Streszczenie rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Katarzyna Kodziszewska

Układ peptydów natriuretycznych – poziom ekspresji i ocena funkcjonalna w niewydolności mięśnia serca w modelu ludzkim

PROMOTOR

Dr hab. n. med. Przemysław Leszek
Profesor nadzwyczajny Instytutu Kardiologii w Warszawie

WARSZAWA, 2018

Wprowadzenie

Niewydolność serca (NS) to stan charakteryzujący się wzmożoną aktywacją osi renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) i układu współczulnego (SNS), a także działającego antagonistycznie do nich układu peptydów natriuretycznych (NP). Modulacja powyższych układów wykorzystywana jest w terapii NS. Dotychczas podejmowano wiele prób wykorzystania kardioprotekcyjnego wpływu NP poprzez tworzenie syntetycznych peptydów natriuretycznych, bądź ingerencję w układ klirensowy NP (inhibicja neutralnej endopeptydazy (NEP)). Próby te okazały się nieskuteczne, gdyż ten relatywnie niespecyficzny enzym rozkłada dużą liczbę cząsteczek o działaniu wazoaktywnym (w tym angiotensynę II i bradykininę), a dopiero koncepcja jednoczesnego hamowania osi RAA i maksymalizacji działania peptydów natriuretycznych na układ sercowo-naczyniowy poskutkowała stworzeniem inhibitora receptorów angiotensyny II i neprylizyny (ARNI) oraz otworzyła nowe możliwości leczenia niewydolności serca.

Działając przez receptory NPR-A, NPR-B i NPR-C peptydy natriuretyczne regulują napięcie ścian naczyń, równowagę wodno-sodową, diurezę, procesy włóknienia oraz procesy przebudowy mięśnia sercowego i naczyń. NPR-C i neutralna endopeptydaza (NEP) stanowią komponenty układu klirensowego, eliminującego peptydy natriuretyczne z krwioobiegu. NPR-A i NPR-B są związane ze szlakiem sygnałowania cyklazy guanylowej (GC – związanej z cGMP), a stymulacja naczyniowego NPR-C skutkuje hamowaniem działania cyklazy adenylowej (AC – związanej z cAMP) i wzrostem aktywności fosfolipazy C (PLC – związanej z IP_3). Dotychczasowe badania pokazują, że w niewydolności serca dochodzi do istotnych zmian zarówno w zakresie ekspresji NP, ekspresji i funkcji efektorów NP, a także układu klirensowego. Brakuje jednak spójnej oceny zmian w systemie peptydów natriuretycznych w ludzkim modelu niewydolności serca.

Cele badania

W naszym badaniu podjęliśmy się wszechstronnego scharakteryzowania zmian w ekspresji peptydów natriuretycznych i ich receptorów na poziomie mRNA i białek, jak również odpowiedzi receptorów na specyficzną i niespecyficzną stymulację, a także ekspresji i aktywności komponentów układu klirensowego NP w sercach i naczyniach pobranych od pacjentów z niewydolnością i bez niewydolności serca.

Materiał i metody

Oznaczenia przeprowadzono w 43 sercach (lewa komora) pobranych od pacjentów z zaawansowaną niewydolnością serca kwalifikowanych do transplantacji, grupę kontrolną stanowiło 12 serc (lewa komora) od zdrowych dawców, które nie zostały zakwalifikowane do przeszczepu. Oznaczeń w naczyniach (aorty) dokonano na materiale od 17 pacjentów z niewydolnością serca i 8 dawców niezakwalifikowanych do przeszczepu serca. Ekspresję NP, ich receptorów na poziomie mRNA i białek oznaczono metodą, odpowiednio, RT-PCR i ELISA, ekspresję NEP na poziomie białkowym oznaczano metodą ELISA. Funkcję NPR-A i NPR-B oceniano przez oznaczenie stężeń cGMP przed i po stymulacji syntetycznymi, specyficznymi agonistami receptorów (ANP dla NPR-A i CNP dla NPR-B), oraz niespecyficznym stymulatorem cyklazy guanylowej (TritonX). Funkcję NPR-C w sercu i w aorcie oceniono oznaczając stężenia cAMP oraz IP_3 przed i po stymulacji specyficznym ligandem NPR-C, $cANF_{4-23}$, jak również po podaniu niespecyficznych czynników stymulujących (forskolina) lub hamujących (2',3'-dideoksyadenozyna - DDA) działanie cyklazy adenylowej. Oceny aktywności NEP dokonano testem immunofluorescencyjnym.

