

# Sphingolípíð og boðflutningar í hjartavöðvafrumum

Valgerður Edda Benediktsdóttir

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

**Ágrip** Markmið rannsóknarinnar var að kanna hlutverk sphingosíns í boðflutningum og stjórnun á starfsemi hjartans í rottum. Sphingosín er eitt af innanfrumu boðefnum sphingomyelín boðkerfisins, en áhrif þess eru ekki fullkönnuð í hjartavöðvafrumum. Áhrif sphingosíns á hjartsláttartíðni í lifandi svæfðum rottum og á samdráttartíðni í ræktuðum hjartavöðvafrumum voru mæld. Ennfremur voru könnuð áhrif sphingosíns á innanfrumustyrk cAMP í öörvuðum hjartavöðvafrumum eða frumum sem örvaðar höfðu verið með isoproterenoli (sem örvar beta-adrenerga viðtaka) eða forskolini (sem örvar adenylcyklasa). Niðurstöður sýndu að í svæfðu dýrunum olli sphingosín, gefið í æð, talsverðri lækkun á hjartsláttartíðni sem var háð skammtastærð sphingosíns, en gekk alveg til baka á 40-60 mínútum. Tíðni samdrátta í ræktuðum hjartavöðvafrumunum minnkaði og tíðniaukning eftir örvun með isoproterenóli varð líka minni í nærveru  $10\mu\text{M}$  sphingosíns samanborið við kontrólsýni. Formeðhöndlun ræktaðra hjartavöðvafruma með  $10\mu\text{M}$  sphingosíni olli lækkun á grunnstyrk cAMP og dró úr hækkun á innanfrumustyrk cAMP eftir örvun með isoproterenóli. Örvun á cAMP framleiðslu með forskolini varð ekki fyrir áhrifum frá sphingosíni og má því útiloka að lækkun á cAMP styrk í návist sphingosíns stafi af áhrifum þess á adenylcyclasa. Við allar mælingar á cAMP styrk var fosfódiesterasa hindri (IBMX) settur í ræktunarætið til að koma í veg fyrir niðurbrot á cAMP. Samantekt: Niðurstöður rannsóknarinnar benda til þess að sphingosín taki þátt í stjórnun á starfsemi hjartans með því að minnka hana og draga úr áhrifum örvunar beta adrenergra viðtaka. Sphingosín veldur lækkun á innanfrumustyrk cAMP, en hefur þó ekki áhrif á virkni adenylcyklasa.

## Inngangur

Öll starfsemi í líkama manna og dýra er háð því að skilaboð berist til viðkomandi líffæra um það hvaða störf skulu framkvæma og hvernig. Ákveðin starfsemi er háð vilja dýrsins, t.d. hreyfingar beinagrindarvöðva, en stór hluti hennar er það ekki, heldur stjórnast af ósjálfráða taugakerfinu (autonomic nervous system). Það eru annaðhvort utanaðkomandi áreiti eða ákveðnar aðstæður í líkamanum sem koma boðunum af stað í ósjálfráða taugakerfinu, en síðan berast boðin eftir sérstökum boðleiðum fyrir hverja tegund skilaboða. Þessu hlutverki gegna til dæmis taugar, innkirtlar, taugaboðefni, hormón, viðtakar og boðkerfi sem flytja boð milli fruma. Yfirstjórn og samræming boða fer fram í heiladingli, heilaberki og í fleiri líffærum sem tilheyra tauga- og innkirtavefjum.

Hér verður aðeins fjallað um rannsóknir á litlum hluta boðkerfa sem hafa hlutverki að gegna í starfsemi hjartans, þ.e. hafa áhrif í hjartavöðvafrumum. Adrenerga boðkerfið í hjartavöðvafrumum gegnir því hlutverki að koma boðum inn í frumurnar um að styrkur og tíðni hjartsláttar skuli aukinn. Upphaflegu boðin fara af stað við

streitu eða álag sem stafar t.d. af hræðslu, reiði, kulda, hita, súrefnissskorti, lágri glúkósu í blóði eða blóðþrýstingsfalli. Það sem veldur viðbrögðum hjá hjartavöðvafrumunum eru hormónin epinephrín (adrenalín) og norepinephrín (noradrenalín) sem losna frá nýrnahettumerg út í blóðið, en norepinephrín er einnig taugaboðefni. Þessi hormón tilheyra flokki efna sem kölluð eru katekolamín. Þau valda því að orkurík efni (fita, glycogen) eru losuð úr geymslum og orka þeirra nýtt í beinagrindar- og hjartavöðvafrumum. Blóðflæði til vöðva eykst en blóðflæði til meltingarfæra minnkar tímabundið.

