

Zárójelentés

A rezisztencia erek simaizom sejtjein található magas konduktanciájú Ca^{2+} aktiválta K^+ (BK_{Ca}) csatorna az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megemelkedése vagy a sejtmembrán depolarizációja által aktiválódik. A simaizom sejt membránon a BK_{Ca} csatorna nyitáskor a K^+ áram fokozódása a membránpotenciál hiperpolarizációjához vezet, ami a feszültség-függő Ca^{2+} csatorna zárásán és így a Ca^{2+} belépés csökkenésén keresztül vazodilatációt eredményez. Ezek alapján a BK_{Ca} csatorna alapvető szerepet tölt be az ér simaizom tónusának szabályozásán keresztül a teljes perifériás rezisztencia és a vérnyomás szabályozásában. Bár részletes információval rendelkezünk a BK_{Ca} csatorna élettani szerepéről az érfal tónusának szabályozásában, nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre erről az ioncsatorna működéséről az erektilis szövetben illetve diabetes mellitusban (DM).

Viszonylag új megfigyelés, hogy az erektilis diszfunkció egy szisztémás vaszkuláris károsodással járó megbetegedés első klinikai tünete lehet. Ennek magyarázatául az szolgálhat, hogy míg a rezisztencia típusú intracavernosus artéria 50%-os szűkülete esetén már manifeszt erektilis diszfunkció mutatható ki, addig a konduktancia típusú femoralis vagy carotis artéria hasonló mértékű obstrukciója még nem mindig vált ki perifériás (claudicatio intermittens) vagy cerebrovaszkuláris (stroke) tüneteket. Ebből következően a pénisz rezisztenciarek aktivitásának vizsgálata *in vitro* -különösen egyéb szisztémás rezisztencia típusú erekkel összehasonlítva-, valamint az erektilis funkció vizsgálata *in vivo* részletes adatokkal szolgálhat a DM-re jellemző vaszkuláris károsodás kialakulását illetően.

A BK_{Ca} csatorna szerepe az áramlás indukálta vaszkuláris relaxációban patkány pénisz rezisztencia éren

Az áramlás fokozódásával párhuzamosan növekvő nyírófeszültség vazodilatációt okoz, amelynek hátterében az endotheliumból felszabaduló értágító hatású vegyületek állnak, mint pl. a nitrogén monoxid (NO) és az endothelium-eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF). Ráadásul az agonista (acetilkolin) és az áramlás által kiváltott érrelaxáció hátterében különböző mechanizmusok állhatnak, annak ellenére, hogy mindkét folyamat kulcspontja az endothelium. Így munkámban izgalmasnak tűnt ezen folyamatok vizsgálata, illetve a BK_{Ca} csatorna szerepének vizsgálata ezen folyamatokban.

Kontroll Wistar patkányból izolált dorzális pénisz artérián kimutattam az endothelium szerepét az áramlás (infúziós pumpa segítségével létrehozott különböző sebességű áramlás)

által létrehozott érrelaxációban. A kísérletek során alacsony ($6-40 \mu\text{L}/\text{perc}$ sebesség = $5,5 \text{ din}/\text{cm}^2$) és magas ($15-120 \mu\text{L}/\text{perc}$ sebesség = $22 \text{ din}/\text{cm}^2$) nyírófeszültség hatását vizsgáltam az endothelium-függő érválaszban.

Megállapítottam, hogy míg az acetilkolin (ACh) relaxáció NO-mediált, addig az áramlás-indukált értónuscsökkenés EDHF-függő, ez utóbbi folyamatban az NO/prosztanoid komponensek nem vesznek részt. A BK_{Ca} csatorna szelektív gátlószere, az Iberiotoxin (IbTX) gátolta a lassú, de nem a gyors áramlás kiváltotta értónuscsökkenést. Kimutattam, hogy az endotheliumon található alacsony és magas konduktanciájú K_{Ca} csatornákon túl a simaizom sejteken kimutatható BK_{Ca} csatorna aktiváció is nélkülözhetetlen az endothelium-függő relaxáció kialakulásában.

A kísérleteinkben megfigyelt, mind az agonista, mind az áramlás kiváltotta vaszkuláris relaxáció jelenléte megegyezik az irodalomban leírtakkal, azonban a fajok közti, valamint a szöveti különbségeket figyelembe kell venni. Nevezetesen, míg kísérleteinkben a patkányból izolált dorzális pénisz artérián az áramlás kiváltotta relaxáció EDHF közvetített, addig humán corpus cavernosum-ból izolált és tenyésztett endothelium sejtekből az áramlás NO felszabadulását okozza. Patkány intracavernosus artérián az ACh relaxáció EDHF-függő, ellentétben a kísérleteinkben a dorzális pénisz artérián kimutatott NO függéstől.

A BK_{Ca} csatorna szerepét az áramlás indukálta relaxációban kimutatták humán koronára arteriolákon *in vitro* és patkány retina arteriolákon *in vivo*. Azonban a munkacsoportunknak sikerült kimutatni pénisz szöveten a BK_{Ca} csatorna jelentőségét az áramlás kiváltotta endothelium-függő relaxációban.

Az eredményekből közlemény született, mely a *Journal of Sexual Medicine* c. folyóiratban került publikálásra.

A BK_{Ca} csatorna szerepe az endothelium függő és független relaxációban humán pénisz rezisztencia éren

A fentebb részletezett eredményekből, illetve a korábbi munkáimból és a rendelkezésre álló néhány irodalmi adatból egyértelműen kitűnik, hogy a BK_{Ca} csatorna fontos szerepet játszik az erektilis funkció szabályozásában, azonban nagyon kevés adat áll rendelkezésre a csatorna szerepéről humán pénisz szövetre vonatkozóan. A kísérleteim során lehetőségem nyílt férfi – nő nemi átalakító műtét során fel nem használt pénisz szövetének vizsgálatára. A vizsgált minták sajátossága, hogy fiatal (átlag életkor 27 év) egészséges férfiakból származnak, akik nem szenvedtek kardiovaszkuláris betegségben, így krónikus gyógyszeres

kezelésben sem részesültek. Ez mindenképpen ritkaságnak számít, hiszen a kutatásokban használt humán minták nagy általánosságban patológiás szövetből származnak. Így vizsgálataim egyértelműen adatot nyújtanak a BK_{Ca} csatorna szerepéről a pénisz szabályozásában fiziológiás körülmények között.

Humán pénisz szövetből izolált intracavernosus artérián megállapítottam, hogy az endothelium-függő acetilkolin (ACh) érrelaxáló hatásában a nitrogén monoxid (NO)/prosztanoid komponenseken kívül az endothelium-eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) is szerepet játszik. Ez megegyezik korábbi megfigyelésekkel, ugyanis humán, patkány, ló és nyúl pénisz szövetből izolált különböző rezisztencia ereken az ACh értágító hatásában a mind az NO, mind az EDHF szerepét leírták.