Wyniki

Średni wiek w grupie badanej wynosił 49,5 ± 12,1 lat, średnia klasa NYHA 3,5 ± 0,5. Dominującymi przyczynami NS były kardiomiopatia rozstrzeniowa (48,8%) oraz choroba niedokrwienna serca (30,2%). Parametry echokardiograficzne w grupie badanej świadczyły o istotnym uszkodzeniu funkcji lewej komory (LVEDD 68,7 ± 10,5mm, LVEF 21,1 ± 10,2%). Parametry hemodynamiczne odzwierciedlały upośledzoną funkcję mięśnia sercowego (CO 3,9 ± 1,4 l/min, mPWP 21,4 ± 9,2 mmHg) i cechy nadciśnienia płucnego (mPAP 29,3 ± 11,1 mmHg, sPAP 42,79 ± 14,37 mmHg, PVR 2,5 ± 1,6 j.W.). W parametrach biochemicznych stwierdziliśmy znaczne pobudzenie neurohormonalne (średnie NT-proBNP 5 986 ± 5 270,6 pg/ml). Pacjenci otrzymywali optymalne leczenie NS, w tym m.in.: inhibitory konwertazy angiotensyny – 86,36%, beta blokery – 95,45%, antagoniści aldosteronu – 90,91%, diuretyki – 95,45%. Żaden pacjent nie otrzymywał leku z grupy ARNI. W grupie kontrolnej średni wiek dawców wynosił 33,8 ± 11,5 roku, pacjenci prezentowali stabilny stan hemodynamiczny, funkcja skurczowa lewej komory pozostawała prawidłowa. Parametry biochemiczne nie odbiegały od wartości prawidłowych.

W sercach niewydolnych odnotowaliśmy istotny wzrost ekspresji ANP i BNP w stosunku do serc wydolnych zarówno na poziomie mRNA (odpowiednio: 24,4-krotny

i 13,3-krotny wzrost ekspresji; p = 0,0004 i p = 0,0441), jak i białkowym (3,39 ± 3,58 vs. 1,2 ± 1,19 ng/mg białka dla ANP, p = 0,001; 94,11 ± 56,59 vs. 26,18 ± 12,79 ng/mg białka dla BNP, p < 0,0001). Ekspresja mRNA dla CNP była zredukowana w niewydolnym sercu (0,12 poziomu ekspresji w sercach wydolnych, p = 0,0191), lecz stwierdziliśmy istotnie podwyższony poziom CNP na poziomie białkowym (12,07 ± 7,37 vs. 7,645 ± 1,26 ng/mg białka, p = 0,015). Po dokonaniu podziału grupy badanej na etiologię niedokrwienną (n = 13) i nie-niedokrwienną (n = 30) nie obserwowaliśmy różnic w ekspresji peptydów natriuretycznych na poziomie mRNA (p = 0,32 dla ANP, p = 0,84 dla BNP, p = 0,35 dla CNP), jak i białek (p = 0,18 dla ANP, p = 0,61 dla BNP, p = 0,08 dla CNP).

