

**A RÉSKAPCSOLATOK SZEREPE AZ AKUT ISZKÉMIA OKOZTA  
ARITMIÁKBAN ÉS AZ ISZKÉMIÁS PREKONDITIONÁLÁS  
ANTIARITMIÁS HATÁSÁBAN**

Doktori értekezés tézisei

**Papp Rita**

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája  
című Doktori Program



Témavezető:

Prof. Végh Ágnes

SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2008

## KÖZLEMÉNYEK

1. **Papp R**, Gönczi M, Kovács M, Seprényi Gy, Végh Á. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 396-405. IF: 6,127

2. **Papp R**, Gönczi M, Végh Á. A réskapcsolatok szerepe akut miokardiális iszkémia okozta aritmiákban. *Cardiol Hung* 2008; 38: 109-15.

*Angol nyelvű változat:*

**Papp R**, Gönczi M, Végh Á. Role of gap junctions in arrhythmias induced by acute myocardial ischaemia. *Cardiol Hung* 2008; 38: 116-22.

3. **Papp R**, Gönczi M, Kovács M, Seprényi G, Végh Á. Rotigaptide attenuates acute ischaemia-induced arrhythmias and does not interfere with the induction of ischaemic preconditioning in canine hearts (Készülő kézirat)

## BEVEZETÉS

Az akut miokardiális iszkémia okozta kamrafibrilláció a fejlett országokban az élen járó halálokok közé tartozik. Mivel a jelenleg alkalmazott, főként a szív ioncsatornáira ható antiaritmiás szerek többsége - különösen iszkémiás körülmények között - kiszámíthatatlan, gyakran épp proaritmiás mellékhatásokkal rendelkezik, az akut iszkémia okozta aritmiákra mindmáig nem létezik általánosan elfogadott és kellően biztonságos gyógymód. Erre a problémára jelenthetnek megoldást az új célponton, így például a réskapcsolatokon ható gyógyszerek, és a szív saját védekező mechanizmusait kihasználó prekondicionálás.

Kamrai aritmiák főként az akut miokardiális iszkémia első 30 percében, nagyállat modelleken és emberben egyaránt két, jól elkülöníthető fázisban jelentkeznek. Míg az iszkémia 3-8. perce között megjelenő, ún. 1a aritmiafázis kialakulásáért az iszkémia okozta gyors biokémiai változások, valamint az ennek következtében fellépő ionegyensúly-eltolódás és membránpolarizáció felelősek, addig az iszkémia 15-30. percében kialakuló és a legsúlyosabb aritmiákkal fenyegető 1b fázis hátterében főként a katekolaminok felhalmozódása és a réskapcsolatok záródása áll.

A réskapcsolatok (gap junction) a szomszédos sejtek között közvetlen citoplazmatikus kapcsolatot biztosító sejtkapcsoló struktúrák, amelyek a sejtmembránban tömegesen, más membránfehérjékkel együtt ún. gap junction plakkokban helyezkednek el. Minden réskapcsolat két, egyenként 6 connexin (Cx) fehérje alegységből álló félcsatorna összekapcsolódásával jön létre. Emlős szívizomszövetben a Cx fehérje három izoformáját írták le, a molekulásúlyuk alapján elnevezett izoformák közül a kamrai munkaizomzatban a Cx43 előfordulása jellemző. A réskapcsolatok számát, elhelyezkedését valamint nyitottságát a sejt metabolikus állapota és egyes szignalizációs utak résztvevői (kinázok, foszfatázok) szabályozzák.

Mivel a réskapcsolatok a szomszédos sejtek között nem csak metabolikus (1 kDa-nál kisebb molekulák kicserélődése), hanem - ingerelhető szövetek esetén - elektromos kapcsolatot is biztosítanak, a szívizomszövetben meghatározó szerepet játszanak az ingerület terjedésében. Ezt a szerepet *in vitro* és *in vivo* munkák egyaránt igazolták, rámutatva arra, hogy a réskapcsolatok számának csökkenése és/vagy azok záródása az ingerületvezetést lassítja, ezáltal különösen a reentry típusú aritmiák kialakulásának kedvez.

