

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A MIKROEREK VAZOMOTOR MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA AZ ELHÍZÁS ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLJEIBEN

Dr. Fehér Attila

Témavezető: Dr. Bagi Zsolt



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2011

A mikroerek vazomotor működésének vizsgálata az elhízás állatkísérletes modelljeiben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
Az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Fehér Attila okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Bagi Zsolt, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bíró Tamás, Ph.D.
Dr. Hamar Péter, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. február 24. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Domoki Ferenc, Ph.D.
Dr. Szentandrassy Norbert, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bíró Tamás, Ph.D.
Dr. Domoki Ferenc, Ph.D.
Dr. Hamar Péter, Ph.D.
Dr. Szentandrassy Norbert, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. február 24. 13:00

I. Sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

Az elhízás az anyagcsere-folyamatokban bekövetkező változás, amely során az emberi testben olyan mennyiségű zsírszövet halmozódik fel, amely számos megbetegedéshez vezethet, csökkent várható élettartammal, valamint megnövekedett mortalitással társul. Az elhízás napjaink társadalmának igen nagy kihívást jelentő problémája. Világszerte 1,7 milliárd ember súlyosabb a kelleténél, és az elhízás prevalenciája folyamatosan nő; napjainkban már a fiatal felnőttek és a gyerekek körében is igen elterjedt. Jól ismert, hogy az elhízás megnövekedett szívérrendszeri morbiditással és mortalitással társul, és hogy a túlsúly a magas vérnyomás és a koronária szívbetegség kialakulásának megnövekedett kockázatával jár. Az is általánosan elfogadott tény, hogy a hosszú ideig fennálló elhízás talaján a koronária nagyerekben atheroszklerózis alakul ki, amely nagymértékben hozzájárul a kardiovaszkuláris mortalitás növekedéséhez. Újabb vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az elhízás során már a nagy erek atheroszklerózisa előtt elváltozások jelennek meg a mikroerek szintjén. Korábbi vizsgálatok kísérletes eredménnyel szolgálnak arról, hogy magas vérnyomásbetegség illetve diabetes mellitus fennállása során károsodik a mikroerek vazomotor működése. Meglehetősen kevés bizonyíték áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy hogyan alakul a mikroér működés elhízás során, különös tekintettel az eltérő szövetek mikrokeringésében fennálló potenciális különbségekre.

Mindezek alapján tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Az elhízás állatmodelljében megvizsgáljam a rezisztencia erek - simaizom és endothel által közvetítette - vazomotor működésében bekövetkező változásokat, különös tekintettel a vázizom és a koronária mikroérfunkcióra.
2. Feltárjam az elhízás során kialakuló rezisztenciaér elváltozásokban szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, tanulmányozzam a háttérben álló molekuláris folyamatokat.
3. Továbbá, hogy megvizsgáljam olyan farmakológiai anyagok mikroérműködésre gyakorolt hatását, amelyeknek szerepe lehet az elhízás során potenciálisan jelentkező mikroér diszfunkció helyreállításában.

Kísérleteim eredményei és az azokból levonható következtetések segíthetnek abban, hogy világosabb képet kapjunk az elhízás során jelentkező mikroérrendszeri elváltozások mibenlétéről és az azok háttérében zajló kórélettani folyamatok természetéről. A rezisztencia erek elváltozásainak pontos ismeretében lehetőség nyílhat a mikroérműködést befolyásoló célzott terápia kidolgozására, amely hozzájárulhat az elhízással járó társbetegségek megelőzéséhez, gyógyításához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az endothel és a simaizomsejt keringésszabályozó szerepe élettani körülmények között

A vaszkuláris endothel nem csak egy ereket bélelő barrier, amely kontrollálja a véralvadási mechanizmusokat, a vérlemezke és a leukocita adhézió folyamatát, hanem fontos élettani feladata a vérkeringés lokális szabályozása. Az endothel különböző fiziológiás stimulusokra értágító és érszűkítő anyagok szintézisével, felszabadításával válaszol, amelyek a simaizomsejteken kifejtett hatásuk segítségével szabályozzák az adott terület vérellátását, a szöveti perfúziót. Az endothel és a simaizom összetett, egymással együttműködő és kölcsönhatásban álló folyamatainak megbomlott egyensúlya bizonyos körülmények között a mikroerek kóros működéséhez, ún. mikroér diszfunkcióhoz vezethet. A mikroér diszfunkció során megbomlik a vazodilatátor (nitrogén monoxid, prosztaciklin, endothel eredetű hiperpolarizáló faktor) és vazokonstriktor (angiotensin 2, endothelin-1, vazokonstriktor proszttaglandinok) anyagok között fennálló egyensúly, amely a vazodilatátor mechanizmusok beszűküléséhez, illetve következményesen a szöveti perfúzió csökkenéséhez vezethet.

2.2 Perifériás mikroerek működése elhízásban

A humán elhízáshoz igen gyakran társulnak olyan társbetegségek, pl. magas vérnyomás, amelyek kritikus változásokat idézhetnek elő a mikroérműködés szempontjából. Általánosan elfogadott tény, hogy a hosszú ideig fennálló hipertónia talaján a betegekben vaszkuláris diszfunkció alakul ki, amely nagy mértékben hozzájárulhat a fokozott kardiovaszkuláris rizikó kialakulásához. Több kísérletes bizonyíték utal

arra, hogy az elhízás során a magas vérnyomás betegségtől függetlenül is károsodhat az endothelium által szabályozott vazomotor működés. Az elhízás állatkísérletes modelljei kiváló lehetőséget nyújtanak a háttérben zajló, emberben nehezen tanulmányozható patológiai folyamatok feltérképezésére. A kísérletes eredmények arra utalnak, hogy elhízás során károsodhat a perifériás rezisztencia erek működése, azonban a megváltozott mikroérműködés háttérében álló folyamatok, illetve az azt kiváltó tényezők nem kellőképpen tisztázottak.