Ekspresja NPR-A i NPR-B pozostawała stabilna zarówno na poziomie mRNA (0,89 poziomu ekspresji w sercach wydolnych, p = 0,394 dla NPR-A; 0,98 poziomu ekspresji w sercach wydolnych, p = 0,445 dla NPR-B), jak i białek (21,53 ± 7,5 vs. 22,83 ± 8,24 ng/mg białka, p = 0,578 dla NPR-A; 10,46 ± 6,75 vs 11,07±3,03, p = 0,168 dla NPR-B). Ekspresja NPR-C w sercach niewydolnych ulegała zwiększeniu na poziomie mRNA (2,93-krotny wzrost w stosunku do serc wydolnych, p < 0,00001), lecz była istotnie zredukowana na poziomie białkowym (4,86 ± 1,94 vs 7,56 ± 1,86 ng/mg białka, p = 0,001). W ocenie etiologii nie stwierdziliśmy istotnych różnic w ekspresji receptorów na poziomie mRNA (p = 0,38 dla NPR-A, p = 0,64 dla NPR-B, p = 0,21 dla NPR-C), natomiast na poziomie białek, jedynie NPR-C wykazywało istotnie wyższą ekspresję w sercach niewydolnych z powodu kardiomiopatii niedokrwiennej (6,40 ± 1,4 vs. 4,19 ± 1,82 ng/mg białka, p < 0,001) w porównaniu z etiologią nie-niedokrwienną. Stwierdziliśmy nieistotny statystycznie trend w kierunku wyższej ekspresji NPR-A w etiologii niedokrwiennej (24,77 ± 7,11 vs 20,12 ± 7,34 ng/mg białka, p = 0,06), bez różnic w zakresie ekspresji NPR-B (13,71 ± 11,31 vs 9,05 ± 2,52 ng/mg białka, p = 0,16).

W ocenie aktywności receptorów NPR-A i NPR-B związanych z cyklazą guanylową, po stymulacji receptorów odpowiednimi ligandami (ANP dla NPR-A i CNP dla NPR-B) obserwowaliśmy znamienny wzrost stężenia cGMP zarówno w sercach wydolnych (z 2,187 ± 0,29 do 4,087 ± 0,67 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,001 dla NPR-A; z 2,187 ± 0,29 do 3,37 ± 0,38 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,002 dla NPR-B), jak i niewydolnych (z 1,941 ± 0,59 do 2,714 ± 0,97 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,0117 dla NPR-A; z 1,941 ± 0,59 do 2,714 ± 0,71 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,023 dla NPR-B). U chorych z niewydolnością serca odpowiedź NPR-A na stymulację zdefiniowana jako różnica pomiędzy stężeniem cGMP po stymulacji

i w warunkach podstawowych (δ) była zmniejszona w stosunku do serc wydolnych (0,77 ± 1,04 vs. 1,90 ± 0,68 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,020). Natomiast funkcja NPR-B pozostawała niezmieniona (1,18 ± 0,50 vs 0,77 ± 1,07 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,255). Aktywność podstawowa cyklazy guanylowej (przed stymulacją) nie różniła się istotnie pomiędzy sercami wydolnymi a niewydolnymi (2,187 ± 0,29 vs. 1,941 ± 0,59 pmol cGMP/min/mg białka, p = 0,175) pomimo istotnie zwiększonej ekspresji NP w niewydolności serca. Nie stwierdziliśmy też różnic w odpowiedzi receptorów na stymulację w zależności od etiologii niewydolności serca (p = 0,43 dla NPR-A, p = 0,94 dla NPR-B).

Receptor typu C przez wiele lat uważany był jedynie za komponentę układu klirensowego. Jednak wiele badań wskazywało na jego podwójną funkcję w (a) usuwaniu NP z krążenia, (b) w sygnałowaniu wewnątrzkomórkowym związanym ze szlakami cAMP i IP_3 i następowym efektem antyproliferacyjnym i wazodylatacyjnym. W naszym badaniu skupiliśmy się na aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych związanych z receptorem klirensowym w ludzkim sercu i naczyniach.