Akut iszkémiában az intracelluláris savasodás, a nagy energiájú foszfátraktárok kimerülése, valamint az intracelluláris  $Ca^{2+}$  és lipidmetabolit-felhalmozódás a réskapcsolatok záródásához vezetnek. A réskapcsolatok záródása az 1b fázisú aritmiák megjelenésének idején

a legkifejezettebb, és valószínűleg védő funkciót tölt be azáltal, hogy elszigeteli a sérült, ingerelhetetlen sejteket egészséges szomszédaitól. Ez a védő folyamat azonban az ingerületvezetés lassításával, és/vagy heterogénné tételével súlyos aritmiák kiváltó oka lehet. Míg a réskapcsolat-záródás szerepe az 1b fázisú aritmiákban viszonylag jól ismert, addig olyan fontos kérdések, hogy van-e réskapcsolat-záródás az iszkémia egyéb szakaszaiban, illetve hogy a réskapcsolatok záródása minden esetben aritmogén, vagy pedig csak az iszkémia egy adott szakaszában, más tényezőkkel együttesen hatva okoz aritmiákat, egyelőre tisztázatlanok. Ezen kérdések a réskapcsolatok nyitottságát mérve, azt az ingerületvezetés minőségével és a kamrai aritmiákkal összevetve, illetve a réskapcsolatok farmakológiai módosításával (nyitó és záró szerek alkalmazásával) válaszolhatóak meg. Mivel a réskapcsolatok aritmogenezisben betöltött szerepének pontosabb ismerete és gyógyszeres módosításuk új támadáspontú antiaritmiás szerek kifejlesztését tenné lehetővé, ezen kérdések klinikai jelentősége is számottevő.

Az iszkémiás prekondicionálásról (rövid, szubletális iszkémia/reperfúziós periódusok védő hatása egy rákövetkező, hosszabb iszkémia/reperfúzió káros következményeivel szemben) ismert, hogy nem csak az iszkémia/reperfúzió okozta sejtpusztulást és a szívfunkcióromlást csökkenti, hanem jelentős antiaritmiás védelmet is nyújt. A prekondicionáló iszkémia/reperfúzió során olyan endogén anyagok szabadulnak fel, amelyek a sejt szignalizációs kaskádjait aktiválva túlélésért felelős és mitokondriális fehérjék, valamint ioncsatornák és -transzporterek működését változtatják meg, így hozzák létre a tényleges védő hatást. A prekondicionálás a réskapcsolatok működését is befolyásolja: altatott sertés modellen leírták, hogy az 1b fázisú aritmiák csökkentésével és késleltetésével párhuzamosan az 1b fázist megelőző gyors réskapcsolat-záródás is csökkent, illetve késett, és ez feltehetően hozzájárult az antiaritmiás hatáshoz.

Mindezek mellett az is feltételezhető, hogy a réskapcsolatok már a prekondicionálás kiváltásakor is jelentős szerephez jutnak, az általuk biztosított közvetlen citoplazmatikus kapcsolat ugyanis segítheti egyes kis molekulájú, védő hatást indukáló endogén anyagok szövetbeli terjedését. Ezt a feltételezést valószínűsítik azok a korábbi munkák, amelyekben a réskapcsolatok farmakológiai úton történő zárása megszüntette a prekondicionálás infarktusz területet csökkentő hatását; a réskapcsolatok szerepe a prekondicionálás antiaritmiás hatásának kiváltásában viszont továbbra sem ismert.