2.3 Koronária mikroerek működése elhízásban

Ahhoz, hogy a szervezet meg tudjon felelni a testsúly növekedésével járó fokozott metabolikus igényeknek a kardiovaszkuláris rendszer szempontjából megnövelt perctérfogatot és fokozott intravaszkuláris vértérfogatot igényel. Közismert, hogy az elhízás gyakran társul bal kamrai hipertrófiával, amely a megnövekedett hemodinamikus és metabolikus követelményekhez való alkalmazkodás első lépcsőfoka lehet. A megnövekedett igényekhez a koronária ereknek is alkalmazkodniuk kell, azonban a koronária keringésben az oxigén kinyerése közel maximális szinten zajlik, így a metabolikus igény és a vérellátásban fellépő aránytalanság kritikus hatással lehet a szívizom kontraktilis funkciójára. A koronária áramlás megváltozott metabolikus igényekhez való alkalmazkodása az érellenállás szabályzásával valósul meg, a koronária keringés eltérő szintjein több egymással együttműködő mechanizmus (pl. miogén áramlás vagy metabolikus érátmérő szabályzás) segítségével. A nagy szívkoszorúserek igen alacsony ellenállást képviselnek a koronária keringésben; az áramlással szembeni ellenállás azonban megnő, ahogyan az érátmérő 300 μm alá csökken. Ezért is nagyon fontos a koronária arteriolák direkt vizsgálata, mivel világosabb képet kaphatunk az elhízás során a vaszkuláris rezisztencia

koronária keringésben bekövetkező változásairól. Jóllehet a nagy koronária erekkel kapcsolatos eredmények az elhízás koronária működésre kifejtett káros hatására utalnak, a mikroerek szintjén a vazomotor tónus és az agonista kiváltotta dilatációs működés akár megtartott is maradhat, különösképpen a betegség korai szakaszában. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az elhízás során a koronária keringésben a mikrovaszkuláris rendszerhez tartozó érszabályozó mechanizmusok védett szerepet élveznek az elhízás során jelentkező káros hatásokkal szemben a perifériás keringés ereivel ellentétben.

2.4 Megváltozott Rho kináz funkció elhízásban

A Rho kináz (ROK) egy szerin/treonin kináz GTP-Rho-kötő fehérje, amely elsősorban a sejtek alakjának és mozgásának befolyásolásában vesz részt a citoszkeletonon kifejtett hatásának köszönhetően. A ROK az inzulin receptor szubsztráttal történő interakciója révén szerepet játszik az inzulin jelátviteli folyamatában is. A 2-típusú diabetes mellitus állatmodelljében károsodott endothel függő dilatáció figyelhető meg, amelynek hátterében a ROK fokozott aktivációja áll. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre elegendő bizonyíték arról, hogy hogyan alakul a Rho kináz aktivitása elhízás során.

2.5 A resveratrol vazoprotektív hatása

A resveratrol (3,4',5-trihidroxistilbén) egy növényi eredetű polifenol, amellyel kapcsolatban elsősorban a várható élettartamot potenciálisan megnövelő hatása miatt végeztek kiterjedt kutatásokat. Epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a resveratrolban gazdag mediterrán diéta a kardiovaszkuláris rizikó kifejezett csökkenésével társul. A resveratrol vélhetően széleskörű anti-atherogén hatással bír, gátolja az LDL

oxidációt és a vérlemezke aggregációt, szabályozza a vaszkuláris simaizom proliferációját és befolyásolja a NO termelődését. A resveratrol javítja a magas kalóriatartalmú diéta hatására elhízó egerek egészségi állapotát és növeli azok túlélését. Újabb tanulmányok arról is bizonyítékkal szolgálnak, hogy rágszálókban resveratrol kezelés hatására szignifikáns érvédő hatás fejlődik ki öregedés során.

2.6 A caveolinok és a kalcium aktiválta kálium csatornák szerepe elhízásban

A mikroerek tekintetében kitüntetett fontossággal bírnak az endotheltől függő, de NO-tól és prosztaciklintől független dilatációs mechanizmusok. A NO-dal ellentétben az az endothel eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) által létrejövő dilatáció kevésbé függ az oxidatív stressztől, így az részt vehet az elhízás során károsodott NO kiváltotta dilatáció kompenzációjában. Az EDHF válasz kialakításában kiemelt szerepet játszanak kalcium aktiválta kálium csatornák, többek között a simaizom sejteken expresszáldó magas vezetőképességű kálium csatornák (BKCa). Az EDHF kiváltotta dilatáció létrejöttéhez elengedhetetlenül szükséges bizonyos érfali jelátviteli folyamatok caveolákba történő átrendeződése. A caveolák 50-100-nm átmérőjű, palack alakú membrán betűrődések, amelyek több kulcsfontosságú strukturális és scaffolding fehérje, többek közt a caveolin-1 (cav-1) összeállásával jönnek létre. Egy nemrégiben sejt kultúrákon elvégzett kísérletsorozat alapján a BKCa csatornák a sejten belül a caveolákban találhatóak meg, ahol a cav-1 a csatornák α alegységén keresztül kapcsolódva negatív szabályozó hatást fejt ki azokra. Ismert, hogy a BKCa csatornák elsősorban a vaszkuláris simaizomsejtekben kerülnek expresszióra, ahol magas koncentrációjú lokális kalcium hatására (10-100

μM) aktiválódnak. További tanulmányokra van szükség, hogy feltárjuk, hogy az elhízás során megjelenő elváltozások hogyan befolyásolják a mikroerekben megtalálható KCa csatornák működését.