W ocenie szlaku cAMP w miokardium nie obserwowaliśmy hamowania aktywności AC po stymulacji NPR-C specyficznym agonistą, $cANF_{4-23}$, w stosunku do wartości podstawowych zarówno w sercach niewydolnych (79,14 ± 5,66 vs 81,33 ± 5,38 pmole cAMP/mg białka/min, p = 0,091), jak i wydolnych (85,58 ± 2,40 vs 85,16 ± 2,48 pmole cAMP/mg białka/min, p = 0,728). W obu grupach niespecyficzna, pozareceptorowa stymulacja AC za pomocą forskoliny powodowała oczekiwany efekt w postaci znamiennego wzrostu stężenia cAMP (odpowiednio: 118,23 ± 10,38 pmole cAMP/mg białka/min, p=0,003; 134,57 ± 12,63 pmole cAMP/mg białka/min, p = 0,001). Obserwowaliśmy również znamienne hamowanie AC za pomocą DDA zarówno w sercach niewydolnych (57,49 ± 8,09 pmole cAMP/mg białka/min, p = 0,007), jak i wydolnych (56,30 ± 4,13 pmole cAMP/mg białka/min, p < 0,001). Nie stwierdziliśmy różnic pomiędzy dwiema grupami w zakresie aktywności podstawowej (p = 0,72), odpowiedzi na stymulacji receptorowej za pomocą $cANF_{4-23}$ (p = 0,136), odpowiedzi na stymulację AC forskoliną (p = 0,379) oraz odpowiedzi na hamowanie AC przez DDA (p = 0,320).

W ocenie szlaku PLC w miokardium nie stwierdziliśmy istotnego wzrostu IP_3 po stymulacji receptora NPR-C za pomocą $cANF_{4-23}$ zarówno w sercach niewydolnych (0,70 ± 0,16 pmol IP_3/min/mg białka przed stymulacją i 0,73 ± 0,25 pmol IP_3/min/mg białka po stymulacji, p = 0,61), jak i w wydolnych (0,57 ± 0,04 pmol IP_3/min/mg białka przed stymulacją i 0,58 ± 0,10 pmol IP_3/min/mg białka po stymulacji, p = 0,87). Jednakże w sercach

niewydolnych podstawowa aktywność fosfolipazy była istotnie wyższa niż w sercach wydolnych ($p < 0,001$).

Podsumowując, zarówno w sercach wydolnych, jak i niewydolnych nie stwierdziliśmy odpowiedzi na stymulację NPR-C zarówno w zakresie aktywacji szlaku cAMP, jak i IP_3.

Druga droga eliminacji NP jest związana z neutralną endopeptydazą – niespecyficznym enzymem rozkładającym wazoaktywne peptydy, zlokalizowanym w błonach komórkowych, ale również obecnym krwioobiegu. Przeprowadziliśmy więc ocenę zmian ekspresji i aktywności tej drogi w niewydolnym mięśniu sercowym w porównaniu ze zdrowym miokardium.

Podczas gdy ekspresja NEP na poziomie białek pozostawała niezmieniona (205 ± 57,92 ng/mg białka w sercach wydolnych vs 218.48 ± 78.57 ng/mg białka w sercach niewydolnych, $p = 0,418$), aktywność NEP była istotnie wyższa u chorych z niewydolnością serca (5 424,08 ± 2 883,13 F/10μg białka/min) w porównaniu z sercami wydolnymi (1 951,77 ± 948,46 F/10μg białka/min) ($p = 0,002$). Zidentyfikowaliśmy również istotne różnice w sercowej ekspresji NEP w zależności od etiologii niewydolności serca – była ona istotnie wyższa w niewydolności serca o etiologii niedokrwiennej (262,43 ± 48,46 ng/mg białka) w porównaniu z nie-niedokrwienną (199,43 ± 82,03 ng/mg białka) ($p = 0,02$).