## CÉLKITŰZÉSEK

I. A réskapcsolatok akut iszkémia okozta záródását és szerepüket az 1b fázisú aritmiák kialakításában már több állatmodellen leírták. Nem ismert azonban, hogy az iszkémia egyéb szakaszaiban előfordul-e réskapcsolat-záródás, valamint az sem, hogy a réskapcsolatok záródása minden esetben aritmogén, vagy csak egy bizonyos mértékű, esetleg csak az iszkémia egy meghatározott, kritikus szakaszában jelentkező réskapcsolat-záródás vezet aritmiákhoz. Munkánk során a réskapcsolatok működését, az ingerületvezetés minőségét és az iszkémia okozta kamrai aritmiák súlyosságát altatott kutya modellen vizsgálva a következő célokat tűztük ki:

**I./1. A réskapcsolat-záródás, az ingerületvezetés lassulása, és a kamrai aritmiák összefüggésének vizsgálata akut miokardiális iszkémia során.**

**I./2. A réskapcsolatokat nyitva tartó rotigaptide és a réskapcsolatokat záró carbenoxolone hatásának vizsgálata az iszkémia okozta réskapcsolat-záródásra, az ingerületvezetés lassulására és a kamrai aritmiákra.**

II. Az iszkémiás prekondicionálás mérsékli, illetve késlelteti az iszkémia okozta réskapcsolat-záródást, amelynek feltehetően szerepe van az 1b fázisú aritmiák csökkentésében. Korábbi tanulmányok emellett azt is felvetették, hogy a réskapcsolatoknak már a prekondicionálás kiváltásában is szerepe lehet. Mindezek alapján célunk volt:

**II./1. A prekondicionálás védő hatásának igazolása az iszkémia okozta réskapcsolat-záródással, ingerületvezetés-lassulással és a kamrai aritmiákkal szemben az általunk használt állatmodellben.**

**II./2. A réskapcsolatok szerepének vizsgálata a prekondicionálás antiaritmiás hatásának kiváltásában; ennek során a réskapcsolatokat nyitó rotigaptide-et és a réskapcsolatokat záró carbenoxolone-t az iszkémiát megelőzően önmagukban, illetve a prekondicionáló iszkémia/reperfúzióval kombinálva alkalmaztuk.**

## MÓDSZEREK

### 1. Kísérleti állatok, műtéti eljárás

Kísérleteinket 8,5 és 46 kg közötti (átlagosan  $21 \pm 7$  kg) súlyú felnőtt, mindkét nemhez tartozó korcs kutyákon végeztük. Az állatokat pentobarbitállal (30 mg/kg i.v.) altattuk, az altatást később kloralóz és uretán keverékével tartottuk fenn (60 ill. 200 mg/kg, i.v.). A kísérletek során folyamatosan regisztráltuk a perifériás (jobb arteria femoralisban mért) artériás vérnyomást, a bal kamrai nyomást és az utóbbiból származtatható, a kamrai kontrakció és relaxáció sebességére utaló  $dp/dt$  értékeket. A kutyákat intubáltuk és szobalevegővel lélegeztettük; a lélegeztetés megfelelő voltáról az artériás vérgáz és pH értékek rendszeres mérésével győződünk meg, illetve szükség esetén ezek alapján korrigáltuk. A mellkas és a szívburok megnyitása után a bal koronária artéria elülső leszálló ágát (left anterior descendens; LAD) az első nagy elágazásától proximálisan későbbi okklúzió céljára kiproparáltuk. Az okklúzió helyétől disztálisan a LAD egyik kisebb oldalágába kanült vezetünk, ezen keresztül történt az anyagok, illetve oldószerük (fiziológiás sóoldat) infúziója.

### 2. Kamrai aritmiák és az ingerületvezetés minőségének értékelése

A szívfrekvenciát II-es elvezetésű EKG-ról mértük, ugyanerről az elvezetésről, a Lambeth-konvenciók alapján határoztuk meg a kamrai aritmiák súlyosságát: az iszkémia során előforduló kamrai extraszisztolék (ES) és tachikardiás epizódok (VT; 4 vagy annál több egymást követő kamrai extraszisztolék) száma mellett a kamrafibrilláció százalékos gyakoriságát (VF%) fejeztük ki.

