

## 1. Téma

**A hiperhomociszteinémiában várható venulás diszfunkció karakterizálásához első lépésben fontos volt a normális venulák funkciójának vizsgálatára.**

**A ciklooxygenáz-1 és 2 (Cox-1, 2) szerepe a venulák áramlás függő válaszainak közvetítésében.**

Az áramlás indukálta átmérőváltozás fontos a vénás ellenállás szabályozásában, mely meghatározó a vénás visszaáramlás és a kapilláris filtráció szabályozásában. Korábbi vizsgálatokban az intraluminális áramlás lépcsőzetes emelése norepinefrin jelenlétében vázizom venulákban dilatációt váltott ki, azonban ez a kondíció befolyásolhatja az érátmérő válasz és a közvetítő faktorok természetét. Feltételeztük, hogy a kis vénákban nyomás jelenlétében spontán miogén tónus mellett is az áramlás növelése átmérőváltozást indukál. Izolált vázizom venulákban 10 Hgmm intraluminális nyomás hatására 1-1,5 óra alatt jelentős spontán tónus alakult ki (aktív átmérő:  $259 \pm 11 \mu\text{m}$  vs. passzív átmérő:  $412 \pm 11 \mu\text{m}$ ). Az intraluminális áramlás emelésére a venula átmérője fokozatosan nőtt (max.  $18 \pm 3 \%$ -kal). A prosztaglandin H<sub>2</sub>/tromboxán A<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub>) receptor antagonistá SQ 29,548 szignifikánsan növelte az áramlás indukálta dilatációt (max.  $37 \pm 3 \%$ -kal), amelyet a nem-specifikus ciklooxygenáz (COX) gátló indomethacin (INDO) vagy az NO-szintáz inhibitor N $\omega$ -nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) szignifikánsan csökkentett, míg együttes jelenlétük megszüntetett. SQ 29,548 jelenlétében a szelektív COX-2 gátló NS 398 nem változtatta meg, míg a COX-1 gátló SC 560 szignifikánsan csökkentette az áramlás indukálta dilatációt. SQ 29,548 jelenléte nélkül az NS 398 növelte, míg az SC 560 csökkentette az áramlás indukálta dilatációt. Immunohisztokémiával mind a COX-1, mind a COX-2 jelenléte kimutatható volt a kis vénák falában. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy 1.) izolált vázizom venuláknak jelentős spontán tónusuk van, 2.) az intraluminális áramlás hatására számos dilatátor (NO, dilatátor prosztaglandinok) és konstriktor (PGH<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub>) mediátor szabadul fel, mely összességében dilatációt hoz létre. A dilatátor PG-kat a COX-1, míg a konstriktor PG-kat a COX-2 termeli.

## II. Téma

**A hyperhomocysteinemia hatásának vizsgálatára az izolált venulák vasomotor működésére és a pathomechanizmust létrehozó celluláris útvonalak azonosítása.**

**a.** Kimutattuk, hogy hiperhomociszteinémiában a ciklooxygenáz-2 által termelt thromboxán A<sub>2</sub> és reaktív oxigén szabadgyökök felelősek az áramlás-indukált venulás konstriktióért.

Korábban kimutatták, hogy a hiperhomociszteinémia (HHcy) rontja az arteriák endotél funkcióját, és trombózisa hajlamosít. Arra azonban nincsen adat, hogy a HHcy hogyan hat a venulák vasomotor működésére. Azt feltételeztük, hogy a HHcy olyan kórélettani mechanizmusokat aktivál, amivel a venulák áramlás/nyíróerő-függő válaszát rontja.