3. METODIKÁK

Állatkísérleteink során az Állatkísérletes Etikai Bizottság által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el, kísérleteinkben csak szakmailag jártas személyek vettek részt. A kísérleti protokollok előtt az egy éjszakán át éheztetett állatokat nátrium pentobarbital (50 mg/tskg) intraperitoneális adásával altattuk el, amely után a rágsálókból eltávolítottuk a gracilis izmot. Ezután az állatokon további 150 mg/tskg nátrium pentobarbital injekció adásával eutanáziát végeztünk.

3.1 Az elhízás állatkísérletes modelljei

Kísérleteink első részében az elhízás modelljeként 12 hetes hím obez Zucker (OZ) patkányokat és ezek kontrolljait (lean Zucker, LZ) használtuk. Az OZ patkányok a leptin receptor gén homozigóta mutációját hordozzák magukban és 12 hetes korukra testtömegük szignifikánsan nagyobb a leptin receptor szempontjából heterozigóta, normál fenotípussal bíró LZ patkányokhoz képest. Kísérleteink második részében 20 hetes hím ECR vad típusú egerekben ($Nrf2^{+/+}$) illetve $Nrf2$ génkiütött egerekben ($Nrf2^{-/-}$) 16 hétig tartó magas zsírtartalmú étrend segítségével idéztünk elő elhízást. Az $Nrf2$ transzkripció faktor több gén expressziójának szabályozásáért felelős, amelyek közt több antioxidáns enzim is szerepel, így fontos szerepet játszhat az oxidatív stressz szabályozásában. Az állatokat 16 héten keresztül standard diétán, magas zsírtartalmú diétán (high fat diet, HFD), valamint egy resveratrollal kiegészített HFD diétán tartottuk. Kísérleteink harmadik részében hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River), amelyekben az elhízást magas zsírtartalmú diéta (HFD; Testdiet; PMI Nutrition International) segítségével idéztük elő. A HFD állatok magas (60%-os) zsírtartalmú tápot kaptak 10 héten keresztül. A továbbiakban az elhízás következtében

fellépő érelváltozások hátterében álló folyamatok vizsgálatára 12-14 hetes hím cav-1 génkiütött egereket használtunk.

3.2 Analitikai módszerek

A kontroll és HFD patkányokból nyert plazmából teljes koleszterin, glükóz és inzulin meghatározás történt.

3.3 Izolált mikroértechnika

Izolált mikroér kísérleteinket koronária illetve gracilis arteriolákon (~120 μ m) végeztük. A kísérletek során a mellkas megnyitását követően steril körülmények között eltávolított szívet és a gracilis izmot egy hideg Krebs oldatot tartalmazó, szilikon alapú Petri-csészében tűkkel rögzítettük. A preparálás után az izolált arteriolát egy hideg, oxigenizált Krebs oldatot tartalmazó szervedénybe helyeztük, majd egy sztereomikroszkóp segítségével kanuláltuk. Az intraluminális nyomást visszacsatolásos elven működő nyomásszabályozó segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük. Az egy órás inkubációs idő elteltével az arteriolákban spontán miogén tónus fejlődött ki. A belső érátmérő változását egy videomikroszkóphoz rögzített digitális kamerával detektáltuk és számítógép segítségével mértük.

3.4 Az arterioláris funkció vizsgálata vazoaktív szerekkel

Kísérleteink során elhízott és kontroll állatokból izolált gracilis, illetve koronária arteriolákon vizsgáltuk meg a különböző vazoaktív szerek hatására bekövetkező érátmérő változást. Elsőként az angiotenzin 2 (Ang 2) és a noradrenalin ismételt adásának hatására kialakuló érválaszt teszteltük. Az első applikáció után félórás várakozási időt követően újra felvettük az agonista indukálta válaszokat. Az Ang 2 és noradrenalin

kiváltotta ismételt érválaszokat a Rho kináz gátló Y27632 fél órás inkubációját követően is rögzítettük. Az endothel funkció tesztelésére acetilkolint (ACh) használtunk. Az ACh kiváltotta válaszokat a NO szintáz gátló N ω -nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME) történő 30 perces inkubáció után is rögzítettük. Az EDHF kiváltotta válaszok vizsgálatára a koronária arteriolák ACh kiváltotta dilatációját az L-NAME és a ciklooxygenáz gátló indomethacin együttes jelenlétében vizsgáltuk. Az ACh kiváltotta válaszokat a BKCa gátló iberiotoxin, az alacsony vezetőképességű kalcium aktiválta kálium csatorna (SKCa) gátló apamin és a közepes vezetőképességű kalcium aktiválta kálium csatorna (IKCa) gátló TRAM34 jelenlétében is megvizsgáltuk. Az izolált koronária arteriolákon a BKCa csatornák szelektív aktivátora, az NS-1619 hatására kialakuló érválaszokat is rögzítettük. A caveolák szétrombolására a kontroll állatokból izolált koronária arteriolákat 90 percen keresztül *in vitro* metil- β -ciklodextrinnel inkubáltuk.