Adrenergir viðtakar ná í gegnum frumuhimnu hjartavöðvafruma og bera boð frá hormóninu inn í frumuna. Hormónsameind tengist þeim hluta viðtakans sem er utan á frumunni, það veldur breytingu á lögun hans innan á himnunni og hann tengist þar svokölluðu G próteini. Við það fara af stað efnahvörf er valda losun á innanfrumuboðefni og það veldur svo viðbrögðum í frumunni. Epinephrín, norepinephrín og isoproterenól (sem ekki er myndað í líkamanum), virka mismunandi á hinar mismunandi tegundir adrenergra viðtaka. Aðaltegundir adrenergu viðtakanna eru alfa og beta viðtakar sem

svo skiptast í nokkra undirflokk. Þessir viðtakar hafa tvennskona boðkerfi: Alfa1 adrenergu viðtakarnir nota svokallað inosítólfosfatboðkerfi en hinir cAMP boðkerfi, en boðkerfin eru kennd við innanfrumuboðefni sín. Á Raunvísindastofnun hafa um árabil verið rannsökuð áhrif breytinga á samsetningu frumuhimnu á bindieiginleika adrenerga viðtaka. Í þessari rannsókn voru hins vegar skoðuð möguleg tengsl milli boðkerfis beta-adrenergra viðtaka og hins svokallaða sphingómýelínboðkerfis í hjartavöðvafrumum.

Sphingosín er eitt af innanfrumuboðefnum sphingomyelín boðkerfisins í mörgum frumutegundum. Nú standa yfir rannsóknir á áhrifum þess í hjartavöðvafrumum víða erlendis, en lengst eru rannsóknir komnar á frumulínum ræktuðum t.d. frá húð og nýrum manna. Þetta boðkerfi er ekki eins vel þekkt og adrenergu boðkerfin, enda tiltölulega nýuppgötvað. Við örvun þessa boðkerfis virkjast ensímið sphingomyelínasi sem klýfur fosfólípíðið sphingomyelín, sem situr í frumuhimnunni, í tvær minni sameindir sem eru innanfrumuboðefni, fosfórylkólín og ceramíð. Ceramíð getur svo líka orðið fyrir vatnsrofi með hjálp ceramíðasa og klofnar þá í sphingosín og fitusýru. Innanfrumuboðefnin ceramíð og sphingosín geta svo hvert um sig bundið fosfathóp með hjálp kínsa. Þannig myndast tvö mikilvæg boðefni í viðbót þ.e. ceramíð-1-fosfat og sphingosín-1-fosfat (1). Sphingosín-1-fosfat hefur mikið verið rannsakað undanfarin ár og menn hafa sýnt að það myndast í blóðflögum sem seyta því út í blóðið við örvun og að það er bindill fyrir G prótein tengda viðtaka, Edg viðtaka. A.m.k. fimm tegundir hafa fundist af þessum viðtökum og er boðkerfi flestra tegunda hans inositolþrífosfat, sem veldur kalsíumlosun inni í frumunum.

Beta adrenergu viðtakana í hjarta má örva sérhæft með isoproterenóli en in vivo eru það epinephrín eða norepinephrín (adrenalín og noradrenalín), sem örva þessa viðtaka. Gert er ráð fyrir að í rottuhjartanu séu að mestu beta1 adrenergir viðtakar og við örvun fer af stað flutningur boða sem hér segir: Viðtaki örvast við tengingu hormóns (breytir um lögun), virkjar G-prótein innan á himnunni, það örvar adenyl cyclasa, sem framleiðir cAMP, sem aftur örvar prótein kínsa A, en hann tengir fosfat á spennuháðu L-kalsíumjónagöngin og eykur þannig líkur á opnun þeirra við afskautun himunnar. Þessi losun kalsíumjóna ("trigger kalsíum") veldur losun margfalt fleiri kalsíumjóna úr frymisneti sem nægir til að auka kraft og tíðni hjartsláttarins.

