

**Endogén peptidek (apelin, adrenomedullin)
szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában**

PhD tézis

Farkasfalvi Klára

Doktori iskola vezetője: Komoly Sámuel

Programmvezető: Róth Erzsébet

Témavezető: Szokodi István

PTE, ÁOK, Szívgyógyászati Klinika

2010

1. Bevezetés

A szívelégtelenség mortalitása igen magas, súlyos esetekben a diagnózis felállításától számítva a betegek 50%-a 5 éven belül meghal, annak ellenére, hogy kezelésében mind gyógyszeres, mind sebészi és eszközös beavatkozásokat is alkalmaznak (Hunt et al., 2005). Szívelégtelenségben a szív kontraktilitása gyengült, melynek javítása kívánatos terápiás cél, de jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan gyógyszer, mely hosszú távon is mind szisztolés, mind diasztolés szívelégtelenségben biztonsággal növelné az inotropiát és pozitív lusitrop hatást is kifejtene. Az endogén peptidek, melyek jelentős szerepet játszanak fiziológiás és patofiziológiás körülmények között is a kontraktilitás szabályozásában, az elmúlt években egyre fontosabb kutatási területté váltak a szívelégtelenség kezelési lehetőségét illetően (Brutsaert, 2003). Az apelin (Szokodi et al., 2002) és adrenomedullin (Szokodi et al., 1996) autokrin/parakrin szabályozási mechanizmuson keresztül fejti ki pozitív inotrop hatását és emellett kardioprotektív hatással is rendelkezik (Hamid and Baxter, 2006; Kleinz and Baxter, 2008). Több experimentális adat is igazolta ezen peptidek hatásosságát, de a pontos intracelluláris hatásmechanizmusuk csak részben ismert.

2. Az apelin és az adrenomedullin kardiovaszkuláris szabályozásban betöltött szerepe

Az apelin és az adrenomedullin autokrin/parakrin hatásmechanizmuson keresztül fejti ki hatását a kardiovaszkuláris rendszerben.

2.1. Az apelin-APJ rendszer jellemzői és biológiai hatásai

Apelin és receptora (APJ) igen sok szövetben kimutatható, igen széles körű hatásokkal. Befolyásolja a folyadék és táplálék felvételt, a stresszre adott választ, valamint a cukor és zsírsavanyagcserét is (Kleinz and Davenport, 2005; Newson et al., 2009; Sunter et al., 2003; Taheri et al., 2002). Elsődleges hatása azonban a kardiovaszkuláris rendszerben az értónus és a kontraktilitás szabályozása.

2.1.1. Apelin kontraktilitásra kifejtett hatása

Az apelin pozitív inotrop hatását izolált szíven végzett vizsgálatban igazolták először (Szokodi et al., 2002). Apelin dózis függően, saját receptorán (APJ) keresztül, fokozta a kontraktilitást függetlenül katekolamin, más vazoaktív peptidek vagy nitrogénmonoxid felszabadulásától. Intracelluláris jelátvivőként a foszfolipáz C (PLC), protein kináz C (PKC) aktivációt igazolták (Szokodi et al., 2002), míg Marsi és munkatársai az APJ receptornak az inhibitoros G-proteinen keresztüli hatását bizonyították (Hosoya et al., 2000; Masri et al., 2006). Egyes kutatók szerint az apelin megváltoztatja az L-típusú Ca^{2+} csatorna áteresztő képességét, ezáltal fokozza a kontraktilitást (Kleinz and Davenport, 2005), de ezt elektrofiziológiai vizsgálattal nem igazolták (Szokodi et al., 2002). Wang kutatása az apelin Ca^{2+} anyagcserére gyakorolt kettős hatását bizonyította; szisztolében emeli, diasztolében csökkenti az intracelluláris Ca^{2+} szintet a PKC aktiváció útján, valamint az apelin indukálta szarkolemmális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpa (NCX) és szarkoplazmatikus Ca^{2+} -ATPase (SERCA) aktivitás fokozódását is igazolták (Wang et al., 2008). Experimentális adatok igazolják az apelin-APJ rendszer jelentőségét a krónikus szívelégtelenség kialakulásában is (Chen et al., 2003). Számos in vivo kísérletes adat igazolja az apelin-APJ rendszer befolyását a kontraktilitásra, de a direkt szívműködésre gyakorolt hatása és az intracelluláris hatásmechanizmus még nem tisztázott. Ritmuszavarok patofiziológiájában is szerepet játszhat az apelin. Ellinor és munkatársai igazolták, hogy e peptid szérumszintje csökken lone

pitvarfibrilláció esetén (Ellinor et al., 2006), de az apelin-APJ rendszer elektrofiziológiai paraméterekre kifejtett hatása nem ismert.

2.2. Az adrenomedullin jellemzői és biológiai hatásai

Az adrenomedullint (AM) 1993-ban izolálták és nevezték el először Kitamura és munkatársai, azóta számos cikk jelent meg kutatva farmakokinetikai tulajdonságait és biológiai hatásait (Kitamura et al., 1993). Kardiovaszkuláris rendszerben betöltött szabályozó szerepéről is több tudományos munka szól (Hamid and Baxter, 2005; Kitamura et al., 1993; Szokodi et al., 2008). Az AM és receptora is számos szervrendszerben kimutatható és ennek megfelelően biológiai hatásai is igen változatosak, kezdve a jelentős vasodilatátor hatástól a celluláris növekedés és differenciálódás szabályozásán át a hormon szekréció befolyásolásáig (Samson, 1999; Szokodi et al., 2008). Néhány, nem közvetlenül a kardiovaszkuláris rendszert érintő hatása: AM gátolja az ACTH felszabadulást (Parkes and May, 1997; Samson, 1999), az aldosteron képződést (Yamaguchi et al., 1996) és a steroid szintézist. Továbbá szabályozza a vese vérátáramlását és tubuláris funkcióját (Hinson et al., 2000) és késlelteti az inzulin felszabadulást orális cukor terhelés esetén (Martinez et al., 1996).