3.5 Az érfali szabadgyök termelés mérése

Az érfali szabadgyök termelést arteria femoralis ereken mértük Amplex Vörös Esszé Kit segítségével, ahol az extracellulárisan generált H₂O₂-t a torma peroxidázzal kapcsolt Amplex Vörös fluoreszcencia esszével detektáltuk.

3.6 A Rho kináz aktivitás mérése

Femorális artériák elsőrendű ágait jéghideg pufferben homogenizáltuk, majd meghatároztuk a protein koncentrációt. Az azonos mennyiségű arteriális lizátumokat 96 lyukú, gyárilag szubsztrátot tartalmazó lyukakba helyeztünk. A torma peroxidázzal jelölt foszfospecifikus antitesttel való inkubáció után hozzáadtuk a szubsztrátot

és a reakció hatására jelentkező színváltozást spektrofotométer segítségével detektáltuk.

3.7 Immunohisztokémia

A kontroll és HFD patkányokból származó szívdarabokból beágyazást követően 10 μm vastagságú konszekutív metszeteket készítettünk, majd acetonos fixálás után a metszeteket poliklonális cav-1 ellenes antitesttel és simaizom aktin ellenes antitesttel vagy poliklonális BKCa csatorna ellenes antitesttel és simaizom aktin ellenes antitesttel jelöltük. A sejtmagok festésére DAPI-t használtunk.

3.8 Western immunoblot

A kontroll és HFD állatok szívéből izolált koronária artériákban vizsgáltuk a BKCa és caveolin-1 expressziót.

3.9 Statisztika

Statisztikai elemzéseinkhez Student féle t-próbát használtunk. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha a $p < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Vázizom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban

Gracilis izom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízott Zucker patkányokban

Az obese Zucker (OZ) állatok testtömege szignifikánsan nagyobb volt a kontroll (lean Zucker, LZ) állatok testtömegéhez viszonyítva. A kontroll állatokból izolált arteriolákban az angiotenzin 2 dózis függő módon konstriktiót váltott ki, amelynek mértéke szignifikáns csökkenést mutatott az Ang 2 újbóli adminisztrációja során, míg a noradrenalin hatására létrejövő vazokonstriktió mértéke nem mutatott változást ismételt applikációt követően. Az OZ arteriolákon az Ang 2 első applikációjára kialakuló konstriktió szignifikánsan nagyobb volt a LZ erekben tapasztaltaknál. Az elhízott Zucker patkányokból izolált gracilis arteriolákon ugyanakkor szignifikáns fokozódást tapasztaltunk a konstriktió mértékében az Ang 2 második dózis hatásgörbéjének regisztrációja során. Az OZ állatok ereiből származó homogenizátumokban fokozott Rho kináz aktivitást mutattunk ki a LZ erekből származó homogenizátumokhoz képest. A kontroll állatokból származó arteriolákban a Rho kináz gátló Y27632-vel történő inkubáció nem volt hatással sem az elsőként, sem az ismételten adagolt Ang 2 hatására létrejövő vazokonstriktió tekintetében. Ezzel szemben az OZ állatokból izolált gracilis arteriolákban az Y27632 jelenlétében csökkent az Ang 2 kiváltotta konstriktió mértéke az első adminisztráció során, míg az ismételt adás hatására kialakuló válasz szinte teljesen megszűnt. Az Y27632 nem befolyásolta a noradrenalin hatására kialakuló konstriktiót sem az OZ, sem az LZ állatokból izolált arteriolákban.

Gracilis izom arteriolák endothel függő dilatációjának vizsgálata magas zsírtartalmú diétával táplált egerekben

A magas zsírtartalmú diéta mind az Nrf2 transzkripciós faktort expresszáló (Nrf2^{+/+}) és az azt nélkülöző (Nrf2^{-/-}) egerekben szignifikáns testsúlynövekedést idézett elő. Ezen testsúlynövekedés csökkenő tendenciát mutatott amennyiben az állatok a magas zsírtartalmú diéta mellett resveratrolt is kaptak napi étrendjükben. A magas zsírtartalmú diéta hatására mind a Nrf2^{+/+}, mind a Nrf2^{-/-} állatokból izolált gracilis erek esetében károsodott az acetilkolin kiváltotta vazodilatáció. A resveratrol kezelés a normál diéta esetén megfigyelhető szintre állította vissza az acetilkolin kiváltotta dilatációt a magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{+/+} egerek esetében. Ezzel szemben a resveratrol kezelés csak részben eredményezett javulást az ACh kiváltotta dilatációban magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerekben, így a kontroll étrenden lévő Nrf2^{-/-} egerekhez képest fennálló ACh kiváltotta dilatációban meglévő különbség továbbra is fennmaradt. A magas zsírtartalmú diéta a Nrf2^{+/+} és Nrf2^{-/-} egerekben egyaránt szignifikánsan fokozta az érfa li reaktív oxidatív szabadgyökök (ROS) termelődését. A magas zsírtartalmú táplálékon tartott Nrf2^{+/+} egerek esetében a resveratrol kezelés a normál diéta esetén megfigyelhető szintre csökkentette az érfa li ROS termelődését. Ezzel ellentétben a resveratrol kezelés csak részben csillapította a magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerek érfa li ROS termelését.