Rannsóknir um miðjan tíunda áratuginn sýndu að sphingosín olli tíðni- og kraftminnkun og dró

úr losun á kalsíumjónum inn í hjartavöðvafrumur frá kanínum (2). Var talið að sphingosín minnkaði líkur á opnun spennuháðu L-kalsíumjónaganganna og hækkaði líka þröskuld kalsíumjónaganganna í frymisnetshimnu (ryanodín viðtakann) sem hvortveggja lækkar kalsíumstyrk inni í hjartavöðvafrumum (3). Í nýrri rannsókn kom svo í ljós að sphingosín hindrar tengingu ryanodíns á ryanodinvíðtakann (noncompetitive inhibition) með því að bindast sjálft beint á viðtakann (kalsíumjónagöngin) (4). Einnig hefur verið sýnt að frumuboðefnið (cytokín) TNF-alpha veldur framleiðslu á sphingosíni í hjarta og eru kraftminnkandi áhrif TNF-alpha, sem hafa verið þekkt um nokkurt skeið, skýrð með þessu (5,6,7).

Við fyrstu rannsóknir á innanfrumuáhrifum sphingosíns í hjartavöðvafrumum var þess gætt að gera frumurnar gegndræpar svo efnið kæmist inn í þær (2,3) en síðar hefur það sýnt sig að efnið kemst greiðlega í gegnum frumuhimnu sem gerir þessar ráðstafanir óþarfar (5,7). Forskolin sem örvar adenylcyclasa inni í frummum er einnig talið fara í gegnum frumuhimnu og er notað á svipaðan hátt og sphingosín (8). Sphingosín hefur áhrif innanfrumu en sphingosín-1-fosfat hefur yfirleitt áhrif utanfrumu með því að tengjast á Edg viðtökunum og eru áhrif þessara tveggja efna yfirleitt ólík, jafnvel gagnstæð. Sphingosín-1-fosfat getur líka haft áhrif innanfrumu, og hefur verið sýnt (þó ekki í hjartavöðvafrumum) að þau áhrif eru líka frábrugðin áhrifum sphingosíns (8).

Í rannsókn okkar voru könnuð áhrif sphingosíns á framleiðslu innanfrumuboðefnis beta-adrenergra viðtaka, cAMP, og á samdráttartíðni í ræktuðum hjartavöðvafrumum. Áhrif sphingosíns á tíðni hjartsláttar í lifandi svæfðum rottum voru einnig könnuð.

## Aðferðir

Hjartavöðvafrumur voru einangraðar úr hjörtum 3-5 daga gamalla rottunga, settar á ræktunardiska og ræktaðar í fjóra sólarhringa fyrir tilraunirnar (9). Oftast var notað isoproterenol til að örva frumurnar, en forskolin, sem örvar adenylcyclasa, var notað til að prófa hvort sphingosínið hefði áhrif á hann sérstaklega. Mældur var innanfrumustyrkur cAMP í hjartavöðvafrumum sem örvaðar höfðu verið með  $1\mu\text{M}$  isoproterenoli eða  $2-200\mu\text{M}$  forskolini og í óörvuðum hjartavöðvafrumum. Í öllum tilfellum var þetta gert eftir formeðhöndlun frumanna í næringaræti í 10-30 mín, með eða án  $5-10\mu\text{M}$  sphingosín. Gert er ráð fyrir að bæði sphingosín og forskolin komist greiðlega yfir frumuhimnuna og hafi áhrif inni í frumunum (5,7,8). cAMP styrkur í innanfrumuvökva hjartavöðvafruma var

mældur með tilbúinni aðferð frá Amersham. Við allar tilraunirnar var haft 1 mM 3-isobutyl-1-metylxantín (IBMX) í næringarætinu en það hindrar fosfódíesterasa ensím sem brjóta niður cAMP.

Samdráttartíðni í hjartavöðvafrumum var mæld á ræktunardiskum undir smásjá með vídeómyndavél. Við örvun var notað 5  $\mu$ M isoproterenol og lokastyrkur sphingosíns, þegar það var notað, var 10  $\mu$ M. Samdrættir frumanna voru greindir með hreyfiskynjara tengdum sérstöku tölvuforriti sem reiknaði tíðnina (10).

Svæfðum rottum var gefið sphingosín í skömmtunum 1 mg/kg og 2,5 mg/kg sem var leyst upp í 2% eða 4% Tween-80 (í sömu röð) eða aðeins leysiefnið í hálsbláæð og hjartsláttar tíðni mæld stöðugt í a. m. k. eina klukkustund. Dýrin fengu að jafna sig í 2 klst eftir hverja gjöf áður en næsta tilraun hófst (10), en öll dýrin gengust undir allar þrjár meðferðirnar.