Anyagok és módszerek: Kontroll és HHcy patkányokból (5 hétig metionin tartalmú étrenden tartott) izolált gracilis venulák (átmérő:  $\sim 250 \mu\text{m}$  10 Hgmm-en) intraluminális áramlás-növekedés által kiváltott átmérő változásokat mértük. Az áramlás növelése dilatációt okozott a kontroll erekben (max.:  $14 \pm 1\%$ ), ám konstriktiót váltott ki a HHcy venulákban (max.:  $-24 \pm 4\%$ ). A HHcy-s venulákban az áramlás-indukálta konstriktiót a tromboxán A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) receptor (TP) antagonistá SQ 29,548 dilatációba fordította, amit a szimultán adott nitrogén monoxid (NO) szintáz inhibitor L-NAME és a nem szelektív ciklooxygenáz (COX) gátló indomethacin szüntetett meg. Továbbá, a szelektív COX-2 gátló NS 398 az áramlás kiváltotta

konstrikciót dilatációba fordította, amit a hozzáadott COX-1 gátló SC 560 szignifikánsan csökkentett. Ezen kívül a kontrollokhöz viszonyítva a HHcy-s kis vénákban SOD/CAT szenzitív növekedett etídiom-bromid fluoreszcenciát találtunk, ami jelentős reaktív oxigén szabadgyök (ROS) termelésre utal HHcy-ban. Ennek megfelelően a SOD/CAT a HHcy-s patkányok venuláiban csökkentette az áramlás-indukálta konstrikciót.

Összefoglalva, hiperhomociszteinémiában az áramlás/nyíróerő-indukálta stressz növeli a COX-2 által termelt TxA<sub>2</sub> mennyiségét, és a reaktív oxigén szabadgyökök – amik legyőzik az NO és prosztaglandinok dilatátor hatását – konstrikciót váltanak ki a vázizom venulákban; ezek a változások növelhetik a vaszkuláris ellenállást, és hozzájárulhatnak thrombus kialakulásához a vénás keringésben.

**b.** Mivel HHcy-ben megemelkedik a plazma és várhatóan a vaszkuláris szövet ADMA szintje az ADMA vasomotor hatását is vizsgáltuk: Az asszimetrikus dimetilarginin (ADMA) szintje fokozódik kardiovaszkuláris betegségekben, de kóroki szerepe és a jelenség hátterében húzódo molekuláris folyamatok pontosan még nem ismertek. Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy emelkedett ADMA koncentráció elsődlegesen reaktív oxigén gyökök (ROS) termelése révén csökkenti az endothél eredetű nitrogén monoxid (NO) mediálta áramlás indukálta dilatációt. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az ADMA RAS függő AT1 receptor útvonalon keresztül serkenti a NAD(P)H-oxidázt és fokozott oxidatív stressz jön létre, ami csökkenti mind NO donor molekulákból, mind áramlás- indukálta útvonalból felszabaduló NO biológiai hatásosságát. Ez a mechanizmus részt vehet az emelkedett ADMA szinttel járó mikrovaszkuláris betegségek kialakulásában.

**c.** HHcy-ben az agyi keringés is nagyban károsodik vizsgálatainkat ez irányban is kiterjesztettük: Eredményeink szerint patkány cerebralis artériák az intraluminalis nyomás emelkedésére az érátmérő állandóan tartásával, míg az áramlás/nyíróerő emelésére az érátmérő csökkenésével válaszolnak. Feltételezzük, hogy hemodinamikai erőre adott vazomotor válaszoknak alapvető szerepe van az agyi vérátáramlás autóregulációjában (az intraluminalis nyomás változása ellenében), valamint a Monroe-Kelly elvnek megfelelően az intracranialis térfogat állandóan tartásában. Feltételezzük, hogy HHcy-ben ezen erek konstriktor válaszai fokozódnak.