4.2 Koronária arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízásban

10 hét magas zsírtartalmú táp fogyasztását követően a patkányok testtömege, szérum inzulin, glükóz és totál koleszterin szintje

szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint a standard diétán tartott patkányok hasonló adatai. Meglepő módon azonban az ACh kiváltotta endothelium dependens dilatáció nagyságában nem találtunk különbséget a kontroll és HFD állatokból izolált koronária arteriolákban. A NO szintézisét gátló L-NAME csökkentette az ACh kiváltotta dilatációt a kontroll koronária erek esetében, míg nem volt hatással a HFD arteriolák ACh válaszára. A kontroll és elhízott patkányokból izolált koronária arteriolák L-NAME és indomethacin jelenlétében nem mutattak különbséget az ACh kiváltotta EDHF dependens dilatáció tekintetében. Érdekes módon a BKCa csatorna nyitó NS-1619 szignifikánsan nagyobb nagyobb értágulást okozott az elhízott patkányok ereiben a kontroll erek dilatációjához viszonyítva. A BKCa gátló iberiotoxin szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentette a dilatáció mértékét az elhízott patkányokból izolált koronária arteriolákban, mint a kontroll állatokból izolált erek esetében. Az SKCa gátló apamin és a IKCa gátló TRAM-34 inkubációja szignifikánsan csökkentette a ACh kiváltotta dilatációt kontroll és elhízott állatokban egyaránt. Az immunohisztokémiai vizsgálatok során a BKCa protein expressziója a kontroll és elhízott patkányokban egyaránt a simaizomsejtekbe lokalizálódott, amit az α -aktinnal való közös festődés jelzett. Az elhízott állatokban a cav-1 immunofestődés markáns csökkenése volt megfigyelhető. Az elhízott állatok elsőrendű szeptális koronária ereiben csökkent caveolin-1 expressziót detektáltunk, míg nem észleltünk különbséget a BKCa csatorna fehérje kifejeződésének tekintetében.

4.3 A megtartott koronária mikroérműködés háttérében álló folyamatok vizsgálata

A cav-1 és a BKCa között fennálló interakció bizonyítására kontroll patkányok koronária ereit metil-béta-cyclodextrinnel (M β CD) inkubáltuk, amely kísérletes körülmények között a caveolák szétrombolását eredményezi. Figyelemre méltóan a M β CD jelenlétében az iberiotoxin gátolta az Ach kiváltotta dilatációt, és megnőtt az NS-1619 kiváltotta érválasz nagysága, az elhízott patkányok koronária ereiben megfigyeltekhez hasonló módon. A caveolin-1 és a BKCa csatornák között fennálló interakció további feltárására caveolin-1 génkiütött egereket használtunk. A szelektív BKCa csatorna nyitó NS-1619 hatására kialakuló dilatációt szignifikánsan megnövekedettnek tapasztaltuk cav-1 KO egerek arterioláiban. A vad típusú erekben kiváltott hatáshoz viszonyítva az iberiotoxin kifejezetten nagyobb arányú csökkenést okozott cav-KO egerekben az ACh kiváltotta dilatációban.

5. MEGBESZÉLÉS

Az elhízás megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással járó kórállapot, mely komoly népegészségügyi problémát jelent az egész világon. Jól ismert, hogy az elhízás során a nagyerekben atheroszklerózis alakul ki, azonban újabb tanulmányok azt is kimutatták, hogy az elhízás során már a nagyerekben jelentkező érrendszeri elváltozások előtt eltérések jelentkeznek a mikrocirkuláció szintjén, amelyek szintén fontos szerepet tölthetnek be a kardiovaszkuláris rizikó befolyásolásában. Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére az elhízás során jelentkező mikrocirkulációs elváltozások pontos mibenléte és azoknak az elhízás során keringésszabályozásban betöltött szerepe nem kellőképpen tisztázott. Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a rezisztencia erekben elhízás során létrejövő elváltozásokat, illetve hogy feltárjam hogy hogyan alakul az eltérő szövetekből izolált mikroerek működése. A cél elérése érdekében az elhízás különböző állatkísérletes modelljeiből származó vázizom és koronária mikroereken vizsgáltam meg az endothelium és az érfali simaizom által közvetített érválaszokat.

5.1 Gracilis izom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata elhízott Zucker patkányokban

Kísérleteink első részében elhízott Zucker (OZ) patkányokból izolált gracilis arteriolákon vizsgáltuk meg az angiotenzin 2 (Ang 2) ismételt adásának hatására kialakuló érválaszt. Az elhízás igen gyakran társul magas vérnyomással, amelynek kialakulásában kitüntetett szerepet játszhat a renin angiotenzin rendszer fokozott aktivációja. Kutatócsoportunk korábban az elhízás diétával indukált modelljében