Bár a BK_{Ca} csatorna jelenlétét patch-clamp elektrofiziológiai módszerek alkalmazásával kimutatták humán corpus cavernosum-ból izolált simaizom sejteken, valamint megállapították corpus cavernosum simaizomcsíkon a funkcionális szerepét, azonban humán pénisz éren még nem vizsgálta más munkacsoport a BK_{Ca} csatorna funkcionális szerepét. Kísérleteimben a BK_{Ca} csatorna gátló IbTX gátolta mind az NO/prosztanoid-, mind az EDHF-mediált relaxációt, valamint az endothelium-független nitroprusszid-nátrium (SNP) kiváltott tónuscsökkenést. Továbbá az IbTX jobbra tolta az NS11021, szelektív BK_{Ca} csatorna aktivátor, által létrehozott érrelaxációt. Az NS11021 egy viszonylag új, alacsonyabb koncentráció-tartományban (1 μ M-ig) szelektív BK_{Ca} csatorna aktivátor, melynek vazodilatációs hatását az IbTX teljesen megszüntette a BK_{Ca} csatornára szelektív koncentráció-tartományban. Ráadásul az NS13558, amely a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 biológiailag inaktív homológja és szerkezetileg nagyon hasonló az NS11021-hez, nem okozott jelentős értónuscsökkenést az NS11021-gyel összehasonlítva.

Kísérleteimből egyértelműen megállapíthatjuk, hogy humán intracavernosus artérián, fiziológiás körülmények között a BK_{Ca} csatorna fontos szerepet játszik mind az endothelium-függő, mind az endothelium-független relaxáció kialakulásában. A BK_{Ca} csatorna aktivátorai így eredményesen használhatók az erektilis diszfunkció kezelésére.

Az eredményekből közlemény született, mely a *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* c. újságban került publikálásra.

Diabetes mellitus hatása a vaszkuláris funkcióra

A kardiovaszkuláris események kialakulása a vezető halálok diabetes mellitusban (DM) szenvedő betegeknél. DM-ben a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázata többször magasabb egészséges egyénekhez viszonyítva. A diabetesre jellemző tünetek kialakulásában a vaszkuláris károsodás alapvető szerepet játszik. A kóros érválasz mechanizmusának vizsgálatakor kimutatták az endotheliális, a simaizom és a neuronális működés károsodását. Az endothelium károsodását, melyre jellemző az endotheliális NO csökkent termelése, kimutatták 1-es, és 2-es típusú DM-ben, valamint csökkent glukóz toleranciában a klinikailag kimutatható vaszkuláris károsodás kialakulása előtt. Gyulladásos folyamatok szintén kimutathatók DM-ben és endotheliális diszfunkcióban. Az endothelium eredetű relaxáló faktorok csökkent felszabadulása fokozza a simaizom kontrakciót okozó anyagok hatását, továbbá a magas glukóz koncentráció az ér simaizom sejtek proliferációjához vezethet *in vitro*. A pénisz rezisztencia erek vizsgálata különösen fontos lehet a diabetes-es vaszkuláris károsodás vizsgálata szempontjából (lásd a Zárójelentés bevezető része). A diabetes-t érintő vizsgálataimból még nem született közlemény (írásuk folyamatban van), ezért a fentebbieknél részletesebb szakmai jelentést írok.

A patológiás modell beállítása és az erek preparálása

Az 1-es típusú diabetes mellitusban jellemző vaszkuláris zavar kialakulásához streptozotocin (50 mg/kg) intraperitonealis injekcióval létrehozott diabetes-es patkánymodellt használtam. A streptozotocin a pancreas inzulint termelő β -sejtjeinek károsodását okozza, így az endogén inzulin hiányában a vércukorszint megemelkedéséhez vezet. A kísérletekhez a streptozotocin injekciót követő héten mért vércukorszint-emelkedéstől számított 12-14 hetes diabeteses Sprague-Dawley patkányokat használtam. Korábbi kísérleteimben megállapítottam, hogy a vércukorszint (22-24 mmol/L) 8 hetes megemelkedése nem vezetett erektilis diszfunkció kialakulásához (nem közölt eredmény), ezért választottam kísérleteimhez a diabetes fennállásának 12-14 hetes időtartamát. Az állatoknál a vércukorszintet és a testtömeget éhomi állapotban mértem a streptozotocin injekció előtt. A DM kialakulását a következő héten megismételt vércukorszint mérése igazolta: 15 mmol/L alatti érték esetén az állatokat kizártam a vizsgálatok folytatásából, e fölötti érték esetén az állatokat 12-14 hétig megfelelő körülmények között (táp, folyadék *ad libidum*) tartottam.

A diabetesben szignifikánsan megemelkedett a vércukorszint a kiindulási értékhez (0. hét) képest (***) $p < 0.001$), míg a testtömeg szignifikánsan csökkent (*) $p < 0.05$). A Kontroll csoportban a testtömeg jelentősen megemelkedett (***) $p < 0.001$), azonban az éhomi

vércukorszint változatlan maradt (4.5 vs 4.1 mmol/L). A vizsgálatok elején a Diabetes-es csoport nem különbözött a Kontroll csoporthoz képest, azonban a kezelés 12. hetére megemelkedett a vércukorszint (#### $p < 0.001$) és csökkent a testtömeg (#### $p < 0.001$) a Kontroll csoporthoz viszonyítva. Az eredmények megegyeznek az irodalomban leírtakkal, és az 1. táblázatban vannak összefoglalva.

	Kontroll		Diabetes	
Kezelés (hét)	Testsúly (g)	vércukor (mmol/L)	Testsúly (g)	vércukor (mmol/L)
0.	269±4	4.2±0.1	278±6	4.9±0.3
12.	472±13 ***	4.5±0.1	253±11 * ####	27.0±0.7 *** ####

1. Táblázat. A testtömeg és a vércukorszint változása a kezelés ideje alatt Kontroll és Diabetes-es csoportban. * 12. hét vs. 0. hét; # Diabetes vs. Kontroll; * $p < 0.05$, ***, #### $p < 0.001$.

A kísérletekhez pénisz ér (intracavernosus (ICA) és dorzális pénisz artéria (DPA)), mezenterialis artéria (MA, 3-4. oldalág) és koszorúér (bal leszálló koszorúér, LAD) preparátumokat használtam. Diabetes-ben a testtömeg csökkenésével az érátmérő is kis mértékben csökkent (nem szignifikáns, $p > 0.05$), azonban mezenterialis preparátumon (MA) az érátmérő jelentős növekedése (***) figyelhető meg (2. Táblázat).