2.2.1. Adrenomedullin kontraktilitásra kifejtett hatása

Az AM kontraktilitásra kifejtett hatása ellentmondásos. Intravénás alkalmazás esetén jelentős haemodinamikai változásokat figyelhetünk meg: jelentősen csökkenti a perifériás rezisztenciát, következményesen nő a szívfrekvencia, a verővolumen és a perctérfogat (He et al., 1995; Parkes and May, 1997). Izolált szíveken az AM fokozta a koronária keringést és jelentős, dózis-függő, pozitív inotrop hatást fejtett ki (Szokodi et al., 1996; Szokodi et al., 1998). Izolált szívizom sejteken már kettős inotrop hatást találtak (Mittra et al., 2004), míg mások csak a kontraktilitás csökkenését tudták igazolni izolált nyúl (Ikenouchi et al., 1997) és humán szívizom sejteken (Mukherjee et al., 2002). Egyes vizsgálatokban az AM nem befolyásolta a kontraktilitást (Saetrum et al., 2000; Stangl et al., 2000). Intracelluláris hatásmechanizmusként több vizsgáló csoport is felvetette a cAMP szint emelkedéssel járó jelátvitel lehetőségét (Eguchi et al., 1994; Ishizaka et al., 1994; Sato et al., 1997), ezt azonban kísérletes adatokkal cáfolták (Szokodi et al., 1998). Jelenleg egy valami tekinthető biztosnak, hogy az AM direkt módon befolyásolja kontraktilitást, de ennek intracelluláris hatásmechanizmusa ismeretlen.

3. Vizsgálatunk célja

- Meghatározni az apelin direkt kontraktilitásra kifejtett hatását izolált egészséges és szívelégtelen patkány szívizomsejteken.
- Megállapítani az apelin hatásáért felelős intracelluláris mechanizmusokat.
- Megvizsgálni az apelin elektrofiziológiai paraméterekre kifejtett hatását szívizomsejtekben.
- Definiálni az adrenomedullin pozitív inotrop hatásáért felelős intracelluláris jelátvivő utat.

4. Az apelin kontraktilitásra és elektrofiziológiai paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálata

In vivo vizsgálatokban ugyan részben tisztázták az apelin-APJ rendszer kardiovaszkuláris szerepét, ugyanakkor az apelin direkt, szívizom sejtek kontraktilitására gyakorolt hatása nem ismert. Jelen

vizsgálatunk célja, hogy meghatározzuk az apelin inotropiára kifejtett hatását és az intracelluláris jelátvivő útját - az intracelluláris Ca^{2+} és pH szabályozáson keresztül - felnőtt patkány szívekből nyert izolált szívizomsejteken. Az apelin patofiziológiai szerepének tisztázására nemcsak egészséges, hanem koronária leköttetéssel indukált szívelégtelenségben szenvedő állatok szívizomsejtjeit is megvizsgáltuk. Végezetül az apelin APJ receptor lokalizációjának vizsgálatával kerestük a választ arra, hogy az apelin befolyásolja-e a sejtek közötti kommunikációt szívizomsejt tenyészetben.

4.1. Anyag és módszer

Az állatkísérleteket az angol tudományos vizsgálatokat szabályozó határozat ajánlásai [UK Animal (Scientific Procedures) Act 1986] alapján végeztük. Vizsgálatunkhoz felnőtt, 200g súlyú Sprague Dawley patkányokat használtunk. Izolált szívizomsejteket a korábban leírt, standard enzimatis emésztéssel nyertük (Terracciano and MacLeod, 1997). A szívelégtelenség diagnózisát 8 héttel a koronária leköttetés követően echocardiográfiával (mért ejekciós frakció ($\leq 30\%$) alapján diagnosztizáltuk. Szarkomerhossz-rövidülés méréséhez a szívizomsejtek mozgását digitalizáltuk és Fourier analízis segítségével határoztuk meg (Delbridge and Roos, 1997). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt két különböző fluorescens indikátor segítségével is vizsgáltuk [indo-1 AM, vagy fluo-4 AM] . A kibocsátott fluoreszcencia alapján az F405/485 hányados segítségével kalkuláltuk az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt.

Intracelluláris pH meghatározásához a sejteket $10\ \mu\text{M}$ 5-(and-6)-Carboxy-SNARF-1 AM-vel inkubáltuk és a 580 nm és 640 nm-s hullámhosszon emittált fluorescenciát mértük, ezek hányadosából számítottuk ki a pH-t. A Na^+/H^+ pumpa (NHE) aktivitását NH_4Cl „pre-pulse” módszerrel vizsgáltuk (Boyarsky et al., 1988). Immunocytokémiail vizsgálatához az APJ-receptor két különböző régiója ellen termelt antitestet használtunk, amit mind izolált szívizomsejteken és szívizom szöveten is alkalmaztunk a feltételezett lokalizáció igazolására.