számolt be a szisztolés vérnyomás emelkedéséről. Korábban elvégzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy OZ patkányok ACE blokkoló kezelését követően javul az elhízáskor jelentkező endotheliális diszfunkció. Eltérő kutatócsoportoktól származó közlemények utalnak arra, hogy az angiotenzin 2 hatására kialakuló fokozott konstriktív válasz hozzájárulhat a fokozott perifériás ellenállás kialakításához a magas vérnyomás betegség kialakulása során. Kísérleteink során az izolált gracilis arteriolákon az angiotenzin 2 hatására OZ arteriolákon kialakuló konstriktív szignifikánsan nagyobb volt a LZ erekben tapasztaltaknál. Felvetettük azt a hipotézist, hogy a megnövekedett Ang 2 által előidézett konstriktív az 1-es típusú angiotenzin 2 (AT1) receptorok fokozott és fenntartott funkcionális elérhetőségének köszönhető. Ismert, hogy az AT1 receptorok folyamatos vándorlásban vannak a sejtfelszín és az endoplazmatikus retikulum között. Ez a folyamat határozza meg a következő stimulusok számára elérhető aktív AT1 receptorok számát és ez szabályozza az AT1 receptorok elérhetőségét. Kísérleteink során feltételeztük, hogy az AT1 receptorok mozgásának élettani körülmények között fennálló egyensúlya megváltozik elhízás során, amely folyamat az AT1 receptorok fokozott elérhetőségéhez, és ezáltal fokozódó vazokonstriktívhoz vezethet. Az intakt arteriolákon funkcionálisan elérhető, "aktív" AT1 receptorok funkciójának detektálására az Ang 2 kiváltotta érválaszokat 30 perc utáni várakozást követő ismételt adagolás során is megvizsgáltuk. Normál körülmények között az Ang 2 ismételt adása tachifilaxissal jár. Ennek hátterében az Ang 2 által előidézett deszenzitizáció és az AT1 receptorok következményes internalizációja áll. Ennek megfelelően kísérleteink során LZ arteriolákon szignifikánsan csökkent az Ang2 ismételt hatására kialakuló konstriktív mértéke. Érdekes módon ezzel szemben az elhízott OZ állatokból izolált gracilis arteriolákban az Ang 2 kiváltotta konstriktív megtartott maradt az

ismételt applikáció során, ami a tachifilaxis elmaradását jelzi. Mivel a noradrenalin esetében nem tapasztaltunk tachifilaxist az elhízott állatokban, így arra következtetünk, hogy valószínűleg nem a simaizom kontraktilis rendszerében, például a kalcium érzékenységekben fennálló különbség áll a fenntartott Ang 2 válasz hátterében. Mivel kísérleteink során az OZ állatok ereiből származó homogenizátumok fokozott Rho kináz aktivitást mutattak a LZ erekből származó homogenizátumokhoz képest, felvetettük azt a hipotézist, hogy a Rho kináz jelátviteli folyamata részt vesz az AT1 receptorok internalizációjában. Ennek vizsgálatára az Ang 2 kiváltotta válaszokat Rho kináz gátlóval történő gátlást követően is megvizsgáltuk. Érdekes módon az OZ erekben a Rho kináz gátló jelenlétében lecsökkent az Ang 2 ismételt hozzáadására kialakuló, korábban fenntartott Ang 2 válasz.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az elhízás genetikai modelljében a Rho kináz fokozott aktivációja figyelhető meg, amely hozzájárul az Ang 2 ismételt adására kialakuló vazokonstrikció fenntartásában vázizom arteriolákban.

Gracilis izom arteriolák endothel függő dilatációjának vizsgálata magas zsírtartalmú diétával táplált egerekben

Kísérleteink további részében magas zsírtartalmú diéta segítségével idéztünk elő elhízást egerekben. A magas zsírtartalmú étrend hatására az egerekből izolált gracilis arteriolákban károsodott az acetilkolin kiváltotta dilatáció a normál diétán tartott állatokhoz képest. Érdekes módon, amennyiben az egereket a magas zsírtartalmú diéta mellett resveratrol kezelésnek is alávetettük, abban az esetben a resveratrol hatékonyan csökkentette a magas zsírtartalmú diéta által előidézett ACh válaszban fellépő károsodást, amely megfigyelésünk összhangban áll a korábban

más kutatócsoportok által tapasztaltakkal. A magas zsírtartalmú diéta és a resveratrol hatását Nrf2 génkiütött állatokon is megvizsgáltuk. Az Nrf2 transzkripciós faktor több gén expressziójának szabályzásáért felelős, amelyek közt több antioxidáns enzim is szerepel, így fontos szerepet játszhat az oxidatív stressz szabályozásában. Az Nrf2 transzkripciós faktor szempontjából genetikailag hiányos állatokban normál diétát követően nem találtunk csökkenést a gracilis arteriolák dilatációjában a génkiütés nélküli állatok ereinek dilatációihoz viszonyítva. Ezek alapján arra következtetünk, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor élettani körülmények között nem játszik jelentős szerepet az acetilkolin által kiváltott dilatáció befolyásolásában. Az Nrf2 génkiütött egerekben a magas zsírtartalmú diéta hatására a vad típusú egerekhez viszonyítva kifejezettebb mértékben károsodott az ACh dilatáció, ami arra enged következtetni, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor protektív tényező a magas zsírtartalmú diéta hatásaival szemben. Ezzel párhuzamosan a resveratrol kezelés csak részben eredményezett javulást az ACh kiváltotta dilatációban magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerekben, így a kontroll étrenden lévő Nrf2^{-/-} egerekhez képest meglévő ACh kiváltotta dilatációban fennálló különbség továbbra is fennmaradt. Ezen eredményünk arra utalhat, hogy az Nrf2 transzkripciós faktor fontos szerepet játszhat a resveratrol vazoprotektív hatásának kialakításában. Az érfa szabadgyök (ROS) termelődés jelentős mértékben részt vesz az elhízás során tapasztalható érfa elváltozások kialakításában. Kutatócsoportunk korábbi kísérletek során bizonyította, hogy magas zsírtartalmú diétával előidézett elhízás során a xantin oxidáz eredetű szuperoxid produkció következtében károsodik a gracilis arteriolák NO mediálta dilatációja. Ezek alapján feltételeztük, hogy a magas zsírtartalmú diétán tartott egerek femorális artéria homogenizátumaiban hasonló módon megnövekedett ROS produkciót találunk, és hogy ennek