A kísérletek egy részében a leendő iszkémiás területre kompozit elektródot varrtunk. Ez az elektród 24 epikardiális elvezetési pont bipoláris jelét összegzi, amely normál, gyors ingerületvezetés esetén egyetlen, tükyszerű jelet eredményez, lassú és inhomogén aktiváció esetén viszont ugyanez a jel felrostozódik és meghosszabbodik. A kompozit-jel időtartama ms-ban kifejezve adja meg az elektromos aktiváció inhomogenitását.

A többi kísérletben a kompozit elektród helyett egy 31 unipoláris elvezetést tartalmazó aktivációtérképező elektródot használtunk. A helyi aktiváció idejét az egyes elektródpontokra meghatározva az ingerületvezetést az össz-aktivációs idővel, az első és utolsó aktiváció között ms-ban eltelt időtartammal jellemeztük.

### **3. Szöveti elektromos impedancia (elektromos kapcsolat) mérése**

Az elektromos impedanciát a leendő iszkémiás terület középpontjába szúrt négytűs elektróddal határoztuk meg. Az elektród külső tűi között a szövetbe küszöbalatti váltóáramot vezettünk (10  $\mu$ A, 8 kHz), a feszültséget pedig a két belső elektródon, lock-in erősítő segítségével 4 másodpercenként mértük. Az adatokat számítógépen tároltuk utólagos analízis céljára, ennek során az áram és a feszültség ismeretében meghatároztuk a szöveti ellenállást (Ohm-cm-ben) és az áram-feszültség közötti fáziseltolódást ( $^{\circ}$ -ban). A mérés elve alapján a réskapcsolatok záródásával a sejtmembránok kondenzátor kapacitása megnő, amely egyrészt a szöveti ellenállás növekedésében, másrészt a fáziskésés fokozódásában (a fázisszög negatív irányba tolódásában) nyilvánul meg.

### **4. A réskapcsolatok permeabilitásának (metabolikus kapcsolat) mérése**

A koszorúér-okklúzió végén az állatok szívét telített KCl oldat intravénás adásával megállítottuk, a szívet gyorsan kivágtuk és jéghideg fiziológiás sóoldatban átmostuk. Az iszkémiás és egy távoli, nem iszkémiás bal kamrai területről kivágott szövetmintákat 15 percre Lucifer Yellow (LY, 1,5 mg/ml) és TRITC-dextrán (TD, 3,5 mg/ml) kevert oldatába mártottuk, majd 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták midmiokardiális rétegéből kriosztáttal 25  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk, amelyeket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt CCD kamera segítségével fotóztunk. Mivel a LY penetrációja a réskapcsolatok nyitottságától függ, a TD viszont csak a mintavétel során felsértett sejtekbe kerül be, a réskapcsolatok permeabilitását adott mintában a LY/TD festett területek arányaként határoztuk meg. Az iszkémiás mintákban mért permeabilitást később az azonos állatból származó nem iszkémiás minta permeabilitásának százalékában fejeztük ki.

### **5. A connexin 43 fehérje foszforiláltságának meghatározása western blot technikával**

A szintén az iszkémia végén kivett, iszkémiás és nem iszkémiás területekről származó szövetmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintákat folyékony nitrogénezen porítottuk, majd 180-200 mg porított mintát felhasználva a membránfehérje frakciót izoláltuk. Az izolátumok fehérjetartalmának Lowry-módszerrel történő meghatározása után mintánként 20  $\mu$ g fehérjét futtattunk meg 12%-os poliakrilamid gélen és blottoltunk át PVDF membránra. A membrán 5 %-os tejjel történő blokkolása után az elsődleges antitesttel (nyúl poliklonális anti-Cx43) egy éjszakán át, majd a másodlagos antitesttel (HRP-konjugált kecske anti-nyúl IgG) 1 órán keresztül jelöltünk. Az ECL Plus kittel előhívott membránok kemilumineszcens jelét Typhoon lézer szkennelrel digitalizáltuk,

a foszforilált (43-45 kDa) és defoszforilált (40-43 kDa) connexin 43 fehérje sávok intenzitását Image Quant szoftverrel számszerűsítettük. A foszforilált és defoszforilált Cx43 mennyiségét ezután az össz membrán Cx43 tartalom százalékában fejeztük ki.