Újszülött patkány szívizomsejteket helyeztünk multi-electrode-array lemezre egysoros, folyamatos réteget képezve és ezzel a rendszerrel vizsgáltuk az elektromos aktivitás eredetét és terjedését (Meiry et al., 2001). Statisztikai elemzéshez használt egy-utas ANOVA-t Tukey vagy Bonferoni féle posthoc analízissel egészítettük ki, vagy két utas Student-t próbát alkalmaztunk. Eredményeinket átlag $\pm$ átlag standard hibája (n=esetszám) formában közöljük. Szignifikancia határának a $p \leq 0.05$ szintet tekintettük.

4.2. Eredmények

4.2.1. APJ receptor sejt szintű lokalizációja

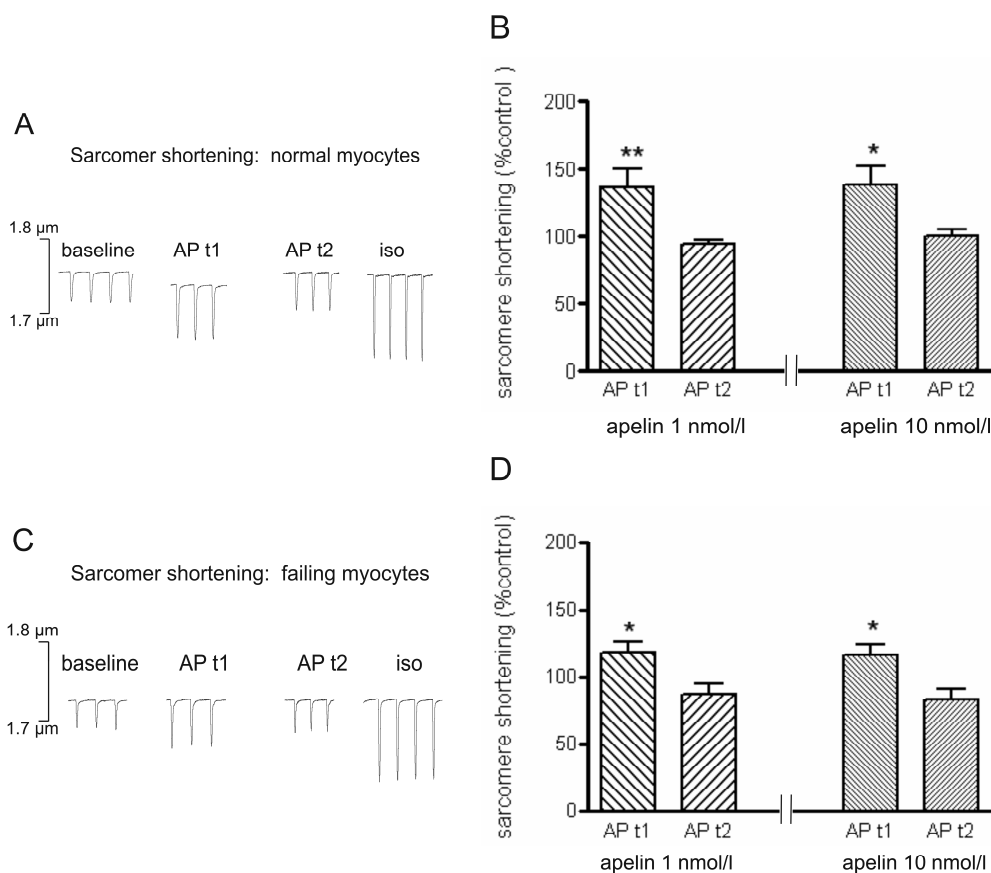
Konfokális immunfluorescens mikroszkóppal igazolták az APJ-receptorra jellemző immunoreaktivitást mind izolált szívizomsejteken, mind szívizom szöveten (Kleinz et al., 2005). Vizsgálatunkban APJ-receptorra jellemző immunoreaktivitást találtunk a szarkomer transversális csíkozottsága mentén, ami megfelel a t-tubulusok lokalizációjának is, valamint az intercaláris disc régióban.

4.2.2. Apelin hatása a kontraktilitásra izolált szívizomsejteken

Apelin a $1\ \text{nmol/l}$ és $10\ \text{nmol/l}$ koncentrációban is növelte a szarkomerhossz- rövidülését, maximális hatását 1 perccel (AP t1) az apelin adagolás megkezdését követően fejtette ki, izolált, felnőtt patkány szívizomsejteken. Ez a hatás 1-2 percig tartott, majd a szarkomerhossz-rövidülés visszatért a kiindulási értékre és nem is változott az apelin adagolás ideje (AP t2) alatt (1. ábra). Maximális szarkomerhossz-rövidülés változás $1\ \text{nmol/l}$ ($136 \pm 13\%$ (14), $P < 0.001$) és $10\ \text{nmol/l}$ ($138 \pm 14\%$ (14), $P < 0.05$) apelin hatására

látható az 1 ábra B részén. A vizsgálat végén isoproterenol (30 nmol/l) adagolással mintegy 250 %-s szarkomerhossz-rövidülés növekedést elérve demonstráltuk a sejtek kontraktilis rezervét.

A szívelégtelen szívizomsejtek szarkomerhossz-rövidülése alap állapotban szignifikánsan kisebb volt az egészségesekénél ($\Delta 0.121 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (24) $p < 0.001$), ugyanakkor apelin hatásban ezek a sejtek is hasonló, tranziens szarkomerhossz-rövidülés növekedéssel reagálnak (1 nmol/l apelin: $117 \pm 8.3 \%$ (12); 10 nmol/l apelin: $116 \pm 7.7 \%$ (12) $p < 0.05$), ahogyan ezt az 1 ábra C,D részén látható. Fontos, hogy az apelinre adott maximális hatásban nem mutatható ki különbség egészséges és szívelégtelen sejtek között.