	Érátmérő (µm)			
	ICA	DPA	MA	LAD
Kontroll	244±7	270±9	352±8	465±24
Diabetes	227±6	249±13	449±13 ***	408±13

2. Táblázat. Érátmérő a Kontroll és Diabetes-es patkányokból izolált különböző erekben.

DM hatása az endothelium-függő relaxációra

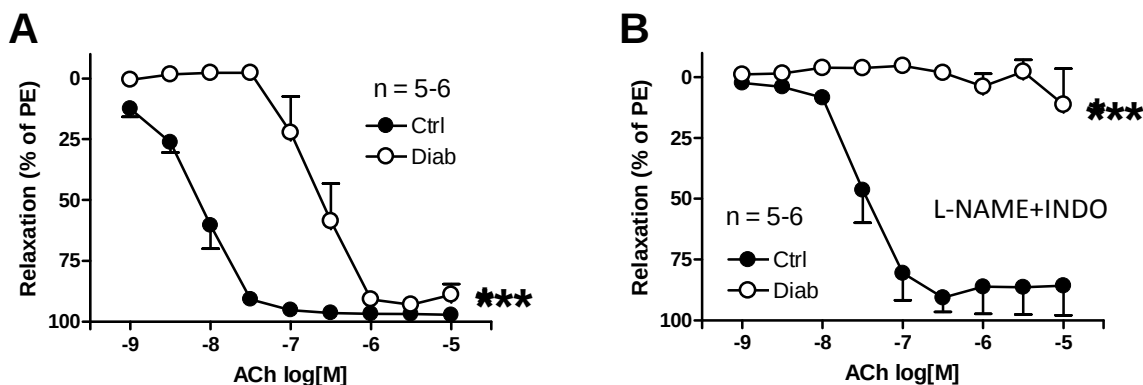
Az endothelium-függő értágító acetilkolin (ACh) által kiváltott, nitrogén monoxid (NO)-mediált érrelaxáció maximuma és a dózis-hatás görbe lefutása (pD_2 értéke) ICA és DPA preparátumokon nem különbözött egymástól kontroll és diabéteszes körülmények között

($p > 0.05$). Míg az EDHF részt vesz ICA preparátumon az NO/prosztanoid komponens mellett az ACh kiváltotta relaxáció kialakulásában, addig DPA szöveten az ACh értágító hatásában csak az NO vesz részt. Ezek a megfigyelések megegyeznek a korábbi kísérleteinkkel, ugyanis patkány intracavernosus artérián az alacsony koncentrációjú ACh ($1 \mu\text{mol/L}$) által létrehozott relaxáció NO és EDHF közvetített (Kun és mtsai, Eur J Pharmacol, 2003; 474:103-115), míg dorzális artéria esetében csak az NO vesz részt az endothelium-függő ACh-indukálta relaxációban (Olav és mtsai, J Sex Med 2012; 9:1789–1800). Kísérleteinkben az ACh relaxáció maximuma nem változott Diabetes-ben a Kontrollhoz viszonyítva. Ez a megfigyelés megegyezik a korábbi vizsgálatainkban tapasztaltakkal, ahol Zucker Diabetic Fatty patkányból izolált corpus cavernosum szöveten az ACh relaxáció maximuma nem különbözött egymásól (Olav és mtsai, J Sex Med 2012; 9:1789–1800). Ezzel ellentétben, Obese Zucker patkányból izolált pénisz artérián az ACh relaxáció károsodását mutatták ki (Villalba és mtsai, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 297(2):H696-707). Az eredmények magyarázata az lehet, hogy diabetes-ben megnövekedhet az értágító proszttaglandinok szintézise, amelyek fenntarthatják az endothelium-függő relaxációt (Sanchez és mtsai, Atherosclerosis 2010; 213:392–9).

Hasonlóan az ICA és DPA preparátumokhoz, LAD preparátum esetében a diabetes nem befolyásolta az ACh relaxáció maximumát vagy érzékenységét, és az endothelium-függő relaxáció teljes mértékben NO-függő volt. Ez a megfigyelés megegyezik az inzulin-rezisztens Obese Zucker patkányból izolált koszorúér eredményekkel, miszerint az NO-mediált ACh relaxáció nem változott a kontroll Lean patkányhoz viszonyítva (Villalba és mtsai, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 297(2):H696-707). Az Obese Zucker patkány magas vércukorszinttel, inzulinszinttel és abnormális lipidértékekkel rendelkezik. Bár ez a modell 2-es típusú DM-hez áll közelebb, azonban a koszorúéren kapott eredményeket tekintve nagy hasonlóságot mutat a vizsgálatainkban alkalmazott streptozotocin-indukálta diabeteses modellben kapott eredményekkel. Hasonló eredményeket mutatott ki munkacsoportunk is kutya koszorúér preparátumon, ahol az alloxan injekcióval kiváltott diabetes nem befolyásolta az ACh relaxációnak sem a maximumát, sem az érzékenységét (Pataricza és mtsai, Acta Physiol (Oxf). 2008; 194(1):35-43).

A koszorúér és a pénisz érpreparátumokkal ellentétben a mezenteriális artéria nagyfokú érzékenységet mutat a vércukorszint emelkedésére. Tartósan magas vércukorszint esetén, kísérleteinkben bár az ACh relaxáció maximuma nem változik, a görbe azonban erősen jobbra tolódik (1. Ábra, A). Ráadásul megváltozik az endotheliális mediátorok szerepe is az ACh-indukált relaxációban: míg az NO és ciklooxygenáz gátlás alig befolyásolta kontroll

körülmények között a relaxációt, addig Diabetes-ben teljesen megszüntette azt (1. ábra, **B**). Ez egyértelműen arra enged következtetni, hogy diabetesben a tartósan magas vércukorszint hatására az endothelium-függő relaxációban az EDHF szerepét az NO veszi át.

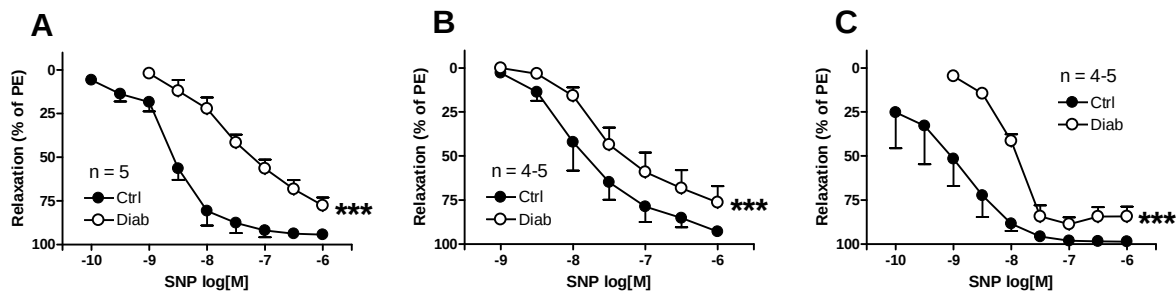


1. ábra. Diabetes (**A, B**) és kombinált NO - ciklooxygenáz gátlás (L-NAME+INDO, **B**) hatása az endothelium-dependens relaxációra. *** $p < 0.001$ (two-way ANOVA)

Az eredményeink megegyeznek a korábban mások által kimutatottakkal, miszerint a mezenterialis artérián sem a ciklooxygenáz gátlás, sem az NO-szintetáz gátlás nem befolyásolta az ACh relaxációt (Thorsgaard és mtsai, Br J Pharmacol 2003; 138:1562–1570). Ráadásul a streptozotocin indukálta diabetes-ben az ACh érzékenysége MA preparátumon jobbra tolódott, hasonlóan a vizsgálataimhoz, valamint az NO- és az EDHF-típusú relaxáció is károsodott (Leo és mtsai, Br J Pharmacol 2011; 162:365–377).