## **6. Kísérleti protokollok**

I. A réskapcsolatok akut iszkémia okozta aritmiákban betöltött szerepének vizsgálatára a kutyákat 5 csoportra osztottuk. A kontroll kutyák a LAD 60 perces okklúziója előtt 15 perccel és az okklúzió során intrakoronáriásan fiziológiás sóoldatot kaptak. A CBX csoportban a LAD 60 perces okklúziója előtt és során a réskapcsolatokat záró carbenoxolone-t (50  $\mu$ M) alkalmaztuk, míg további három csoport az okklúzió előtt 10 perccel és annak során a réskapcsolatokat nyitva tartó rotigaptide-et kapott 0,04; 0,2 vagy 1  $\mu$ g/kg/min-s dózisban.

II. A réskapcsolatok szerepét a prekondicionálás antiaritmiás hatásában további 6 csoportban vizsgáltuk. A kontroll kutyák ez esetben a koronária okklúzió előtt 20 perccel, 20 percen keresztül kaptak fiziológiás sóoldatot, a prekondicionált csoportban pedig ugyanezen sóoldat-infúzió utolsó 5 percében egy 5 perces prekondicionáló iszkémiát is alkalmaztunk. A réskapcsolatok esetleges szerepét a prekondicionálás kiváltásában carbenoxolone és rotigaptide alkalmazásával teszteltük. Mindkét szert vagy prekondicionálás helyett, 20 perccel az iszkémia előtt 20 perces intrakoronáriás infúzióban, vagy a prekondicionálással kombinálva alkalmaztuk.



## **EREDMÉNYEK**

**I./1.** A kontroll kutyákban a 60 perces LAD okklúzió első 30 percében súlyos kamrai aritmiák jelentkeztek, amelyek 1a és 1b fázisra különíthetők el. A kompozit elektród különösen az 1a, míg az aktivációtérképezés mindkét aritmiafázis, valamint az okklúzió második fele során is jelentős aktivációlassulást mutatott. A szöveti ellenállás meredek növekedése és a fázisszög csökkenése az 1b fázisú aritmiák megjelenésének idején igazolta a fokozott réskapcsolat-záródás szerepét ebben az aritmiafázisban. A réskapcsolatok záródását a szövetminták vizsgálata is megerősítette, amelynek során a réskapcsolatokon keresztüli metabolikus kommunikáció csökkenését és a Cx43 fehérje réskapcsolat-záródásra utaló defoszforilációját figyelhettük meg. Érdekes módon azonban az iszkémia 30-60. perce közötti, további réskapcsolat-záródást jelző impedanciaváltozásokat nem követték súlyosabb aritmiák.

**I./2.** A rotigaptide, különösen annak alacsonyabb dózisa számottevően csökkentették az iszkémia okozta ingerületvezetés-lassulást és a kamrai aritmiákat, ez a védő hatás a réskapcsolatok nyitva tartásával hozható összefüggésbe. Bár a szöveti impedanciaváltozások kevésbé, a permeabilitás- és a western blot vizsgálatok azonban 60 perc iszkémia után is egyértelműen igazolták a réskapcsolatok nyitottságát. Meglepő eredmény viszont, hogy a réskapcsolatokat záró carbenoxolone iszkémia előtt és alatt folyamatosan alkalmazva a rotigaptide-hez hasonló mértékű védő hatást eredményezett. Ez a védő hatás az ingerületvezetés javításában és az aritmiák súlyosságának csökkentésében egyaránt jelentkezett, és feltehetően a réskapcsolat-záródás csökkentésével, időbeli lefolyásának módosításával függ össze.