1. ábra Apelin szarkomerhossz-rövidülésre kifejtett hatása egészséges (A) és szívelégtelen szívizomsejteken látható az ábrán (C) az idő függvényében; alap állapot (baseline), AP t1 (1 perces apelin hatás), AP t2 (8 perces apelin infúziót követően) és iso (30 nmol/l isoproterenol hatásban). Az B ábra mutatja a jelentős (** $p > 0.001$, * $p > 0.05$) szarkomer rövidülés változást egészséges és D pedig a szívelégtelen szívizom sejteken apelin két különböző koncentrációja (1 nmol/l and 10 nmol/l) mellett. A szívelégtelen sejtek hasonlóan reagáltak mind az egészségesek. Az AP t2 időpontban statisztikai különbséget nem lehetett kimutatni egyik csoportban sem.

4.2.3. Apelin hatásmechanizmusának vizsgálata szívizom sejteken

Az apelin hatásmechanizmusának vizsgálatát az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ koncentráció - mint a kontraktilitás legfőbb mediátora – mérésével kezdtük, $[\text{Ca}^{2+}]$ szenzitív fluorescens indikátor segítségével. Apelin nem befolyásolta sem a $[\text{Ca}^{2+}]$ koncentráció amplitúdóját, sem időbeni lefolyását. Következő

lépésben az apelin intracelluláris pH-ra és NHE aktivitásra kifejtett hatását vizsgáltuk. 10 nmol/l apelin adagolása során a fluorescens indikátor hányadosának csökkenését találtuk ((kontroll: 3.01 ± 0.1 egység arány (11); 10 nmol/l apelin: 2.64 ± 0.1 egység arány (11); $p < 0.01$)), ami a pH emelkedését jelenti. Ez a hatás is tranzitorikus volt csakúgy, mint a kontraktilitás változása. NHE aktivitást a sav eltávolítás sebességével jellemeztük. 15 mM NH_4Cl -t 5 percen keresztül adagolva megmértük az elimináció sebességét, majd megismételtük a fenti mérést 1 és 10 nmol/l apelin jelenlétében is. Apelin mindkét koncentrációban szignifikánsan növelte az sav eltávolítás sebességét ((alap érték: 116.2 ± 7.4 egység arány (11); 1 nmol/l apelin: 68.1 ± 10.3 egység arány (11); 10 nmol/l apelin: 80 ± 16 egység arány (11) ($p < 0.05$)), ami fokozott NHE aktivitásra utal.

4.2.3. Apelin hatása az intercelluláris kommunikációra

A neonatalis szívizom sejttenyészet spontán aktivitása mellett az elektrofiziológiai paraméterek mérésére a mezőpotenciál regisztrálását használtuk. Apelin jelenlétében szignifikánsan nőtt a vezetési sebesség (kontroll: 18.34 ± 1.4 cm/s; apelin: 24.1 ± 2.2 cm/s (5) ($P < 0.05$)) és csökkent a mezőpotenciál időtartama (apelin 1 nmol/l: 0.05 ± 0.005 s (13); apelin 10 nmol/l: 0.048 ± 0.005 s (15) $P < 0.05$). A sejttenyészet aktivációs térképét 3D formátumban rekonstruáltuk és az animáció megtekinthető az eredeti cikket megjelentető újság honlapján [Farkasfalvi et al., BBRC, 357, 889-895, 2007]. A Normal Tyrode_3D.avi file mutatja a kontroll (azaz apelin mentes) aktivációt.

5. Adrenomedullin az extracelluláris szignál-regulálta protein kinázon keresztül szabályozza a szív kontraktilitását

A mitogén-aktiválta protein kinázok (MAPK) centrális szerepet játszanak az eukaryocita sejt növekedésének, differenciálódásának, proliferációjának, apoptózisának és transzformációjának regulálásában. Az extracelluláris szignál-regulálta kináz ERK 1 és ERK 2 (gyakran említik ERK1/2 formában) is tagjai a MAPK családnak. Szívizomsejtekben az ERK1/2 jelátvivő kaszkád aktivációja létrejöhet GPCR, tirozin kinázok és stressz hatására (Bueno and Molkentin, 2002; Wang, 2007). Irodalmi adatok szerint az ERK1/2 aktiváció alapvető adaptációs mechanizmust testesít meg a szívizomban (Lips et al., 2004; Purcell et al., 2007). Az ERK1/2 jelátviteli szerepét több különböző patofiziológiai állapotban is igazolták, de élettani körülmények között is meglévő szabályozó szerepe a szívben még nem tisztázott.

Az AM autokrin/parakrin faktor, patológiás stimulusokra bizonyítottan kardioprotektív hatással is rendelkezik, mint például gátolja a kóros bal kamrai remodelációt, amit a szívizom hypertrophia, apoptózis és fibrozis csökkentésén keresztül ér el (Ishimitsu et al., 2006). Az AM jelentős pozitív inotrop hatású. Hatásmechanizmusáról biztosan tudjuk, hogy nem a klasszikus adenilát cikláz-cAMP-PKA útvonalat aktiválja (Szokodi et al., 1996; Szokodi et al., 1998), de más alternatív útvonalról nincs irodalomban fellelhető adat. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az AM fokozza az ERK 1/2 foszforilációt többek között vaszkuláris simaizom (Iwasaki et al., 1998) és endothel (Kim et al., 2003) sejteken. Jelen vizsgálatunkban arra a kérdésre keressük a választ, hogy az AM a szívizomzatban is aktiválja-e az ERK foszforilációt és ha igen, szerepet játszik-e kontraktilitásra kifejtett hatásban.

