relaxációhoz vezethet, csökkent ONOO⁻ képződésen, következésképp csökkent SERCA2a S-nitroziláción keresztül.

CÉLKÍTÚZÉS

Tanulmány 1.

Kísérletet tettünk a 3-NPA-val indukált kémiai prekondicionálás izolált patkányszívben történő kimutatására, valamint, hogy a NO, O₂^{-•} és ONOO⁻ szerepet játszik-e a kardioprotetktív hatás kialakulásában.

Tanulmány 2.

Megvizsgáltuk, hogy a capsaicin előkezelés által létrehozott szenzoros kemodenerváció vezethet-e a szívizom csökkent relaxációs képességéhez, csökkent ONOO⁻ képződésen, ezáltal csökkent SERCA2a S-nitroziláción keresztül. Továbbá, a szívizom capsaicin-szenzitív szenzoros idegei által szabályozott új sejtszintű folyamatok azonosítása érdekében, DNS-chip technikát alkalmazva, 6400 gén expresszióváltozását monitoroztuk a szívben szisztémás capsaicin kezelés következtében létrehozott szenzoros kemodenerváció hatására.

KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS ÉS MÓDSZEREK

Tanulmány 1.

Kísérleteinkben 3 csoportba osztottunk hím Wistar patkányokat. A prekondicionált csoport szolgált pozitív kontrollként, melyben a prekondicionálást 3 egymást követő ciklusban 5 perc globál iszkémia/5 perc reperfúzió váltakozó ismétlésével értük el, melyet 30 perces globál iszkémia és 2 óra reperfúzió követett. A 3-NPA-val kezelt és a kontroll csoport állatai a szív izolálását 3 órával megelőzően intraperitoneálisan 20 mg/kg 3-NPA-t, illetve annak vivőanyagát kapták. Az izolált szíveket ezt követően 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetettük alá.

Tanulmány 2.

A primer szenzoros idegek szelektív kemodenervációjának elérése érdekében hím Wistar patkányokat kezeltünk szubkután capsaicinnel emelkedő dózisban 3 napig. A kontroll csoport a capsaicin vivőanyagát kapta szintén 3 napon keresztül. A capsaicin egyéb hatásait elkerülendő, izolált szívvel végzett kísérleteinket 7 nappal az utolsó kezelést követően végeztük, mikorra a miokardiális érző idegek eliminálódtak és a capsaicin már kiürült a szervezetből.

EREDMÉNYEK

Tanulmány 1.

A kontroll szívekben az iszkémia/reperfúzió hatására kiterjedt infarktus keletkezett, melyet jelzett az LDH nagymértékű megjelenése a koronária perfuzátumban. A 3-NPA kezelés, hasonlóképpen az iszkémiás prekondicionáláshoz, jelentős mértékben lecsökkentette mind az infarktus méretét, mind a kiáramlott LDH mennyiségét.

A 3-NPA-val kezelt csoportban jelentősen megemelkedett a szívizom bazális NO tartalma a kontroll csoporthoz képest, azonban a NO-szintáz aktivitásában nem találtunk különbséget. Megvizsgáltuk a szívizom O_2^- szintjét, melyben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a 3-NPA kezelés hatására. Csökkent emellett a szívizomban megtalálható 2 fő O_2^- termelő enzim, a xantin-oxidoreduktáz (XOR) és a NADH-oxidáz aktivitása is a kezelés hatására, azonban a O_2^- lebontásáért felelős szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitása változatlan maradt. Végül a peroxinitrit képződés markereként a miokardium szabad nitrotirozin szintjét mértük. A 3-NPA kezelés hatására mintegy felére csökkent a szívizom szabad nitrotirozin tartalma.

Tanulmány 2.

A szisztémás capsaicin kezelés kiváltotta szenzoros kemodenerváció hatására jelentősen emelkedett a bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) a kontroll csoporthoz képest.

DNS-chip technikával megvizsgáltuk 6400 gén expresszióját szisztémás capsaicin kezelés hatására bekövetkező változásokat keresve. 80 gén esetében tapasztaltunk szignifikáns változást: 47 gén mutatott fokozott kifejeződést, 33 esetében pedig csökkent expressziót lehetett kimutatni.

A szívizom bazális NO tartalma jelentősen (a kimutathatóság határáig) csökkent a szisztémás capsaicin kezelés hatására. Ezzel összhangban csökkent a Ca^{2+} -dependens NO-szintáz génexpressziója, valamint az enzim aktivitása is. A továbbiakban a csökkent NO szint létrejöttében feltételezhetően szerepet játszó O_2^- és ONOO⁻ miokardiális szitjeit vizsgáltuk. A szívizom O_2^- szintjében kb. 30%-os csökkenést mértünk a capsaicinnel kezelt csoportban, azonban statisztikailag ez nem volt szignifikáns változás. A O_2^- termelő XOR és NADPH-oxidáz aktivitásában nem találtunk változást a kezelés hatására, azonban a SOD aktivitása jelentősen megemelkedett a capsaicinnel kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Megmértük mind a szisztémás, mind a miokardiális nitrotirozin (az ONOO⁻ markere) mennyiségét, és mindkét esetben jelentős csökkenést tapasztaltunk szisztémás capsaicin kezelés hatására.

Végül, hogy megfigyeljük, hogy a csökkent ONOO⁻ szint vezethet-e a miokardiális SERCA2a működésének változásához, izolált SR mintákból Western blot segítségével vizsgáltuk a SERCA2a S-nitrozilációjának mértékét. A szisztémás capsaicin kezelés következtében létrejött szenzoros kemodenerváció hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a SERCA2a S-nitrozilációjának mértékében a kontrollhoz képest.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. 3-NPA-val farmakológiai prekondicionálás hozható létre a szívizomban, mely által csökkenthető az infarktus mérete.
2. Ez a hatás összefüggésbe hozható a NO biológiai elérhetőségének növekedésével és a ONOO⁻ és O₂⁻• képződés csökkenésével, amelyért a XOR és NADH-oxidáz aktivitásának gátlása hoz létre.
3. A capsaicin-szenzitív érző idegrostok jelentős szereppel bírhatnak számos neurális és nem-neurális gén expressziójának szabályozásában, a szívizomban és valószínűleg egyéb szövetekben is.
4. A szenzoros kemodenerváció csökkenti a NO biológiai hozzáférhetőségét a szívizomban a Ca²⁺-dependens NOS expressziójának és aktivitásának csökkentésén, valamint a SOD aktivitásának növelésén keresztül. Ez csökkent bazális ONOO⁻ képződéshez vezet, mely csökkenést eredményez a SERCA2a S-nitrozilációjának mértékében, ezáltal romló miokardiális relaxációs képességet okoz, melyet jól mutat a megnövekedett LVEDP.
5. Az irodalomban először írtuk le, hogy a capsaicin-szenzitív érző idegek szerepet játszhatnak a szívizom relaxációjának szabályozásában a ONOO⁻ bazális szintjének, ezáltal a SERCA2a S-nitrozilációjának fenntartásán keresztül.