### Niðurstöður

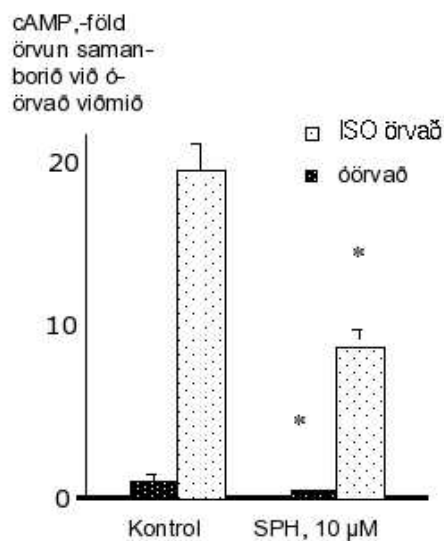
Formeðhöndlun ræktaðra hjartavöðvafruma með 10  $\mu$ M sphingosíni hindraði framleiðslu cAMP í frumunum eftir örvun með isoproterenóli og grunnstyrkur cAMP í óörvuðu frumunum lækkaði einnig í návist sphingosíns (mynd 1). Örvun á adenylcyclasa með 2, 10, 50, 100 eða 200  $\mu$ M af forskolinu leiddi til hækkunar á innanfrumustyrk cAMP sem var jafnmikil í frumum hvort sem þær voru formeðhöndlaðar með 10  $\mu$ M sphingosíni eða ekki. Því má útiloka að lækkun á cAMP styrk í návist sphingosíns stafi af áhrifum þess á adenylcyclasa beint. Á mynd 2 eru sýndar niðurstöður þar sem notað var 100  $\mu$ M forskolin. Þar sem fosfódíesterasa hindri var settur í ræktunarætið í öllum tilraununum ættu niðurstöður að vera ótruflaðar af breytingum á virkni fosfódíesterasa, sem hefði valdið niðurbroti cAMP (10).

Tíðni samdráttar í ræktuðum hjartavöðvafrumunum minnkaði óafturkræft og tíðniaukning eftir örvun með isoproterenóli varð líka minni ef frumurnar voru formeðhöndlaðar með sphingosíni samanborið við kontrólsýni (myndir 3 og 4) (10).

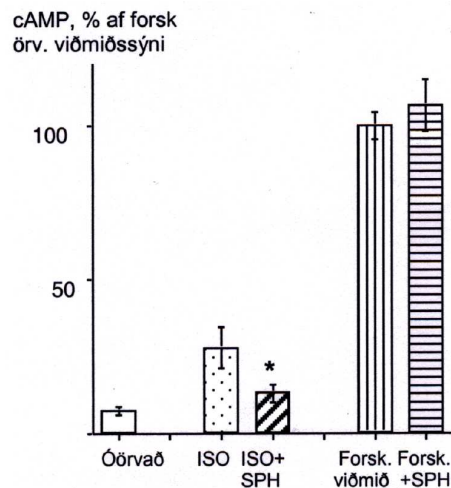
Í svæfðu rottunum olli sphingosín gjöf í bláæð talsverðri lækkun á hjartsláttartíðni og var lækkun þessi háð skammtastærð sphingosíns (mynd 5a). Tíðnin komst í fyrra horf á innan við klukkustund eftir gjöf (mynd 5b) (10).

### Umræða

Niðurstöður rannsóknarinnar benda til þess að sphingosín taki þátt í stjórnun á starfsemi hjartans með því að minnka hana og draga úr áhrifum örvunar á beta adrenerga viðtaka. Isoproterenól örvar beta



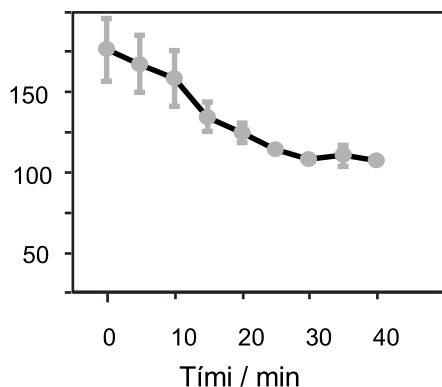
**Mynd 1.** Áhrif formeðhöndlunar hjartavöðvafruma úr nýfæddum rottum með 10  $\mu$ M sphingosíni (SPH) í 15 mín. á innanfrumustyrk cAMP í óörvuðum hjartavöðvafrumum (dökkar súlur) og í frumum sem örvaðar voru í 5 mín. með 1  $\mu$ M isoproterenoli (ISO, ljósar súlur) (meðaltal  $\pm$  SE, n = 4). \*-marktækur munur (p < 0.05) samanborið við samsvarandi frumur sem ekki voru forhitaðar með sphingosíni (ANOVA).