5.1. Anyag és módszer

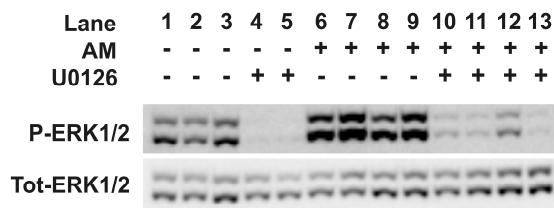
A kísérleteket az oului és pécsi egyetem állatkísérletekre vonatkozó szabályait betartva, etikai engedély alapján végeztük. A patkányok dekapitálását követően a szíveket Langendorff technikát alkalmazva perfundáltuk, ahogy azt korábban ismertettük (Szokodi et al., 1996; Szokodi et al., 1998). A kontraktilis erőt a szív csúcsához rögzített erőmérő transducer- ami az apiko-bazális távolság változását méri - segítségével regisztráltuk. Kísérleteink során 40 perces perfúziót követően, specifikus gátlószert további 30 percen át adagoltuk (alkalmazott gátlószerek; U0126 :1.5 $\mu\text{mol/l}$, AG1478: 1 $\mu\text{mol/l}$, zoniporide 1 $\mu\text{mol/l}$). Westernblott vizsgálatokat a korábban leírtak szerint végeztük (Szokodi 2008) és a következő antitestek használtuk: anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2. Adatainkat az átlag $\pm$ átlag standar hibájával adtuk meg. A különböző kezelések időbeni lefolyásának függvényében történő összehasonlításához két-utas, ismétlődő ANOVA statisztikai módszert, míg minden más esetben egy-utas ANOVA és ezt követően Bonferoni post hoc tesztet alkalmaztunk. Szignifikancia határának a $p \leq 0.05$ szintet tekintettük.

5.2. Eredmények

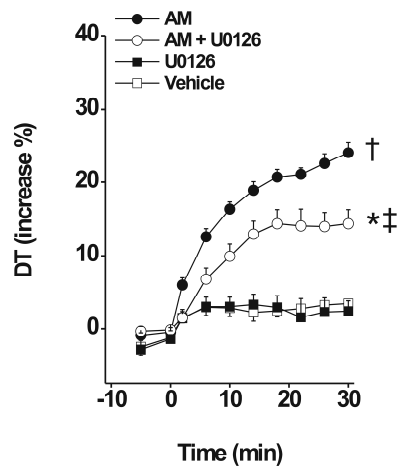
5.2.1. Az extracellularis szignál-regulálta kináz 1/2 szerepe az adrenomedullin kiváltotta pozitív inotrop válaszban

Az ERK1/2 szerepének tisztázására az AM indukálta kardiális hatásokban. megvizsgáltuk az AM stimuláció hatását ezen kináz aktivációjára. Westernblott vizsgálattal igazoltuk, hogy az AM (1nmol/l) 30 perces infúzióját követően a bal kamra izomzatában szignifikánsan emelkedett a foszforilált ERK1/2 szintje (2A ábra). A kináz aktivitás változásának a kontraktilitásra gyakorolt hatását tisztázandó U0126 inhibitort – ami gátolja a MEK 1/2-t az ERK feletti reguláló kinázt (Tenhunen et al., 2004; Szokodi et al., 2008) - alkalmaztunk. 1.5 $\mu\text{mol/l}$ U0126 jelenlétében jelentősen csökkent a foszforilált ERK1/2 mennyisége mind a kontroll, mind az AM stimulálta szívekben (2A ábra). Amennyiben U0126 és AM kombinációjával kezeltük a szíveket, azt tapasztaltuk, hogy jelentősen, mintegy 40 %-kal ($P<0.01$; Figure 2B) lecsökkent az AM indukálta pozitív inotrop hatás. A gátlószert önmagában adva, semmilyen hatást ($P=NS$) nem fejtett ki a kontraktilitásra (2B ábra).

A



B



2. ábra ERK1/2 jelátvivő mechanizmus aktivációja szükséges az AM kiváltotta kontraktilitás fokozódáshoz. A, Westernblott analízis mutatja ERK1/2 foszforiláció változását bal kamrából nyert szívizomzatban. Izolált szíven 1nmol/l AM 30 perces perfundálásával az ERK1/2 szignifikánsan magasabb foszforilációját észleltük, ami 1.5 μ mol/l U0126, specifikus MEK1/2 gátló jelenlétében eltűnt. B, U0126 jelentősen kisebb AM indokolta kontraktilitás fokozódást láttunk. DT kifejtett erőt jellemzi. * $P < 0.01$ és † $P < 0.001$ vs control és U0126; ‡ $P < 0.01$ vs AM.

5.2.2. Extracelluláris szignál-regulálta kináz 1/2-t szabályozó mechanizmusai: az epidermális növekedési faktor receptorok szerepe

ERK1/2 aktiváció felléphet epidermális növekedési faktor receptorok (EGFR) transzaktivációján keresztül is (Thomas et al., 2002). EGFR szerepének tisztázására az ERK1/2 aktivációjában, specifikus EGFR tirozin kináz inhibitor (AG1478) alkalmaztunk. AG1478 1 μ mol/l koncentrációban adagolva jelentősen csökkentette az AM indukálta ERK1/2 foszforilációt. Az AG1478 nemcsak a foszforilációt, de az AM indukálta inotrop választ is csökkentette 45 %-kal ($p \leq 0.001$), ugyanakkor önmagában alkalmazva semmilyen hatást nem váltott ki.