DM hatása az endothelium-független relaxációra

A nitroprusszid-nátrium (SNP) az endotheliumtól független módon képes vazorelaxációt kiváltani. Kísérleteinkben ICA (2. ábra, **A**), DPA (2. ábra, **B**) és MA (2. ábra, **C**) érpreparátumokon az SNP dózis-hatás görbéje jobbra tolódott és a hatásmaximuma is csökkent diabéteszes körülmények között. Ezzel szemben LAD szöveten sem az SNP hatásmaximuma, sem az érzékenysége nem különbözött egymástól kontroll és diabéteszes szövetben.

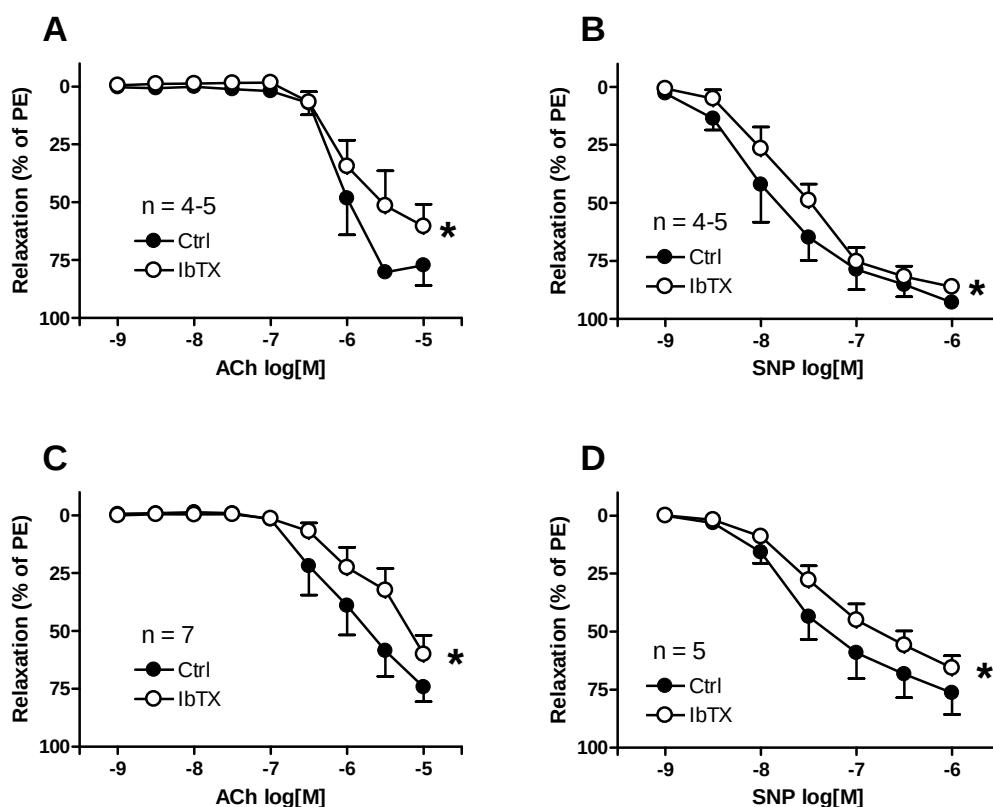


2. ábra. Diabetes hatása az endothelium független relaxációra ICA (A), DPA (B) és MA (C) preparátumokon. *** $p < 0.001$ (two-way ANOVA)

Kísérleteinkben az SNP relaxáció maximuma és érzékenysége csökkent mindkét pénisz éren, ami megegyezik a különböző diabetes-es patkánymodellekből (Cartledge és mtsai, BJU International 2001; 87: 394-402; Carneiro és mtsai, J Sex Med. 2010; 7(11): 3620–3634) izolált corpus cavernosum simaizom csíkon kapott eredményekkel, miszerint a diabetes károsította az erektilis szöveten az SNP relaxációt. Ezzel szemben a diabetes nagyon vegyes hatást mutat az irodalomban a mezenterialis és koszorúerek endothelium-független relaxációjára. Kísérleteinkben az SNP relaxáció csökkenése figyelhető meg mezenterialis artérián, ami hasonló a spontán diabetes-es patkányokból izolált mezenteriais éren kapott eredményekhez (Heygate és mtsai, Br J Pharmacol 1995; 116: 3251-3259). Ezzel ellentétben, a streptozotocinnal kiváltott diabetes-es patkányból izolált mezenterialis artérián az SNP relaxációnak sem a maximuma, sem az érzékenysége nem változott (Leo és mtsai, Br J Pharmacol 2011; 162:365–377). Bár itt mindenképpen érdemes megjegyezni, hogy míg ez utóbbi kísérletben a streptozotocin injekciótól számított 10 hetes állatokból izolált mezenterialis artérián vizsgálták az SNP hatását, addig kísérleteimben a magas vércukorszint kialakulásától számított 12-14 hetes diabetes-es állatokat használtam. Így a modell időtartamát tekintve 3-5 hetes különbség van a diabetes fennállásában és ez magyarázhatja a talált különbséget. Hasonló különbség van az irodalomban a koszorúér reaktivására is SNP esetében. Kísérleteimben patkány koszorúéren a diabetes nem befolyásolta az SNP relaxációt, ami hasonló a streptozotocinnal indukált diabete-es patkányból izolált koszorúéren kapott eredményekkel (Delbin és mtsai, PLoS One 2012; 7(12): e53318). Ezzel szemben, míg sertés és humán koszorúér preparátumon a diabetes csökkentette az SNP relaxációt (Clements és mtsai, Microcirculation, 2009; 16(2):193–206), addig munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban kutyából izolált koszorúér preparátumon az SNP relaxáció érzékenysége szignifikánsan fokozódott, bár a relaxáció maximuma nem változott (Pataricza és mtsai, Acta Physiol (Oxf). 2008; 194(1):35-43).

DM hatása a BK_{Ca} csatorna funkcióra

Intracavernosus artérián a szelektív BK_{Ca} csatorna gátló Iberitoxin (IbTX, 10⁻⁷M) gátolta az endothelium-függő (3. ábra A, C) és független (3. ábra B, D) értágítók hatását mind kontroll (3. ábra A, B), mind diabetes-es (3. ábra C, D) körülmények között.