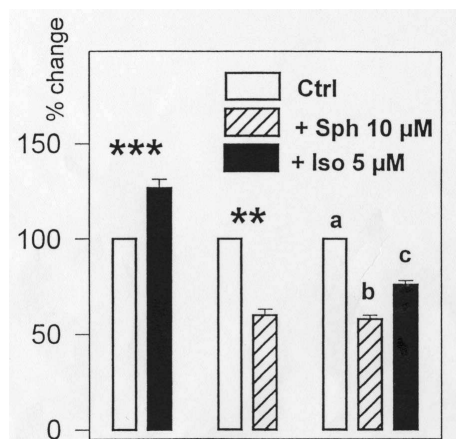
**Mynd 2.** Innanfrumustyrkur cAMP í hjartavöðvafrumum sem örvaðar höfðu verið með forskolinu (FORSK) eftir formeðhöndlun með 10  $\mu$ M sphingosíni (SPH) og án sphingosíns. Til samanburðar eru sýnd áhrif sphingosíns á cAMP styrk í frumum sem voru örvaðar með isoproterenoli (ISO) (meðaltal  $\pm$  SE, n = 6 - 9). \*-marktækur munur (p < 0.05) samanborið við ISO frumur sem ekki voru forhitaðar með sphingosíni (ANOVA).

adrenerga viðtaka sérhæft sem leiðir til margföldunar á innanfrumustyrk cAMP, innanfrumuboðefni

Samdrættir / min



**Mynd 3.** Samdráttartíðni í ræktuðum hjartavöðvafrumum úr rottum fyrstu 40 mínúturnar eftir að  $10\mu\text{M}$  sphingosíni var bætt í ræktunarætið. Áður höfðu frumur jafnað sig þar til stöðugri tíðni var náð. Sýndir eru samdrættir/mín (meðaltal  $\pm$  SE,  $n = 4-8$ ).

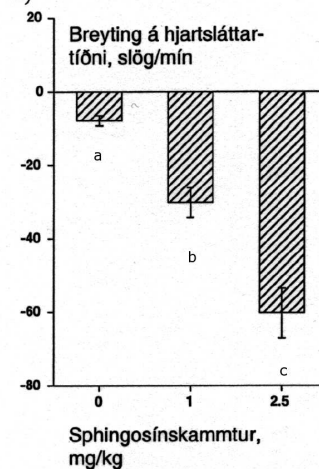


**Mynd 4.** Áhrif sphingosíns og isoproterenóls á samdráttartíðni hjartavöðvafruma. Frá vinstri: Áhrif  $5\mu\text{M}$  isoproterenóls (Iso og viðmið,  $n = 14$ ), áhrif  $5\mu\text{M}$  sphingosíns í 30 mín (SPH og viðmið,  $n = 8$ ), áhrif sphingosíns og sphingosíns + isoproterenól ( $n = 4$ , báðar súlurnar). Sýnt sem samdrættir/mín % af viðmiði (Ctrl, hvítar súlur) (meðaltal  $\pm$  SE; \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ , ANOVA); einnig er marktækur munur á súlum sem eru merktar með mismunandi bókstöfum ( $p < 0.01$ ) (ANOVA).

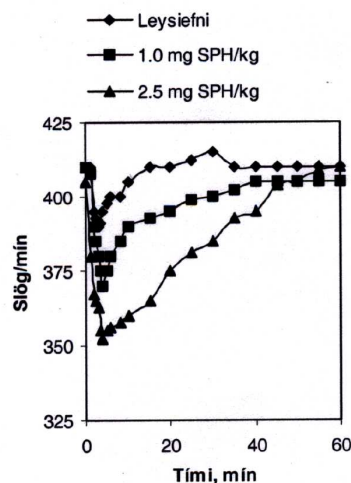
beta adrenergu viðtakanna, og þar með til aukningar á tíðni og krafti hjartsláttar. Sphingosín snýr þessu við og lækkar styrk cAMP í hjartavöðvafrumum háð tíma og skammtastærð sphingosíns (10).