5.2.3. Extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 potenciális célpontja a Na^+/H^+ pumpa

ERK1/2 jelátvivő rendszerről kimutatták, hogy képes befolyásolni a NHE-1 foszforilációját szívizom sejteken (Moor and Fliegel, 1999). Felmerül a kérdés, hogy az AM kiváltotta inotrop válaszban is szerepet játszhat a megváltozott NHE-1 aktiváció, minek tisztázására zoniporidet – specifikus NHE-1 inhibitor – alkalmaztunk (Knight et al., 2001; Szokodi et al., 2002). Zoniporide önmagában nem befolyásolta a

kontraktilitást ($p=NS$), míg AM-mel együtt adva jelentősen, 46 %-kal ($p \leq 0.001$) csökkentette az AM kiváltotta pozitív inotrop választ.

6. Megbeszélés

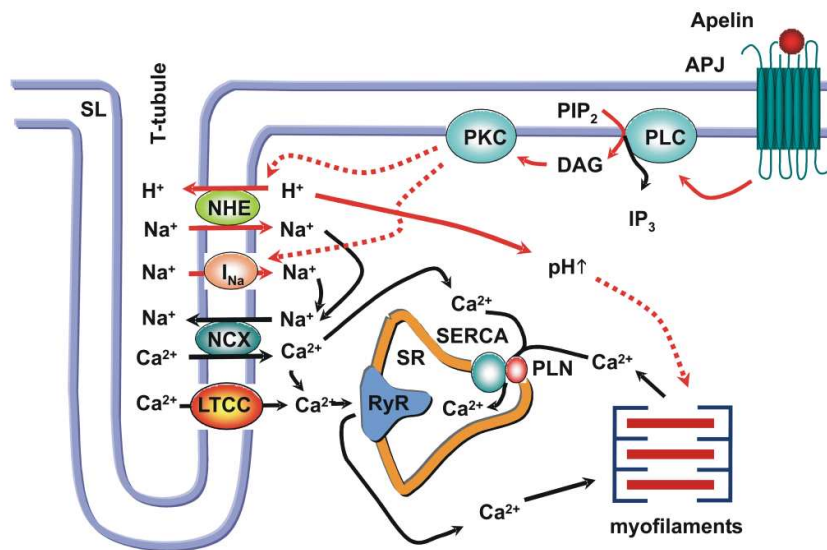
6.1. Az apelin kontraktilitásra és elektrofiziológiai paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálata

Az apelin ex vivo (Szokodi et al., 2002) és in vivo bal kamra funkcióra kifejtett hatásainak ismeretében (Ashley et al., 2005; Berry et al., 2004) az intracelluláris hatásmechanizmusok tisztázatlansága további vizsgálatokat tett szükségessé. Vizsgálatunkkal elsőként igazoltuk, hogy az apelin közvetlenül fokozza a kontraktilitást izolált, felnőtt patkány szívmuscleseken. Kísérletes adataink alapján feltételezhető, hogy az apelin kiváltott pozitív inotrop hatásért a szarkolemma NHE aktivitás fokozódás miatt kialakuló intracelluláris alkalózis okozta myofilamentum szenzitivitás fokozódás állhat. Korábbi vizsgálatokkal szemben, ahol az apelin kontraktilitást növelő hatása tartósan bizonyult, mi csak tranziens változást találtunk, ami felhívja a figyelmet arra, hogy szöveti szintén további mechanizmusok kellenek a tartós hatás eléréséhez. Vizsgálatunkkal igazoltuk azt is, hogy az apelin növeli az elektromos aktivitás vezetési sebességét szívmuscle sejtenyészeten, amely hatása mostanáig felfedezetlen maradt.

6.1.1. Apelin hatása a kontraktilitásra izolált szívmuscleseken

Apelin Ca^{2+} tranziens változása nélkül fokozza a szarkomerhossz-rövidülését és ezen eredményünket Charo és munkatársai is megerősítették apelin-APJ knock out egér modellen (Charo et al., 2009). Korábbi vizsgálatok is felvetették, hogy az apelin befolyásolja a NHE aktivitást (Hosoya et al., 2000) és a pH változás nagymértékben befolyásolja a $[Ca^{2+}]$ -kontraktilitás görbét (Kohmoto et al., 1990) ezért vizsgálatunkban megmértük az apelin pH és NHE aktivitásra kifejtett hatását. Azt találtuk, hogy az apelin növeli az intracelluláris pH-t és NHE aktivitást is. Korábbi kísérletes eredményeket is figyelembe véve - miszerint specifikus NHE gátlóval az apelin indukálta kontraktilitás fokozódás kivédhető (Szokodi et al., 2002) – vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy a sejten belüli alkalizáció következtében fokozódó myofilamentum Ca^{2+} érzékenység állhat az apelin pozitív inotrop hatásának hátterében.