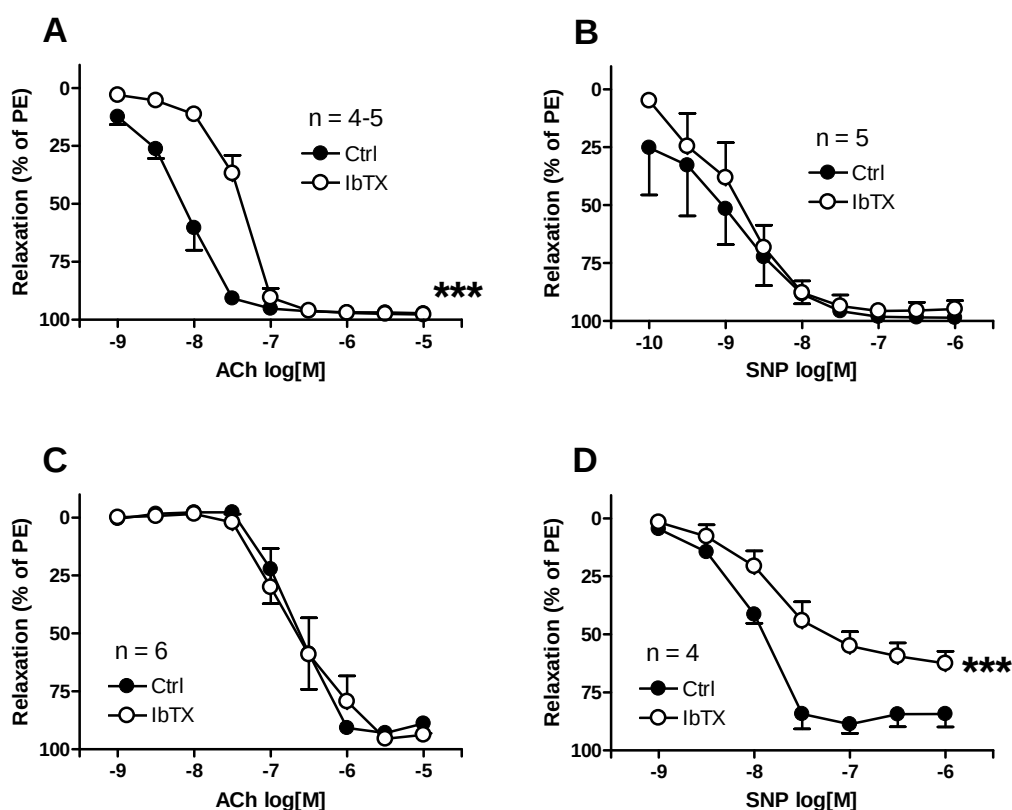


3. ábra. A BK_{Ca} csatorna szerepének vizsgálata kontroll (A, B) és diabetes-es (C, D) körülmények között az endothelium függő (A, C) és független (B, D) relaxációban intracavernosus artérián. * p < 0.05 (two-way ANOVA)

Az ICA-val ellentétben, dorzális pénisz artérián (DPA) a BK_{Ca} csatorna gátló IbTX nem befolyásolta jelentősen az ACh- és az SNP-kiváltotta értónus csökkenést, sem kontroll, sem diabeteses körülmények között. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy ugyanazon szöveten belül is (pénisz) jelentős különbségek mutathatóak ki különböző erek (ICA és DPA) között a BK_{Ca} csatorna funkciója szempontjából. Míg az intracavernosus artériának alapvetően fontos szerepe van az erekció kialakulásában, addig a dorzális pénisz artéria szerepe az erekció kialakulásában kevésbé fontos. Az eredmények egybevágnak a humán intracavernosus artérián általam kimutatott eredményekkel, miszerint a BK_{Ca} csatorna nagyon fontos szerepet játszik mind az endothelium-függő, mind az endothelium-független

relaxáció szabályozásában. (lásd korábban: A BK_{Ca} csatorna szerepe az endothelium függő és független relaxációban humán pénisz rezisztencia éren).

MA érpreparátumon az IbTX ACh dózis-hatás görbére gyakorolt gátló hatása eltűnt diabéteszben (4. ábra, C), míg az SNP kiváltotta relaxáció esetében diabetes-es körülmények között jelent meg a BK_{Ca} csatorna gátlhatósága (4. ábra, D) a kontrollhoz képest (4. ábra A, B).

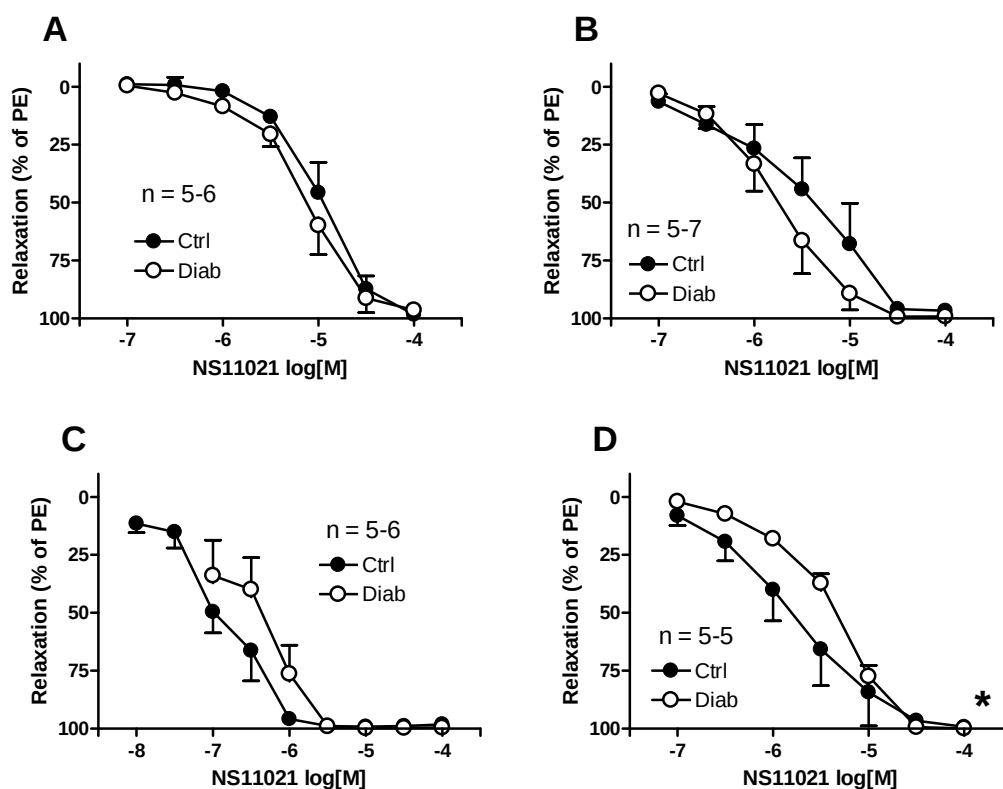


4. ábra. A BK_{Ca} csatorna szerepének vizsgálata kontrol (A, B) és diabétes-es (C, D) körülmények között az endothelium függő (A, C) és független (B, D) relaxációra mezenterális artérián. *** $p < 0.005$ (two-way ANOVA)

Kontroll koszorúér preparátumon a BK_{Ca} csatorna gátló IbTX kissé, de nem szignifikánsan gátolta az endothelium-függő (ACh) és -független (SNP) értágítók hatását, azonban diabéteses szövetből izolált LAD szöveten ez a gátlás szignifikánsnak bizonyult ($p < 0.001$).