Áhrif sphingosíns komu líka fram sem lækkun á tíðni samdráttar í ræktuðum hjartavöðvafrumum bæði grunn tíðni og tíðni eftir isoproterenól-örvun beta adrenergu viðtakanna. Líklegt er að þessi áhrif

a)



b)



**Mynd 5. a)** Lækkun á hjartsláttartíðni í svæfðum rottum, eftir að þær fengu aðeins leysiefni (2-4% Tween-80) eða sphingosín í skömmunum 1 eða 2.5 mg/kg líkamsþyngd, slög/mín (meðaltal  $\pm$  SE,  $n = 10$ ). Marktækur munur er milli súla sem merktar eru með mismunandi bókstöfum ( $p < 0.02$ , ANOVA fyrir endurteknaðar mælingar, Scheffe f-test).

**b)** Tímaferill breytinga á hjartsláttartíðni (slög/mínútu) í svæfðum rottum eftir inngjöf leysiefnis eða sphingosíns + leysiefnis í tilgreindum skömmum. Myndin sýnir eina tilraun af 10 sem gáfu svipaðar niðurstöður.

sphingosíns til lækkunar á samdráttartíðni hjartavöðvafruma í örvuðum og óörvuðum frumum séu tengd lækkuninni á innanfrumustyrk cAMP. Ætla má að lækkunin dragi úr virkjun spennuháðu L-kalsíumgangnanna og “trigger” kalsíum losun, sem leiðir til minni kraft- og tíðniaukningar en ella eftir örvun beta adrenergu viðtakanna með isoproterenoli í hjartavöðvafrumunum. Lækkun á hjartsláttartíðni í

lifandi rottum eftir sphingosínjöf (10) gæti einnig verið tengd lækkuninni á innanfrumustyrk cAMP. Ef svo er þá eru sphingosínáhrifin á hjartsláttartíðni svipuð *in vivo* og *in vitro*, en það á eftir að sanna.

Rannsóknin sýnir að áhrif sphingosíns á innanfrumustyrk cAMP beinast ekki beint að adenylcyclasa, þar sem sphingosín truflaði ekki örvun með forskolíni. Því eru líkur á að verkan sphingosíns beinist að beta adrenerga viðtakanum sjálfum eða að G-próteini hans. Mörg dæmi eru um rannsóknir á ýmsum frumutegundum sem sýna að sphingosín og fleiri sphingomyelín afleiður hafa áhrif á innanfrumustyrk cAMP, en hvernig og hvort það gerist fer eftir því hvaða frumutegund er um að ræða og efnin geta virkað sitt með hvoru móti í mismunandi frumum (11,12). Oft hafa efnin sér-tæk áhrif á tengingu eða aftengingu fosfats við ensím eða viðtaka (13) og boð frá sphingomyelin boðkerfinu hafa áhrif á önnur boðkerfi (crosstalk). Samantekt á rannsóknum á áhrifum sphingomyelin afleiða (1) sýndi að áhrif þessara sameinda á innanfrumustyrk cAMP beinast að bindilháðum viðtökum, bæði að grunnvirkni viðtakans og starfsemi eftir örvun. Þessi efni geta verkað á adenylcyclasa, fosfódiesterasa eða á undan adenylcyclasa á boðleið viðtakans. Rannsókn okkar á áhrifum sphingosíns á innanfrumustyrk cAMP í hjartavöðvafrumum er í samræmi við þessar rannsóknir.

Aðrar rannsóknir hafa sýnt að sphingosín veldur minnkun á krafti og samdráttartíðni í hjartavöðvafrumum frá ýmsum spendýrum og hefur áhrif til lækkunar á kalsíumstyrk inni í frumunum (2,3,4,5).

Okkar rannsókn sýndi sömu áhrif á samdráttartíðni í ræktuðum hjartavöðvafrumum. Áhrif sphingosíns til lækkunar á hjartsláttarhraða í dýrum *in vivo* hefur hins vegar ekki verið sýnd áður svo við vitum. Sýnt var að lækkunin á hjartsláttarhraða í rottunum gekk fljótt tilbaka sem er eðlilegt ef sphingosín hefur það hlutverk að stjórna starfsemi í hjartavöðvafrumum. Breyting á tíðni samdrátta af völdum sphingosíns í ræktuðum hjartavöðvafrumum gekk hinsvegar ekki tilbaka sem er ekki óeðlilegt því stjórnun á þessum viðburðum er eflaust ekki sá sami í frumum í rækt og frumum í lifandi vef.