Dai és munkatársai szerint az apelin hatás kifejezettebb szívelégtelen myocardiumban (Dai et al., 2006). Ezek alapján felmerül, hogy a szöveti szinten jelentkező intenzívebb hatás sejt szintű változásokkal igazolható, de ezt az elméletet nem sikerült bizonyítanunk. Szívelégtelen sejteken is kimutatható volt az apelin tranziens kontraktilitást fokozó hatása, de érdemi különbséget az egészséges és szívelégtelen sejtek reakciója között nem tudtunk kimutatni. Korábbi vizsgálatokkal szemben (Ashley et al., 2005; Berry et al., 2004; Szokodi et al., 2002), nem tudtunk tartós inotrop választ kiváltani az izolált sejteken. Az izolált, izovolémiás patkány szív preparátumban az apelin csak magasabb végdiastolés nyomás mellett növelte a kontraktilitást, ami azt sugallja, hogy az apelin hatását a Frank-Starling görbe felszálló szárán feje ki (Szokodi et al., 2002). Amennyiben a mechanikai feszülés elengedhetetlen az apelin hatáshoz, akkor logikusan csak behatárolt funkciót láthatunk a mechanikai feszülés nélkül összehúzódó izolált szívmuscleseken. Lehetséges magyarázatul szolgálhat Chamberland és munkatársainak vizsgálata, akik a feszültség függő nátrium ionáram növekedését találták apelin hatásban. Kísérletes eredményeikben kardiális nátrium ionáram fokozódása 5 perccel az apelin infúzió megkezdését követően már látható volt és 20 perc elteltével egyensúlyi helyzet alakult ki (Chamberland et al., 2010). Az eredményeket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy az apelin pozitív inotrop hatásáért a fokozott NHE aktivitás és nátrium ionáram együttesen felelős.



3. ábra .Az apelin feltételezett hatásmechanizmusa a szívben.

Apelin hatására aktiválódik a PKC, ami fokozza a NHE, NCX és nátrium csatornák aktivitását. Az apelin pozitív inotrop hatása az intracelluláris alkalinizáció okozta myofilamentum Ca^{2+} érzékenység növekedés és fokozott Ca^{2+} beáramlás miatt rezerv módban működő NCX következtében lép fel (Chamberland et al., 2010; Szokodi et al., 2002)

6.1.2. Apelin hatása az intercelluláris kommunikációra

Az újszülött patkány szívműködésén végzett vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az apelin fokozza a szívműködés spontán tüzelési frekvenciáját, vezetési sebességét és csökkenti a mezőpotenciál időtartamát. Magyarázatul az apelin kiváltott nátrium ionáram fokozódása állhat, ami gyorsítja az akciós potenciál korai szakaszát és így fokozza a szívműködés excitabilitását (Chamberland et al., 2010). Az a tény, hogy az APJ lokalizációját igazoltuk az intercaláris discben – ez a sejtalkotó felelős az elektromos ingerek továbbításáért a sejtek között – szintén megerősíti az apelin intercelluláris kommunikációban betöltött fontosságát. Az apelin elektrofiziológiai paraméterekre kifejtett hatása jól harmonizál az apelin-APJ rendszer változásával pitvarfibrillációs aritmia és reszinkronizációs terápia során (Ellinor et al., 2006; Francia et al., 2006). Az apelin szerepe az szívműködés elektrofiziológiai szabályozásában még további vizsgálatokat igényel.

6.2. Az adrenomedullin az extracelluláris szignál-regulált protein kinázon keresztül szabályozza a szív kontraktilitását

Számos kísérlet igazolja, hogy az AM autocrin/paracrin módon szabályozza a szív kontraktilitását, bár az irodalmi adatok nem egyértelműek és az intracelluláris hatásmechanizmusa sem tisztázott.

6.2.1. Adrenomedullin jelátvivő mechanizmusa

Experimentális adatok alapján tudjuk, hogy nem cAMP dependens mechanizmus felelős a fiziológias koncentrációhoz közeli dózisban adott AM pozitív inotrop hatásért. Először, AM hatására nem emelkedett a bal kamra izomzatában a cAMP szint izolált Langendorff patkány szív preparátumban. Másodsor, PKA gátlással nem függeszthető fel az AM kiváltott pozitív inotrop válasz. Végül, foszfodiészteráz inhibitor jelenlétében AM nem fokozta a kontraktilitást. A cAMP mediálta mechanizmussal szemben Szokodi és

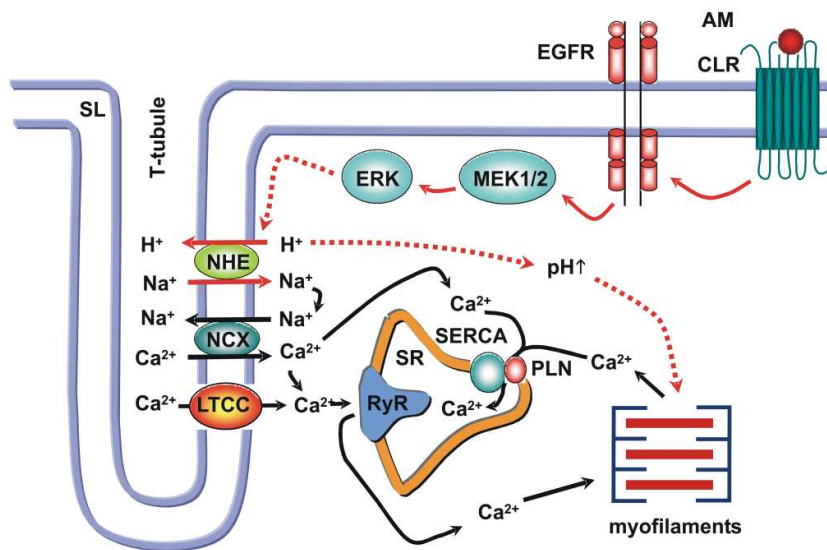
munkatársai felvetették a PKC aktiváció szerepét az AM indukálta pozitív inotrop hatás kialakításában (Szokodi et al., 1998).