A diabétes hatását a BK_{Ca} csatorna funkciójának megváltozására a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 dózis-hatás görbe vizsgálata tudja megmutatni. Az NS11021 érrelaxáló hatása nem változott pénisz erek esetében - sőt, kismértékű érzékenység-fokozódás figyelhető meg, ugyanis a dózis-hatás görbék kissé, de nem szignifikáns módon balra tolódtak mind ICA

(5. ábra A), mind DPA (5. ábra B) érpreparátumokon. Ezekkel ellentétben MA (5. ábra C) és LAD (5. ábra D) szöveten érzékenység csökkenés volt észrevehető, ugyanis az NS11021-görbe jobbra tolódott (MA esetén $p = 0.056$, míg LAD esetében $* p < 0.05$).



5. ábra. Diabetes hatása a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 dózis-hatás görbéjére ICA (A), DPA (B), MA (C) és LAD (D) preparátumokon. $* < 0.05$ (two-way ANOVA)

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a BK_{Ca} csatorna csökkent működése figyelhető meg mezenterialis és koszorúér preparátumokon, míg feltételezhető, hogy pénisz ereken a csatorna fokozott aktivitása kompenzálhatja a vaszkuláris funkció károsodását. Kísérleteinkben a diabetes nem befolyásolta pénisz ereken az endothelium-függő relaxáció maximumát vagy érzékenységét, így feltételezem, hogy a csatorna fontos szerepet játszhat az endothelium-függő folyamatok, és így végső soron az erektilis funkció fenntartásában.

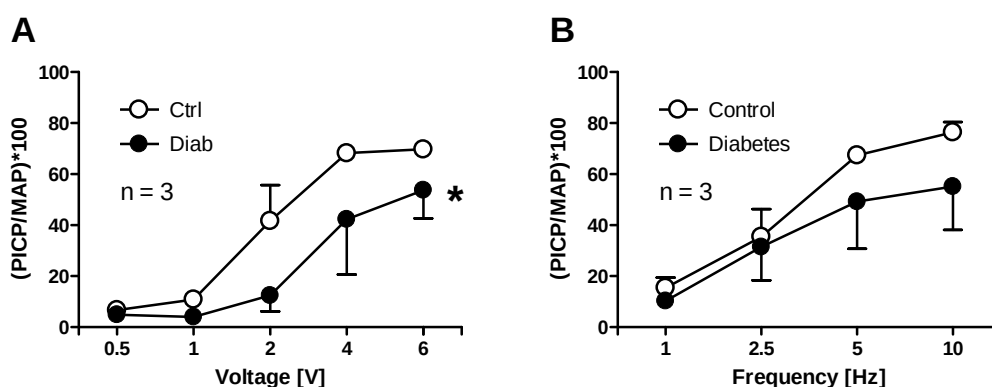
Az iberiotoxin-érzékeny BK_{Ca} ionáram mérése patch-clamp elektrofiziológiai módszerrel pontos adatot nyújthat a BK_{Ca} csatorna szerepéről a diabetes-es vaszkuláris károsodás kialakulásában, így vizsgálataimban célul tűztem ki az ionáram elektrofiziológiai vizsgálatát pénisz corpus cavernosum-ból izolált simaizom sejteken. A módszer beállítását (megfelelő számú (helyes emésztés), és megfelelő membránstabilitású (jó seal) simaizom

sejtek izolálása) követő kezdeti biztató eredmények után azonban komoly akadályokba ütköztem, amelyek alapvetően befolyásoltak a kísérletek további kimenetelét. A kísérleteket érintő akadályokról később ejtek szót.

DM hatása az erektilis funkcióra in vivo

A 2012-es évben megvételre került egy *in vivo* hemodinamikai mérőrendszer, amelynek segítségével lehetővé vált az erektilis funkció *in vivo* mérése, melyet korábbi kísérleteim alapján állítottam be (Kun és mtsai, Br J Pharmacol 2009; 158: 1465-1476). Röviden, altatott (pentobarbitál anaesthesia) patkányokon a hasfal felnyitását követően izoláltam a cavernosus ideget, melynek elektromos ingerlésével hoztam létre intracavernosus nyomásfokozódást. Az intracavernosus nyomás mérését a corpus cavernosumba vezetett, míg az artériás nyomás mérését az arteria carotis-ba vezetett heparinizált folyadék katéterekkel mértem. A BK_{Ca} csatorna nyitó NS11021 adagolása a vena jugularis-on keresztül történt. Az erektilis funkció jellemzésére az intracavernosus nyomás maximumának és az átlag vérnyomás hányadosának százalékban kifejezett értékét használtam: PICP/MAP * 100 (peak intracavernous pressure / mean arterial pressure * 100).

Előzetes kísérleteimben megállapítottam, hogy a diabetes szignifikánsan csökkentette az erektilis funkciót 0.5 és 6 Volt (V) közötti tartományban (állandó 10 Hz frekvencia mellett, 6. ábra A), illetve 5 és 10 Hz frekvenciájú elektromos téringerlésnél is (állandó 6 V feszültség mellett, 6. ábra B).

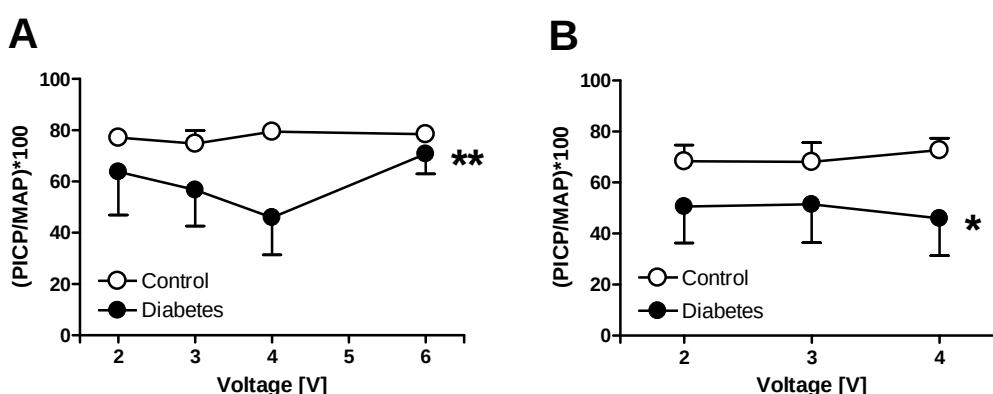


6. ábra. Diabetes (Diab) hatása az erektilis funkcióra a kontroll (Ctrl) csoporthoz képest *in vivo*, változó feszültség (V) de állandó frekvencia (A) vagy változó frekvencia (Hz) de állandó feszültség (B) mellett. * $p < 0.05$ (two-way ANOVA)

Ezen előzetes vizsgálatok elvégzése 2 fontos dolog miatt volt szükséges: 1) annak megállapítása, hogy a (maximális) erektilis funkció változik-e diabetesben, illetve 2) a szubmaximális ingerlési paraméterek meghatározása szempontjából. Ez utóbbi azért is nagyon fontos, mert a maximálisan kiváltott erektilis funkciót nagyon nehéz gyógyszeresen tovább fokozni, viszont a rendszer nagy érzékenységet mutat a szubmaximális ingerlés esetén, azaz a maximális hatás 50-60%-át elérő elektromos ingerlés esetén (Kun és mtsai, Br J Pharmacol 2009; 158: 1465-1476). Kísérleteim alapján megállapítottam, hogy a 3 - 3.5 V körüli feszültségtartomány alkalmas a szubmaximális hatás kiváltásához, és így a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 hatásának *in vivo* vizsgálatához.