mértéke lecsökken resveratrol adását követően. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a magas zsírtartalmú diéta a Nrf2^{+/+} és Nrf2^{-/-} egerekben egyaránt szignifikánsan fokozza a ROS termelődést. A magas zsírtartalmú étrenden tartott Nrf2^{+/+} egerek esetében a resveratrol kezelés a kontroll szintre csökkentette az érfali ROS termelődését, ami alapján kézenfekvőnek tűnik, hogy a resveratrol a szabadgyöktermelődés gátlásán keresztül fejti ki hatását. Az Nrf2^{+/+} egerekkel ellentétben a resveratrol kezelés csak részben csillapította a magas zsírtartalmú diétával táplált Nrf2^{-/-} egerek érfali ROS termelését.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a magas zsírtartalmú diéta hatására a vázizom mikroerekben károsodik az endothel mediálta dilatáció. A resveratrol az Nrf2 transzkripciós faktor aktivációjával az érfali szabadgyök termelődésének csökkentésén keresztül csillapítja a magas zsírtartalmú diéta hatására fellépő endothel diszfunkciót.

Kálium aktiválta kalcium csatornáknak bekövetkező elváltozások elhízás során

Érdekes módon kísérleteinkben az elhízott patkányok koronária arterioláiban a kontroll erekhez viszonyítva megtartott ACh-kiváltotta dilatációt tapasztaltunk, a korábban kutatócsoportunk által ugyanebben a modellben gracilis arteriolákban megfigyelt károsodott dilatációval ellentétben. Eredményeinkhez hasonlóan bizonyos közlemények megtartott, sőt fokozott koronária vazodilatációról is beszámolnak az elhízás különböző állatmodelljeiben. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a NO szintáz gátlása szignifikánsan csökkentette a dilatációt kontroll erekben, míg a HFD aretriolák esetében ezzel ellentétben nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést L-NAME inkubációt követően. Ez arra utalhat, hogy elhízás során a koronária mikroérkeringésben károsodhat a NO mediálta dilatáció útvonala, azonban nem ismert

kompenzációs folyamatok segítségével fenntartott maradhat az endothel mediálta dilatáció. Kísérleteink során azt is kimutattuk, hogy elhízott állatokban megtartott marad az EDHF mediálta dilatáció. Eredményeink arról tanuskodnak, hogy elhízott állatokban a BKCa csatornák részt vesznek az EDHF válasz kialakításában és ezzel párhuzamosan azt is rögzítettük, hogy a BKCa csatorna specifikus nyitószere kifejezetten nagyobb dilatációt okozott elhízott állatokból izolált koronáriák esetében. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a BKCa csatornák fokozott aktivációja és az EDHF válaszban való fokozott részvétele is szerepet játszhat a koronária arteriolák dilatációs funkciójának megtartásában elhízás során. Már régóta ismert, hogy a BKCa csatornák részét képezik egy olyan makromolekuláris jelátviteli komplexusnak, amely különböző enzimeket és ioncsatornákat foglal magába. Sejtenyészetből származó kísérletes eredmények alapján ismert, hogy a BKCa csatornák a caveola mikrodoménekbe lokalizálódnak, és hogy a cav-1-gyel való kölcsönhatás negatív szabályozó hatással bír a BKCa csatornák izoproterenollal való aktivációjára. Ezek alapján felvetettük azt a hipotézist, hogy az elhízott patkányokban a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációban való fokozott szerepvállalásának hátterében a cav-1 gátló hatásának megszűnése állhat. Érdekes módon azt találtuk, hogy a cav-1 immunofestődés kifejezett csökkenést mutatott az elhízott patkányok koronária arterioláinak simaizomsejtjeiben. Ezen megfigyelésünkkel összhangban csökkent cav-1 fehérje expressziót mutattunk ki az elhízott patkányok koronária artériáiban a kontroll állatok koronáriáihoz hasonlóan. Ahhoz, hogy funkcionálisan igazoljuk a cav-1 BKCa csatornákra kifejtett gátló hatását, további funkcionális kísérleteket terveztünk, amelyek során cav-1 génkiütött állatokból izolált arteriolákon vizsgáltuk meg a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációban betöltött szerepét. Kísérleteink során a cav-1 KO egerek arterioláiban az EDHF