6.2.2. Alternatív intracelluláris hatásmechanizmusok

Egyre több irodalmi adat támasztja alá, hogy a MEK1/2-ERK1/2 útvonal aktiválódása védi a szívet különböző patológiás ingerekkel szemben. ERK1/2 útvonalról igazolódott, hogy képes csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodás kiváltotta apoptosist (Lips et al., 2004). Mostanában több kísérlet is irányult arra, hogy bebizonyítsák az ERK1/2 jelátvivő rendszer szükségességét a stresszel szembeni védekezésben, ehhez *Erk1*^{-/-} and *Erk2*^{+/-} és a szívben ERK1/2 inaktív foszfatázt termelő (kettős specificitású foszfatáz 6) transzgénikus egereket használtak. Bár a hipertrófiás választ nem befolyásolta ez a modell tartós nyomásterhelésnek kitett állatokban, azonban a kardiális ERK1/2 aktiváció hiányában szívelégtelenség lépett fel, fokozott az apoptózis következtében (Purcell et al., 2007). Továbbá, az 5-ös típusú adenilát-cikláz genetikai hiányában fokozódott a MEK1/2-ERK1/2 útvonal aktivációja, ami védő funkciót biztosít az öregedéssel kialakuló kardiomiopátiával szemben azzal, hogy megőrizte a bal kamra funkcióját és fokozta az apoptozissal szembeni rezisztenciát. Nemrég megjelent vizsgálatunkkal igazoltuk az ERK1/2 útvonal szerepét a szívizom kontraktilitás szabályozásában; az endothelin ERK1/2 aktiváción keresztül fejtette ki pozitív inotrop hatását (Szokodi et al., 2008). Jelen vizsgálatunkban az AM szignifikánsan emelte a foszforilált ERK1/2 szintet a bal kamra izomzatában és gátló szerepe jelenlétében jelentősen csökkent az AM indukálta kontraktilis erő növekedése. Korábban már igazoltuk, hogy az AM nem cAMP függő útvonalon keresztül fejti ki hatását és jelenlegi adataink azt igazolják, hogy az ERK 1/2 aktiváció kulcsfontosságú az AM pozitív inotrop hatás kiváltásában. Az adnilát-cikláz- cAMP-PKA tartós aktiváció által kiváltott súlyos kardiális komplikációkkal szemben a MEK1/2 ERK 1/2 útvonal aktivációja egyszerre javítja a kontraktilitást és védi is a szívet a stressz kiváltotta károsító hatásokkal szemben.

A GPCR agonisták esetében leírták, hogy az ERK 1/2 aktiváció az EGFR transzaktiváción keresztül történik (Thomas et al., 2002). Az EGFR aktivációt gátló erlotinib súlyos szisztolés funkciókárosodást, dilatatív kardiomiopátia kialakulását eredményezi tartós β -adrenerg stimuláció mellett (Noma et al., 2007). Korábbi vizsgálatunkban igazoltuk, hogy az EGFR transzaktiváció elengedhetetlenül fontos az endothelin-1 kiváltotta pozitív inotrop válasz kialakulásában, amit a MEK 1/2-ERK 1/2 aktiválásán keresztül ér el (Szokodi et al., 2008). Összhangban ezzel az eredménnyel, az EGFR transzaktiváció gátlásával szignifikáns csökkenés igazolódott az AM kiváltott ERK 1/2 foszforilációban és az pozitív inotrop válaszban is. Jelen eredményeink felhívják a figyelmet az EGFR útvonal fontosságára a szívizom kontraktilitás szabályozásában, ami hatását az MEK 1/2-ERK 1/2 aktiváción keresztül éri el.

Az aktivált ERK1/2 több protein között a szarkolemmális NHE-1 foszforilációjáért is felelős (Moor and Fliegel, 1999). Jelen vizsgálatunkban a szelektív NHE-1 gátló zoniporide szignifikánsan csökkentette az AM kiváltotta pozitív inotrop választ, ami igazolja az NHE-1 fontos szerepét az AM szignalizációban. NHE fokozott aktivitása alkalizációt eredményezve növeli a myofilamentum Ca^{2+} szenzitivitását, másrésről a nő az intracelluláris nátrium, következményesen a Ca^{2+} koncentrációja is az NCX reverse módú aktivitás fokozódása miatt (Kentish, 1999).



4.ábra. Adrenomedullin lehetséges szignál mechanizmusa. ERK1/2 aktiváció kulcsfontosságú az AM kiváltott pozitív inotrop hatásban. EGFR-n keresztül aktiválódik az ERK1/2, ami NHE-1 fokozott működésén keresztül növeli a kontraktilitást.

7. Új tudományos eredmények

- Apelin fokozza a szarkomerhossz-rövidülést tranzitorikusan mind egészséges, mind szívelégtelen szívizomsejteken.
- Apelin nincs hatással a $[Ca^{2+}]$ tranziensre.
- Apelin növeli a szívizom Ca^{2+} érzékenységét a szarkolemmális NHE aktivitás fokozásán keresztül.
- APJ receptor a megtalálható az interkaláris discben is.
- Apelin módosítja az elektrofiziológiai paramétereket újszülött patkány szívizomtenyészetben.
- AM fokozza a kontraktilitást az ERK1/2 aktiváláson keresztül egészséges felnőtt patkány szívekben.
- AM hatására EGFR-n keresztül aktiválódik az ERK1/2, ami NHE-1 fokozott működésén keresztül növeli a kontraktilitást.