W przeciwieństwie do serc, w aortach pobranych od osób bez niewydolności serca obserwowaliśmy reakcję hamowania cAMP po stymulacji receptora NPR-C za pomocą $cANF_{4-23}$ (109,72 ± 16,58 pmole cAMP/mg białka/min przed stymulacją i 71,54 ± 11,14 pmole cAMP/mg białka/min po stymulacji, $p = 0,012$). W aortach pacjentów z NS miało miejsce paradoksalne zwiększenie aktywności cyklazy adenylowej po stymulacji $cANF_{4-23}$ (50,44 ± 3,04 pmole cAMP/mg białka/min przed stymulacją vs 57,68 ± 3,96 pmole cAMP/mg białka/min po stymulacji, $p = 0,027$). Podobnie jak w tkance pochodzącej z serca, w aortach obserwowaliśmy istotny wzrost stężenia cAMP po podaniu forskoliny w aortach z serc wydolnych i niewydolnych (odpowiednio: 155,12 ± 18,78 pmole cAMP/mg białka/min, $p = 0,012$; 138,51 ± 7,85 pmole cAMP/mg białka/min, $p < 0,001$) oraz znamienne zahamowanie jego produkcji po podaniu DDA (odpowiednio: 65,85 ± 11,75 pmole cAMP/mg białka/min, $p = 0,012$; 33,78 ± 2,60 pmole cAMP/mg białka/min, $p < 0,001$). Stwierdziliśmy istotne różnice pomiędzy aortami z serc wydolnych i niewydolnych w aktywności podstawowej AC ($p < 0,001$), w nasileniu i kierunku odpowiedzi na $cANF_{4-23}$ ($p < 0,001$) oraz nasileniu odpowiedzi na forskolinę ($p < 0,01$) i DDA ($p = 0,009$), które były znacznie silniej wyrażone w aortach z serc wydolnych.

Wnioski

W zaawansowanej NS ekspresja ANP i BNP istotnie wzrastała, zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji. Ekspresja mRNA dla CNP była istotnie zmniejszona, przy znamiennie wyższej zawartości CNP na poziomie białkowym, (może to sugerować zwiększoną pozasercową produkcję CNP w NS). Nie stwierdziliśmy wpływu etiologii na ekspresję peptydów natriuretycznych.

Ekspresja receptorów NPR-A i NPR-B nie uległa zmianie zarówno na poziomie mRNA, jak i białek, ekspresja NPR-C na poziomie mRNA była podwyższona, a ulegała obniżeniu na poziomie białkowym (może to wskazywać na modyfikację post-translacyjną lub zwiększony rozkład receptora podczas rozkładu NP - internalizacja i degradacja lizosomalna). Etiologia nie różnicowała ekspresji receptorów NPR-A/NPR-B, podczas gdy NPR-C wykazywał wyższą ekspresję (białko) w sercach z niedokrwienną niewydolnością serca.

W odniesieniu do funkcji receptorów dla peptydów natriuretycznych, w niewydolnym mięśniu sercowym stwierdziliśmy upośledzenie funkcji receptora NPR-A i brak zmian w funkcji NPR-B.

W ocenie funkcji sercowego receptora NPR-C nie obserwowaliśmy istotnego wpływu specyficznej stymulacji NPR-C na szlaki wewnątrzkomórkowe związane z cyklazą adenylową oraz fosfolipazą C zarówno w sercach wydolnych, jak i niewydolnych (może to wskazywać na pełnienie przez ten receptor funkcji klirensowej w sercu). W sercach niewydolnych obserwowaliśmy istotnie podwyższoną wyjściową aktywność fosfolipazy C, jednak wydaje się, że nie była ona regulowana za pośrednictwem receptora NPR-C.

W ocenie NEP stwierdziliśmy brak zmian w ekspresji tego enzymu między sercami wydolnymi a niewydolnymi oraz istotnie podwyższoną aktywność NEP w niewydolnym sercu (może być to potencjalnie czynnikiem sprzyjającym eliminacji peptydów natriuretycznych). W podziale na etiologie, stwierdziliśmy wyższą ekspresję NEP w uszkodzeniu serca o przyczynie niedokrwiennej.

Odmiennie niż w sercu, w aorcie specyficzna stymulacja receptora NPR-C skutkuje modyfikacją działania szlaku AC: w aortach pochodzących z serc wydolnych obserwowaliśmy hamowanie formowania cAMP, podczas gdy w aortach pochodzących z serc niewydolnych stwierdziliśmy wzrost cAMP. Również wyjściowa aktywność AC była

istotnie niższa w aortach z serc niewydolnych w porównaniu z wydolnymi, a odpowiedź AC na nieswoistą stymulację i hamowanie była istotnie zmniejszona.

Słowa kluczowe

peptydy natriuretyczne, receptory dla peptydów natriuretycznych, neutralna endopeptydaza, cyklaza guanylowa, cyklaza adenylowa, fosfolipaza C, niewydolność serca

Katarzyna Kodziszewska