### **III. Téma**

**Mivel HHcy ben és egyéb betegségekben az érfali oxidatív stressz van ezért az oxidánsok és antioxidánsok hatását vizsgáltuk a vénulák működésére.**

**a.** A hidrogén peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) szerepe az izolált vázizom venulák miogén válaszában közvetítésében: Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bifázisos választ vált ki arteriolákban; alacsony koncentrációk konstrikciót, míg magasabb koncentrációk dilatációt váltanak ki. Újabb vizsgálatok arteriolákon felvetik a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lehetséges szerepét a vasomotor funkciók kialakulásában nem csak kóros, de normál körülmények között is. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatását és szerepét a venulák vasomotor válaszáinak közvetítésében azonban nem ismerjük. Jelen kísérleteinkben feltételeztük, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> módosítja a vázizom venulák átmerőjét ill. miogén válaszákat. Ezért, kísérleteinkben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup>- 10<sup>-5</sup> M) hatását vizsgáltuk patkányból izolált vázizom venulák átmerőjére és nyomás indukált válaszára. Az intraluminális nyomás lépcsőzetes emelése (1 - 20 Hgmm) izolált venulákban a passzív átmerőhöz (Ca<sup>2+</sup> mentes oldat) képest jelentős konstrikciót okozott (7,5 Hgmm mellett: passzív átmerő: 400 ± 34 μm, min aktív átmerő: 278±19 μm; a számított bazális tónus: 69±4,7 %; átlag±SEM). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bontó kataláz enzim jelenléte szignifikánsan csökkentette a miogén konstrikciót (5 Hgmm

mellett: kontroll:  $40 \pm 4,8$  %, kontroll + kataláz:  $60 \pm 10,7$  %). Izolált venulákban  $H_2O_2$  ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) koncentráció-függő konstriktiót okozott (max.:  $137 \pm 7,8$   $\mu\text{m}$ -ről  $61 \pm 18$   $\mu\text{m}$ -re,  $48,5 \pm 5,1$ %,  $10^{-5}$  M koncentrációnál). Indometacin ( $2,5 \times 10^{-5}$  M, 30 perc inkubálás) jelenléte meggátolta  $H_2O_2$ -indukálta konstriktiót (max.:  $134,6 \pm 12,6$   $\mu\text{m}$ -ről  $133,4 \pm 13,3$   $\mu\text{m}$ -re). Eredményeinkből arra következtetünk, hogy izolált venulákban  $H_2O_2$  fokozza a konstriktor prosztaglandinok (feltehetően a prosztaglandin  $H_2$ /tromboxán  $A_2$ ) szintézisét, ami a venulák konstriktióját okozza, valamint a nyomás indukálta miogén válasz közvetítésében a  $H_2O_2$  fontos szerepet játszik. Feltételezzük, hogy a  $H_2O_2$ -nak fontos szerepe lehet normális és kóros körülmények között a venulás mikrocirkuláció szabályozásában.

**b.** A hidrogén szulfid ( $H_2S$ ) és a szuperoxid diszmutáz (SOD) antioxidáns hatásának összehasonlítása izolált carotis artériákon: Az utóbbi évek kutatásai alapján feltételezzük, hogy a  $H_2S$  hatékony antioxidáns molekula, mely javítja a kardiovaszkuláris funkciót. Jelen kísérleteink célja, hogy a  $H_2S$  antioxidáns tulajdonságát a SOD már ismert hatásához hasonlítsuk. Eredmények. Az izolált artériákban a KCl (60 mM) oldat hatására jelentős vasomotor tónus alakult ki ( $6,9 \pm 0,7$  mN). A pyrogallol adására további jelentős kontrakció jött létre ( $9,7 \pm 0,8$  mN). SOD jelenléte a pyrogallol-indukálta kontrakciót gátolta ( $5,3 \pm 0,8$  mN).  $10^{-5}$  M  $H_2S$  nem csökkentette ( $9,1 \pm 0,5$  mN), míg  $10^{-4}$  M  $H_2S$  jelenléte szignifikánsan gátolta a pyrogallol okozta kontrakciót ( $8,1 \pm 0,7$  mN). Emellett, a SOD teljesen blokkolta a pyrogallol szabadgyök termelését (pyrogallol hatására  $A_{420} = 0,19 \pm 0,0$ ; pyrogallol SOD jelenlétében  $A_{420} = 0,02 \pm 0,0$ ).  $10^{-5}$  M  $H_2S$  nem csökkentette a szabadgyök termelést ( $A_{420} = 0,18 \pm 0,0$ ), míg  $10^{-4}$  M  $H_2S$  kisebb mértékben, de csökkentette a szabadgyök termelést ( $A_{420} = 0,15 \pm 0,0$ ). Következtetés. Összefoglalva a jelen kísérletben a carotis erekben a  $H_2S$  csak nagyon magas koncentrációban csökkentette a pyrogallol-indukálta kontrakciót és a szuperoxid termelést, míg a SOD teljesen megszüntette a szuperoxidhoz köthető hatásokat. Úgy tűnik, hogy a  $H_2S$  gyengébb antioxidáns hatással rendelkezik, mint a SOD, ezért felvetődik a lehetőség, hogy a  $H_2S$  jelenlétében megfigyelt funkciójavulás annak nem közvetlen antioxidáns hatásából adódhatott.

#### **IV. Téma**

##### **Az reaktív oxigén vegyületek szerepe az agyi erek vasomotor működésében**

###### **a. Az intravasculáris nyomás és áramlás hatása az izolált agyi erek vasomotor tónusára.**

Az intraluminális nyomás és áramlás növelése a kis artériáiban és arterioláiban vasomotor választ vált ki. Ennek a válasznak a fő célja, hogy a szöveti áramlást növelje és egyben a keringési energiaveszteséget csökkentse. Az agyi erek áramlás növekedésére adott vazomotoros válasza viszont nem pontosan tisztázott, azonban ismert tény, hogy az agy térfogata szigorú szabályozás alatt áll. A Monroe-Kelly elvnek megfelelően a vér, a liquor és az agyszövet térfogatok összege állandó. Feltételeztük, hogy a különböző elhelyezkedésű agyi artériák vazomotoros válaszai eltérőek lesznek intraluminális áramlás emelkedésére. Az áramlás növelésekor a számított WSS is növekedett, ami az MCA átmérőjének szignifikáns csökkenését okozta (max.  $\Delta P = 40$  Hgmm:  $\sim 11\%$ ), míg a BA átmérője szignifikánsan növekedett (max.  $\Delta P = 60$  Hgmm:  $\sim 8,8\%$ ). A humán itracerebrális artériákban szintén konstriktiót tapasztaltunk. A kontrakció eredményeként a WSS exponenciálisan tovább növekedett az MCA-ban, a BA-ban viszont a dilatáció limitálta a WSS növekedését. Következtetés: Az eredmények alapján feltételezzük, hogy az agyi artériák fali nyíróerőre adott ellentétes válaszainak fontos fiziológiai szerepe van: a BA dilatációja fontos lehet az agyba történő véráramlás növelésében, míg az MCA kontrakciója fontos lehet az állandó lokális agyi térfogat fenntartásában és általában az agyi autóreguláció szabályozásában.

**b.** Az oxidatív stressz és vaszkuláris gyulladás szerepe: Ezen kísérleteinkben, tisztáztuk a cytochrome P450 omega-hydroxylase gátló anyaggal való kezelés hatását a cerebrovaszkuláris erek gyulladására és működésére hipertóniában. Kimutattuk hogy a hipertóniás elváltozásokat mérsékelni lehetett ezen kezeléssel.

### **További kollaborációs kutatások**

**a.** Közös kutatások Dr. Zoltan Ungvarival (Reynolds Oklahoma Center on Aging, University of Oklahoma Health Sciences Center). Vizsgáltuk a növekedési hormon szerepét elhízott Lewis Dwarf patkányokban magas zsírtartalmú etetés mellett a vaszkuláris öregedés, illetve Nrf2-függő antioxidáns mechanizmussal kapcsolatban.

**b.** Dr. Németh Norberttel a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Sebészeti Műtéttani Tanszékének adjunktusával vizsgáltuk a vér microrheológiai paramétereinek (vvt deformitás, aggregáció) és a metabolikus faktorok közötti összefüggést. Ezen kollaborációkból szintén cikkek születtek és várhatóan segítenek további pályázatok elnyerésében.