**II./1.** Az iszkémiás prekondicionálás szignifikánsan csökkentette az akut iszkémia okozta kamrai aritmiák mindkét fázisát, az aritmiák súlyossága és gyakorisága az iszkémia 30-60. percében is alacsony maradt. Ez az antiaritmiás hatás feltehetően a prekondicionálás réskapcsolat-záródást mérséklő hatásának, és az ebből eredő ingerületvezetés-javulásnak tulajdonítható, utóbbit a kompozit elektród és az aktivációtérképezés egyaránt igazolta. A réskapcsolatok csökkent záródása jól megfigyelhető volt mind a szöveti impedanciaváltozások mérséklődésében és a réskapcsolat-permeabilitás megőrzésében, mind pedig a Cx43 fehérje normál, nyitott réskapcsolatokat jelző foszforilációs mintázatának megtartásában. Különösen szembetűnő a meredek impedanciaváltozások elmaradása az 1b fázisú aritmiák idején.

**II./2.** Az iszkémiás prekondicionálással együtt alkalmazott CBX szignifikánsan csökkentette a prekondicionálás antiaritmiás hatását. Ezzel párhuzamosan az ingerületvezetés lassulása az iszkémiás kontroll állatokhoz hasonló mértékű volt, a réskapcsolatok működésére utaló paraméterek (elektromos impedanciaváltozások, réskapcsolat-permeabilitás, Cx43 foszforiláció) pedig szintén a védő hatás csökkenését vagy akár teljes megszűnését jelezték.

Nem várt eredmény, hogy a réskapcsolatok iszkémia előtti zárása a carbenoxolone önmagában való alkalmazásával védő hatást váltott ki, amely mind a kamrai aritmiák, mind az ingerületvezetés, mind pedig a réskapcsolat-záródás szintjén a prekondicionáláshoz hasonló mértékűnek bizonyult. A réskapcsolatokat nyitó rotigaptide iszkémia előtti alkalmazása nem járt ilyen hatásokkal, a rákövetkező iszkémia sem az aritmiák, sem az aktiváció-lassulás, sem pedig a réskapcsolat-záródás szempontjából nem tért el a kontroll csoporttól.

Míg a réskapcsolatok iszkémia előtti zárása védő hatást eredményezett, addig a prekondicionáló iszkémia során előforduló esetleges réskapcsolat-záródás rotigaptide-del történő megakadályozása nem befolyásolta a prekondicionálás védő hatását: a rotigaptide jelenlétében prekondicionált kutyákban az aritmiák száma és súlyossága, az ingerületvezetés minősége és a réskapcsolatok működése is a prekondicionált csoporthoz hasonló értékeket mutatott.

## MEGBESZÉLÉS

**I./1.** A réskapcsolatok nyitottságának *in vivo* és *in vitro* mérése, az ingerületvezetés minőségének vizsgálata, illetve ezek összevetése a kamrai aritmiák időbeli eloszlásával altatott, nyitott mellkasú kutya modellen megerősítette, hogy a réskapcsolatok záródása és a részben ennek tulajdonítható ingerületvezetés-lassulás szerepet játszik az akut iszkémia okozta aritmiák 1b fázisában. Érdekes eredmény, hogy az iszkémia 30-60. percében megfigyelhető, további réskapcsolat-záródásra utaló impedanciaváltozások ellenére jelentősebb számú vagy súlyosságú kamrai aritmiát az iszkémia ezen szakaszában nem tapasztaltunk. Mindezek alapján gyanítható, hogy a réskapcsolatok záródása csak az iszkémia egy meghatározott szakaszában képes az aritmiák kiváltására. Ebben az időintervallumban a réskapcsolat-záródás vagy kellően gyors ahhoz, hogy számottevő elektrofiziológiai heterogenitást idézzon elő a szövetben, vagy pedig olyan egyéb aritmogén faktorok megjelenésével esik egybe, amelyekkel együttesen hatva súlyosabb aritmiák kialakulását segítheti elő.