Újabb *in vivo* kísérleteimben a 3 és 4 Volt feszültségű és 10 Hz frekvenciájú elektromos ingerlés mellett kapott értékek szignifikánsan kisebbek voltak diabetes-es patkányokban, mint a kontroll csoportban, azonban nem különböztek az adott csoportban kapott maximális (6 V, 10 Hz) értékektől. Ezért megismételtem a kísérleteket 2 V, 10 Hz elektromos téringerlés mellett is, azonban hasonló eredményre jutottam (7. ábra A).

Előzetes kísérleteimben az 5 Hz frekvencia alkalmazása csökkentette a téringerlés hatását a 10 Hz frekvenciájú ingerléshez képest (6. ábra B). Ennek megfelelően megismételtem a 2 – 4 V feszültségű téringerlést 5 Hz frekvencia mellett is, azonban hasonló eredményeket kaptam a 10 Hz frekvencia alkalmazása mellett kapott eredményekhez. Bár 5 Hz alkalmazása csökkentette a téringerlés hatását a 10Hz-es értékekhez képest, azonban nem volt különbség a különböző (2, 3, 4 V) feszültségű téringerlések hatásai között (7. ábra B).



7. Ábra. Diabetes hatása az erektilis funkcióra 10 Hz (A) vagy 5 Hz (B) frekvencia mellett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (two-way ANOVA)

A kapott eredmény azért is meglepő, mert míg az előzetes vizsgálataimban a 2 V feszültségű ingerlés a kontroll csoportban kb. 50%-os hatást eredményezett, és a diabetes-es

csoportban nem hozott létre értékelhető hatást (a 2 V hatása nem különbözött a 0.5 és 1 V hatásától) (6. ábra A), addig az utóbbi kísérleteimben a 2 V ingerlés maximális hatást hozott létre mind kontroll, mind diabetes-es csoportban, függetlenül az alkalmazott frekvenciától (5 és 10 Hz) (7. ábra).

Mindezek mellett az NS11021 1 mg/kg dózisban alkalmazva nem befolyásolta az erektilis funkciót sem kontroll, sem diabetes-es körülmények között. Ez ellentétben áll a korábbi eredményeimmel, ahol az NS11021 0.1 és 1 mg/ttkg dózisban alkalmazva fokozta az erektilis funkciót kontroll patkányokban (Kun és mtsai, Br J Pharmacol 2009; 158: 1465-1476). A negatív eredmények magyarázatául az szolgálhat, hogy az előzetes eredményekkel ellentétben nem sikerült megtalálni azt az ingerlési feszültséget/frekvenciát, ami szubmaximális hatást vált ki, ugyanis ez a tartomány a legérzékenyebb a különböző vegyületek erektilis funkciót befolyásoló hatásai iránt.

A kísérletek kivitelezését érintő problémák

A jelentős eltérés oka az idei és az előző évi eredmények között az *in vivo* erektilis funkciót tekintve az eltérő patkánytörzs lehet. 2012 nyarán megszűnt a Szegedi Tudományegyetemen a Központi Állatház, aminek következtében a Sprague-Dawley patkányok beszerzése nagyon nehezzé vált. Az országban könnyen beszerezhető Wistar patkányokkal ellentétben a Sprague-Dawley patkányok tenyésztése csak néhány helyre korlátozódik, így vagy ezekről a helyekről, vagy külföldről lehet ezekhez a patkányokhoz hozzájutni. Szerencsére korlátozott számú, de a kísérletek befejezéséhez elegendőnek ítélt mennyiségű Sprague-Dawley patkány beszerzésére lehetőségem nyílt egyetemi kooperáció keretén belül. Azonban míg 2010-ben és 2011-ben a streptozotocin intraperitonealis injekciójával létrehozott DM sikeraránya 80%, addig 2012-ben ez a szám 60% körüli. Ez azt jelenti, hogy majdnem minden 2. patkány esetében a streptozotocin nem váltott ki megfelelő mértékű (>15 mmol/L) vércukorszint emelkedést, az esetek egy részében az állatok vércukorszintje nem mutatott semmilyen eltérést az injekciót követően. A más alomból, más tenyésztési körülmények között nevelt patkányok eltérő módon reagáltak az experimentális diabetes-re, ami csökkentette a kísérletekhez felhasználható darabszámot. Az *in vivo* kísérletek többszöri megismétlése miatt a patch-clamp elektrofiziológiai méréseket már sajnos nem tudtuk befejezni. Ráadásul a megismételt *in vivo* kísérletek sem a várt (előző évi) eredményeket mutatták.

Másik fontos tényező, hogy 2013 tavaszán munkahelyet váltottam, aminek következtében már nem volt módom folytatni és befejezni a kísérleteket.

Összefoglalva a diabetes-es kísérleteim eredményét, megállapíthatom, hogy a diabetes nem befolyásolta az endothelium-függő és -független érrelaxációt koszorúéren, viszont károsította az endothelium-független értónus csökkenést pénisz és mezenterialis ereken. Ha figyelembe vesszük, hogy diabetes-ben kimutattam az erektilis funkció csökkenését, akkor igazolni látszik, hogy az erektilis diszfunkció az első jele lehet a szisztémás vaszkuláris károsodásnak.

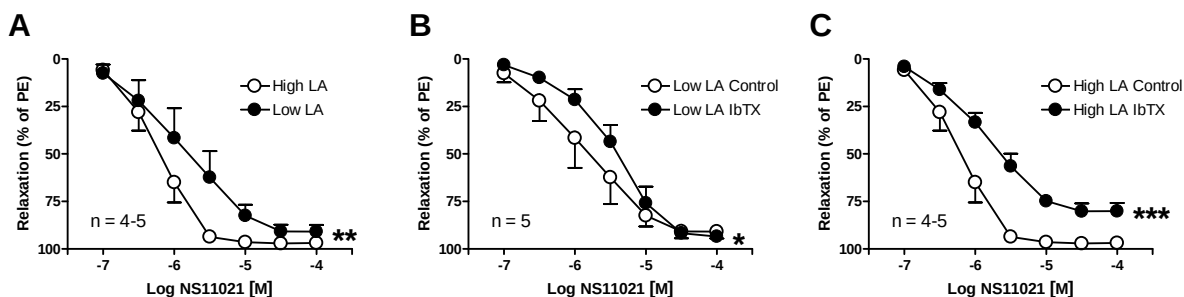
Az eredményekből kézirat írása van folyamatban, melyet a *Journal of Sexual Medicine* c. folyóiratba tervezek beküldeni.