kiváltotta dilatáció mértékét kissé, de szignifikánsan fokozottnak találtuk a vad típusú egerekben tapasztalt dilatációval összehasonlítva. Érdekes módon a cav-1 KO állatokból izolált arteriolákban a BKCa csatornák kifejezett mértékben járultak hozzá az EDHF válaszhoz, ugyanakkor ennek hiányát tapasztaltuk vad típusú egerek esetében. Ebből az elképzelésből kiindulva, teoretikusan a caveolák szétrombolásával modellezni lehet a cav-1 hiányának BKCa csatorna funkcióra kifejtett hatását. Ennek megfelelően kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a kontroll patkányokból izolált koronária arteriolákat M β CD kezelésnek vetettük alá, a BKCa csatornák EDHF közvetítette dilatációhoz való hozzájárulása és a BKCa csatornák farmakológiai aktiválására kialakuló dilatáció is szignifikáns mértékben megnövekedett. Ezáltal funkcionális bizonyítékkal szolgáltunk arról, hogy a BKCa csatornák cav-1 általi caveolákba történő elrendeződése lehet az a kulcsfolyamat, amely normál körülmények között a BKCa csatornák EDHF mediálta dilatációjában való limitált részvételének hátterében áll.

Összegezve kísérleteink során elsőként szolgáltunk funkcionális bizonyítékkal a cav-1 BKCa csatornán kifejtett gátló hatásáról intakt ereken, amely magyarázatul szolgálhat a BKCa csatornák EDHF válaszban való minimális részvételére kontroll körülmények között. Magas zsírtartalmú diétával előidézett elhízásban a cav-1 gátló hatásának elvesztésével megnő a BKCa csatornák EDHF közvetítette dilatációban betöltött szerepe. Ez a folyamat elengedhetetlennek tűnik a koronária arterioláris dilatáció fenntartásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhízás során megváltozik a rezisztencia erek vazomotor működése, azonban ennek természete és a háttérben álló folyamatok pontos mibenléte nem kellőképpen ismert. Kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy az elhízás állatkísérletes modelljeiben megvizsgáljuk a vázizom és koronária mikroerek vazomotor működését. Kísérleteink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Vázizom arteriolákban az elhízás során a Rho kináz fokozott aktivációjának következtében fokozott marad az Ang 2 ismételt adására bekövetkező vazokonstrikció. 2) Elhízás hatására a vázizom erekben károsodik az endothel közvetítette dilatáció, amelyet a resveratrol az Nrf2 transzkripciós faktor aktivációjával, és ezáltal az érfali szabadgyök termelődésének csökkentésével csillapítani képes. 3. Koronária arteriolákban az elhízás során megtartott marad az endothelium közvetítette dilatáció. A cav-1 gátló hatásának elvesztésével megnő a BKCa csatornák EDHF válaszban betöltött szerepe, amely kulcsszerepet játszik a koronária mikroérműködés fenntartásában.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az elhízás során vázizom arteriolákban károsodhat a mikroérműködés, míg a koronária mikroerek a keringés fenntartására irányuló adaptációs mechanizmusok segítségével aktívan alkalmazkodnak a megnövekedett metabolikus igényhez. Úgy gondoljuk, hogy a BKCa csatornákon, a Rho kinázon ható értágító anyagoknak, illetve a resveratrolnak potenciális szerepe lehet az elhízással társuló kórállapotok terápiájában.

Iktatószám: DEENKÉTK /186/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fehér Attila

Neptun kód: IUX2O4

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bagi, Z., **Fehér, A.**, Cassuto, J., Akula, K., Labinsky, N., Kaley, G., Koller, Á.: Increased availability of angiotensin AT1 receptors leads to sustained arterial constriction to angiotensin II in diabetes - role for Rho-kinase activation.
Br. J. Pharmacol. 163 (5), 1059-1068, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01307.x>
IF:4.925 (2010)
2. **Fehér, A.**, Rutkai, I., Belezna, T., Ungvári, Z., Csiszár, A., Édes, I., Bagi, Z.: Caveolin-1 limits the contribution of BK(Ca) channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity.
Cardiovasc. Res. 87 (4), 732-739, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq088>
IF:6.051
3. Ungvári, Z., Bagi, Z., **Fehér, A.**, Recchia, F.A., Sonntag, W.E., Pearson, K., de Cabo, R., Csiszár, A.: Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2.
Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. 299 (1), H18-H24, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2010>
IF:3.88
4. Jebelovszki, É., Király, C., Erdei, N., **Fehér, A.**, Pasztor, T.É., Rutkai, I., Forster, T., Édes, I., Koller, Á., Bagi, Z.: High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: Role of soluble guanylate cyclase activation.
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 294 (6), H2558-H2564, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01198.2007>
IF:3.643

További Közlemények

5. Bagi, Z., **Fehér, A.**, Cassuto, J.: Microvascular responsiveness in obesity: Implications for therapeutic intervention.
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01606.x>
IF:4.925 (2010)
6. Beleznai, T., **Fehér, A.**, Spielvogel, D., Lansman, S.L., Bagi, Z.: Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 300 (3), H777-H783, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00831.2010>
IF:3.88 (2010)
7. Bagi, Z., **Fehér, A.**, Beleznai, T.: Preserved coronary arteriolar dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for reactive oxygen species.
Pharmacol. Rep. 61 (1), 99-104, 2009.
IF:2.086
8. Rutkai, I., **Fehér, A.**, Erdei, N., Henrion, D., Papp, Z., Édes, I., Koller, Á., Kaley, G., Bagi, Z.: Activation of prostaglandin E2 EP1 receptor increases arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes.
Cardiovasc. Res. 83 (1), 148-154, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp098>
IF:5.801

Összesített impakt faktor: 35,191

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 18,499

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.09.06