**I./2.** Azt a kérdést, hogy vajon a réskapcsolat-záródás mértéke, vagy annak időpontja a fontosabb az aritmogenezis szempontjából, a réskapcsolatokat nyitva tartó rotigaptide és a réskapcsolatokat záró CBX iszkémia előtti és közbeni folyamatos alkalmazásával próbáltuk eldönteni. A rotigaptide antiaritmiás hatása a kontroll kutyákban tapasztaltakkal egybehangzóan igazolta a réskapcsolatok részvételét az iszkémia okozta aritmiákban. Az a tény azonban, hogy a rotigaptide magasabb dózisa kevésbé hatékonyan csökkentették a kamrai aritmiákat, arra utal, hogy iszkémia esetén a réskapcsolatok nyitottságának túlzott megőrzése sem feltétlenül előnyös. A nyitott réskapcsolatok ugyanis a sejthalált kiváltó faktorok terjedése mellett a fokális típusú aritmiák kialakulását is elősegítik. Várakozásainkkal ellentétben az iszkémia előtt és közben alkalmazott carbenoxolone nem súlyosbította, hanem éppen csökkentette az iszkémia okozta aritmiákat, védő hatása a réskapcsolat-záródás mérséklődésében, időbeli lefolyásának megváltoztatásában, valamint az ingerületvezetés javításában is megmutatkozott. Ha feltételezzük, hogy kísérleteinkben a CBX specifikus, réskapcsolat-záró hatása érvényesült, akkor a tapasztalt védő hatás a réskapcsolat-záródás időbeli lefolyásának megváltoztatásával magyarázható; a réskapcsolat-záródás tehát csak az iszkémia egy meghatározott, kritikus szakaszában tűnik jelentős aritmogén tényezőnek.

Ezen eredményeink arra utalnak, hogy akut miokardiális iszkémia során nem feltétlenül a réskapcsolatok nyitása az egyetlen lehetséges antiaritmiás stratégia; a leendő

antiaritmiás gyógyszerek keresésekor a réskapcsolatokat nyitó és záró szerek egyaránt szóba jöhetnek.

**II./1.** Az iszkémiás prekondicionálás az akut iszkémia okozta aritmiák mindkét fázisát jelentősen csökkentette. Mivel az aritmiák valóban csökkentek, nem pedig csak az iszkémia egy későbbi fázisára tolódtak, a más állatmodelleken végzett megfigyelésekkel szemben a prekondicionálás altatott, nyitott mellkasú kutya szívben abszolút védő hatást eredményezett. Az antiaritmiás hatással párhuzamosan az ingerületvezetés minősége is javult a prekondicionált csoportban, amelyért, legalábbis részben, az iszkémia okozta réskapcsolat-záródás mérséklése felelős.

**II./2.** A réskapcsolatok szerepét a prekondicionálás antiaritmiás hatásának kiváltásában elsőként a carbenoxolone alkalmazásával vizsgáltuk. A prekondicionálással együtt alkalmazott CBX, tehát a réskapcsolatok zárása prekondicionálás során annak védő hatását számottevően gyengítette. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a réskapcsolatokon keresztüli sejt-sejt kommunikáció valóban már a prekondicionálás kiváltásában is szerephez jut. Feltételezésünk szerint a prekondicionáló iszkémia/reperfúzió során felszabaduló endogén anyagok egy része a réskapcsolatokat szövetbeli terjedéséhez csatornaként használja, így a réskapcsolatok zárása ezt megakadályozva képes gyengíteni a prekondicionálás védő hatását.

Míg a réskapcsolatokat nyitó rotigaptide iszkémia előtti alkalmazása várakozásainknak megfelelően nem befolyásolta a rákövetkező iszkémia okozta réskapcsolat-záródást és aritmiákat, addig meglepő módon az önmagában alkalmazott CBX védő hatást indukált. Ez a védő hatás az összes vizsgált paraméterrel szemben a prekondicionáláshoz hasonló mértékű volt. A jelenségnek két lehetséges magyarázata van: az egyik alapján a réskapcsolatok záródása, egyelőre ismeretlen szignalizációs lépéseken keresztül, prekondicionálást képes kiváltani. Feltételezésünk szerint a réskapcsolatok záródása már az iszkémia első perceiben - így akár az 5 perces prekondicionáló iszkémia során is - elkezdődhet, és ez a réskapcsolat-záródás, bár sem aritmiák kiváltásához, sem a felszabaduló endogén anyagok terjedésének gátlásához nem elégséges, részt vehet az iszkémiás prekondicionálásban mint kiváltó faktor.