Telítetlen zsírsavdiéta hatás a BK_{Ca} csatorna aktivitására

Ismert, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó diéta kardioprotektív hatással rendelkezik. Ezzel ellentétben, a koleszterindús táplálkozás rontja a kardiovaszkuláris funkciót és emeli a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának rizikóját. Diabetesben a vaszkuláris funkció károsodása mellett a magas koleszterinszint miatt kialakuló ateroszklerózis egyértelműen rizikófaktor a fokozott kardiovaszkuláris mortalitásnak. Ezért nagyon izgalmas lehetőségnek tűnik a telítetlen zsírsavakat tartalmazó diéta hatásának vizsgálata a koszorúér funkcióra és a BK_{Ca} csatorna működésére egészséges és diabetes-es szöveten.

A patkányok napraforgó olajjal dúsított (magas linolsav (68%) tartalmú diéta - High LA), illetve sertészsírral dúsított (alacsony linolsav (10%) tartalmú diéta -Low LA) tápot kaptak. A koszorúret kipreparáltam, majd az érszövet izometriás tónusváltozását mértem Mulvany-féle miográffal.

Kísérleteimben az alacsony linolsav tartalom csökkentette a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 érzékenységét, a dózis-hatás görbét jobbra tolta (8. ábra **A**). A szelektív BK_{Ca} csatorna blokkoló Iberiotoxin (IbTX) gátolta az NS11021 hatását mind alacsony (8. ábra **B**), mind magas (8. ábra **C**) linolsav tartalom mellett. A magas LA tartalom mellett az IbTX hatása kifejezettebb, ami arra utal, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak képesek aktiválni a BK_{Ca} csatornát.

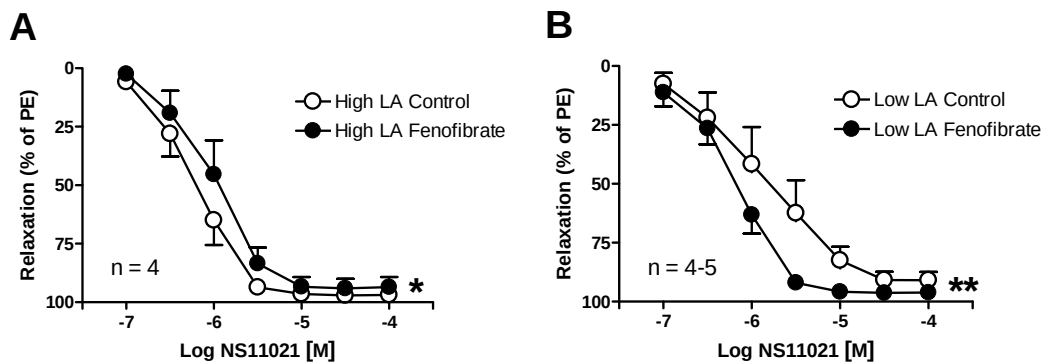


8. ábra. Magas (High LA) és alacsony (Low LA) linolsav tartalmú diéta hatása a BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 dózis-hatás görbére (A). Iberitoxin (IbTX) hatása az NS11021 relaxációra alacsony (B) és magas (C) linolsav diéta mellett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (two-way ANOVA)

Ismert, hogy a zsírsavak képesek befolyásolni a különböző ioncsatornák aktivitását. A napraforgó olajnak magas a többszörösen telítetlen zsírsav tartalma, így linolsav tartalma is. A kísérleteinkben talált eredménnyel megegyezik az a korábbi megfigyelés, amelyben leírták a linolsav aktiváló hatását BK_{Ca} csatornára nyúl koszorúérből izolált simaizom sejteken (Ahn és mtsai, Yonsei Med J. 1994; 35(1): 10-24). Bár az régóta ismert, hogy a linolsav fokozza a koszorúér áramlást patkányban (ten Hoor, Nutr Metab. 1980; 24 Suppl 1: 162-80), a linolsav hatását a koszorúér artéria tónusára még nem vizsgálták.

Kísérleteinkben az acetilkolin (ACh) által létrehozott endothelium-eredetű relaxáció fokozódott a magas LA diétájú csoportban. Ráadásul, a ciklooxygenáz gátló indomethacin is felére csökkentette az ACh hatását az alacsony LA tartalmú diétás csoporthoz képest, ahol az ACh relaxáció teljes mértékben NO által közvetített hatás. Ez megegyezik a korábbi vizsgálatok eredményével, melyben kimutatták, hogy a magas telítetlen zsírsav tartalmú diéta ez endothelium-eredetű relaxációt eltolja az értágító hatású arachidonsav metabolitok irányába (Leprán és mtsai, J Cardiovasc Pharmacol 1981; 3(4): 847-853).

Az NS11021 relaxáció fokozott érzékenysége nem magyarázható tisztán csak a magas linolsav tartalomnak, ugyanis a napraforgó olajban található kevesebb koleszterin tartalom, szemben a sertézsíros tápban található magas koleszterin tartalommal, szintén szerepet játszhat az NS11021 megnövekedett érzékenységekben. Kísérleteimben ezért megvizsgáltam a koleszterin szintet csökkentő fenofibrát hatását. Megállapítottam, hogy az alacsony linolsav, de magas koleszterin tartalmú diéta esetén az állatok fenofibrát előkezelése (2 héten át) helyreállította a csökkent NS11021 érzékenységet, míg magas linolsav tartalom mellett nem volt jelentős hatása az NS11021 dózis hatás görbére (9. ábra).



9. ábra. Fenofibrát kezelés hatása a BKCa csatorna aktivátor által kiváltott relaxációra magas (A) és alacsony (B) linolsav tartalmú diéta mellett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (two-way ANOVA)

Kísérleteink egybevágnak a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a sejtmembrán koleszterin tartalmának eltávolítása fokozta, míg a koleszterin tartalom helyreállítás csökkentette a BK_{Ca} csatorna aktivitását (Riddle és mtsai, Am J Physiol Cell Physiol 2011; 301(6): C1404-C1414).

Összefoglalva, kísérleteimben megállapítottam, hogy a magas linolsav tartalmú, többszörösen telítetlen zsírsavat tartalmazó diéta és az alacsony koleszterinszint javíthatja a koszorúér funkciót a simaizom sejteken található BK_{Ca} csatorna befolyásolásával. Sajnos a kísérletek diabetes-es szöveten történő megismétlésére már nem nyílt lehetőség (lásd a fentebb részletezett okokat), azonban az eredményekből kézirat írása van folyamatban.