Enn aðrar rannsóknir á hlutverki sphingosíns í hjartavöðvafrumum hafa sýnt að TNF alpha og sphingosín lækka innanfrumustyrk kalsíums og minnka frumusamdrátt í örvuðum hjartavöðvafrumum úr marsvíni (7). Ennfremur hefur verið sýnt í einangruðu rottuhjarta (með gegnumstreymi, “perfused”) að truflun á starfsemi hjartans við sýkingu (“septic cardiodepression”) framkallað með lipopolysakkaríðum, LPS, er mið-

að með aukinni framleiðslu á TNF alpha og sphingosíni (en ekki NO). LPS veldur aukinni nýmyndun á cyclooxygenasa-2 sem eykur framleiðslu tromboxans A<sub>2</sub> og prostacyclíns sem aftur stjórna aukningu á framleiðslu TNF alpha og þar með sphingosíns (14). Við athuganir á áhrifum sphingosíns þarf að hafa í huga að þeim sé ekki ruglað saman við innan- eða utanfrumuáhrif sphingosín-1-fosfats, eins og oft gerðist þegar rannsóknir á þessum boðefnum voru skammt á veg komnar. Líkur á þessu eru litlar nú, en þar sem sphingosínkínasi finnst í hjartavöðvafrumum er erfitt að útiloka það alveg. Ekki hefur verið sýnt að sphingosín-1-fosfat hafi áhrif á cAMP styrk í hjartavöðvafrumum, það hefur ekki áhrif á ryanodin viðtakann (4) og áhrif þess á tíðni og styrk samdrátta eru ósamhljóða sem gæti stafað af mismun í boðkerfum hinna ýmsu dýrategunda sem þau hafa verið rannsökuð í. Í rottum *in vivo* jók sphingosín-1-fosfat hjartsláttarhraða (15) öfugt við sphingosín í rannsókn okkar, en í marsvíni og kanínu hægði á slætti *in vitro*. Hvernig sphingosín veldur lækkun á innanfrumustyrk cAMP er að hluta til skýrt með þessari rannsókn þar sem í ljós kom að sphingosín hefur ekki áhrif á adenylcyclasa, en nánari skýringar á því hafa ekki fundist ennþá.

**Ályktun:** Niðurstöður rannsóknarinnar sýndu að sphingosín dregur úr hjartsláttartíðni *in vivo* og tíðni samdrátta hjartavöðvafruma ræktuðum úr nýfæddum rottum. Sphingosín veldur lækkun innanfrumustyrks cAMP í hjartavöðvafrumum eftir örvun með isoproterenóli og í öörvuðum frumum án þess að hafa áhrif á adenylcyclasa ensímið beint. Þetta gæti tengst hlutverki sphingosíns í stjórnun á dempun boðkerfis sem er örvað af isoproterenoli eins og til dæmis boðleið beta1 adrenergra viðtaka.

## Þakkir

Rannsóknin var unnin fyrir styrki frá Vísindasjóði Rannís og frá Rannsóknarsjóði Háskóla Íslands.

**Summary:** The purpose of this study was to examine the role of sphingosine in signalling and control of the heart function. Sphingosine is one of the intracellular signalling molecules of the sphingomyelin signal transduction system, and its effects in heart muscle cells has not been fully elucidated. The effect of sphingosine on heart rate in anaesthetized rats and on contraction rate in cultured neonatal cardiomyocytes was measured. Furthermore the effect of sphingosine on the intracellular cAMP (the second messenger of  $\beta$ -adrenoceptors) concentration was examined in unstimulated cardiomyocytes and in cardiomyocytes stimulated with isoproterenol (stimulates  $\beta$ -adrenoceptors) or forskolin (acti-



vates adenylcyclase). The results showed that sphingosine administered as one dose in the jugular vein decreased the heart rate dose-dependently in anaesthetized rats and returned to normal within 40-60 min. It was also demonstrated that  $10\mu\text{M}$  sphingosine in the cell medium caused a reduction in the beating rate of the cardiomyocytes and a decrease in the chronotropic effect of isoproterenol in the cells compared with control cells. Preincubation of the cardiomyocytes with  $10\mu\text{M}$  sphingosine caused a decrease in basal and isoproterenol-stimulated intracellular cAMP levels. The forskolin-stimulated increase in intracellular cAMP levels was not affected by sphingosine preincubation which indicates that sphingosine has no influence on adenylcyclase. A phosphodiesterase inhibitor (IBMX) was used in all experiments in which cAMP was measured excluding effects on cAMP breakdown. The results indicate that sphingosine has a role in the control of cardiac function in rats as it decreases the beating rate and the chronotropic response to  $\beta$ -adrenergic agonists. Sphingosine causes a decrease in the intracellular cAMP level in cardiomyocytes but has no influence on adenylcyclase activity.

### Heimildir

- [1] L. Riboni, P. Viani, R. Bassi, A. Prinetti, G. Tettamanti, The role of sphingolipids in the process of signal transduction, review. *Progr Lip Res* **36**(2/3), 153-195 (1997).
- [2] R.J. Webster, R.A. Sabbadini, C.A. Dettbarn, and P.J. Paolini, Sphingosine effects on the contractile behavior of skinned cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 1273-1290 (1994).
- [3] P.M. McDonough, K. Yasui, R. Betto, G. Salvati, C.C. Glembotski, P.T. Palade, R.A. Sabbadini, Control of Cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  Levels. Inhibitory actions of sphingosine on  $\text{Ca}^{2+}$  transients and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel conductance. *Circ. Res.* **75**, 981-989 (1994).
- [4] C. Sharma, T. Smith, S. Li, G.J. Schoepfer, D.H. Needleman, Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) activity by sphingolipid bases: mechanism of action. *Chem. Phys. Lipids*, **104**(1), 1-11 (2000).
- [5] H. Oral, G.W. Dorn 2nd, D.L. Mann, Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* **272**(8), 4836-42 (1997).
- [6] U. Muller-Werdan, H. Engelmann, K. Werdan, Cardiodepression by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Eur. Cytokine Netw.* **9**(4), 689-91(1998).
- [7] K. Sugishita, K. Kinugawa, T. Shimizu, K. Harada, H. Matsui, T. Takahashi, T. Serizawa, O. Kohmoto, Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF- $\alpha$  on excitation-contraction coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 1457-1467 (1999).
- [8] J.R. Van Brocklyn, M-J. Lee, R. Menzeleev, A. Olivera, L. Edsall, O. Cuvillier, D.M. Thomas, P.J.P. Coopman, S. Thangada, C.H. Liu, T. Hla, S. Spiegel, Dual actions of sphingosine-1-phosphate: Extracellular through the  $\text{Gi}$ -coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell. Biol.* **142**, 229-240 (1998).
- [9] J.A. Post, G.A. Langer, J.A. Op den Kamp, A.J. Verkleij, Phospholipid asymmetry in lipid sarcolemma. Analysis of intact cells and "gas dissected" membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **943**, 256-266 (1988).
- [10] V.E. Benediktsdóttir, A.M. Jónsdóttir, B.H. Skúladóttir, A. Grynberg, J.Ó. Skarphéðinsson, J. Helgason, S. Guðbjarnason, Sphingosine modulation of cAMP levels and beating rate in rat heart. *Fund. Clin. Pharmacol.* **16**, 495-502 (2002).
- [11] H. Zang, N. N. Desai, J. M. Murphy, S. Spiegel, Increases in phosphatidic acid levels accompany sphingosine-stimulated proliferation of quiescent Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **265**, 21309-21316 (1990).
- [12] S. Pyne, N.J. Pyne, The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth muscle. *Biochem. J.* **315**, 917-923 (1996).
- [13] A.H. Merrill, C.C. Sweeley, Sphingolipids: Metabolism and cell signaling, in: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. D.E. Vance and J.E. Vance (eds.), Elsevier Science B. V. Amsterdam, the Netherlands, pp. 309-339 (1996).
- [14] U. Grandel, L. Fink, A. Blum, M. Heep, M. Buerke, H.-J. Kraemer, K. Mayer, R. M. Bohle, W. Seeger, F. Grimminger, U. Sibelius, Endotoxin induced myocardial tumour necrosis factor- $\alpha$  synthesis depresses contractility of isolated rat hearts. Evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2 derived thromboxane production. *Circulation* **102**, 2758-2764 (2000).
- [15] A. Sugiyama, N.N. Aye, Y. Yatomi, Y. Osaki, K. Hashimoto, Effects of sphingosine-1-phosphate, a naturally occurring biologically active lysophospholipid, on the rat cardiovascular system. *Jpn. J. Pharmacol.* **82**, 338-342 (2000).

**Um höfundinn:** Valgerður Edda Benediktsdóttir er með BS próf í efnafræði frá Gautaborgarháskóla, MS próf í lífefnafræði frá Háskóla Íslands og hefur nú lagt fram doktorsritgerð til Raunvísindadeildar. Hún starfar sem fræðimaður við Lífefnafræðistofu Raunvísindastofnunar Háskólans.

---

Raunvísindastofnun Háskólans  
Læknagarði, Vatnsmýrarveg 16, IS-101 Reykjavík  
eb@raunvis.hi.is  
Móttekin: 28. apríl 2004