Hipotézisünket a rotigaptide és a prekondicionálás együttes alkalmazásával teszteltük. A prekondicionáló iszkémia során feltehetően előforduló réskapcsolat-záródás rotigaptide-del való megakadályozása azonban nem befolyásolta a prekondicionálás védő hatását, így nem erősítette meg elképzelésünket.

A carbenoxolone védő hatásának másik lehetséges magyarázata az anyag nem specifikus hatásaiban keresendő, habár kísérleteink relatíve rövid időtartama és az anyag lokális alkalmazása miatt ezen hatások előfordulása nem valószínű. Mindezek mellett az sem lehetetlen, hogy a CBX valóban a connexin fehérjéken hatott, ám azok valamelyik nem réskapcsolat-specifikus funkcióját érintette. A connexin fehérjéről ugyanis kiderült, hogy nem csak a réskapcsolatok felépítésében van szerepük, hanem a sejttérfogat és a sejthalál szabályzásában részt vevő félcsatornákat is alkotnak, valamint a csatornaképzéstől teljesen független szignalizációs szerepük is ismert. Bár részben csak *in vitro* rendszerekben végzett kísérleteken alapulnak, ezt a feltételezést támasztják alá azok az irodalmi adatok, amelyek szerint a Cx43 fehérjére igen, az általa képzett réskapcsolatokon keresztüli kommunikációra viszont nincs feltétlenül szükség a prekondicionálás kiváltásához.

Eredményeink összegzésekképpen elmondható, hogy a réskapcsolatok működésének módosítása mind iszkémia előtt, mind pedig annak során módosíthatja az iszkémia okozta réskapcsolat-záródást, amely az ingerületvezetés minőségét megváltoztatva az iszkémia okozta kamrai aritmiák súlyosságát is befolyásolhatja.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani:

Témavezetőmnek, **Prof. Végh Ágnesnek** amiért megteremtette a munkámhoz szükséges feltételeket, és mindazért, amit e négy év során tanultam tőle.

**Prof. Varró András** intézetvezetőnek a lehetőségért, hogy intézetében dolgozhattam, valamint segítőkész tanácsaiért mind a munkámat, mind pedig kutatói pályám folytatását illetően.

Kooperációs partnerünknek, **Dr. Seprényi Györgynek** akire munkatársként és barátként is mindig számítani lehetett.

**Dr. Nógrádi Antalnak** és **Dr. Zádor Ernőnek**, hogy a molekuláris mérések egy részét laboratóriumukban végezhettem.

**Dr. Gingl Zoltánnak** és **Csengeri Attilának** az impedanciamérő- és az aktiváció-térképező rendszereink összeállításában nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

**Prof. David Garcia-Doradonak**, **Dr. Antonio Rodriguez-Sinovasnak** és **Dr. Ramon Bragosnak** amiért elsajátíthattam tőlük azt impedanciamérés alapjait.

**Prof. Ruben Coronelnek** és **Dr. Ulrich Schottennek** amiért megosztották velem elméleti és gyakorlati tapasztalataikat az aktivációtérképezésről.

**Bakó Erikának**, **Biczókné Battancs Irénnek** és **Kosztka Máriának** az állatkísérletek során nyújtott technikai segítségükért és a jó hangulatú beszélgetésekért.

Barátaimnak: **Marcsinak**, **Mesinek** és **Marcinak**, akikre a laborban és azon kívül is mindig számíthattam, nélkülük minden sokkal nehezebb lett volna.

**Prof. Fekete Évának** minden beszélgetésért és jó tanácsért, amit az egyetemi évek óta kaptam tőle.

**Családomnak:** őket illeti a legnagyobb köszönet folyamatos támogatásukért, megértésükért és szeretetükért, ami nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre.