

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A 2-es típusú diabetes és oxidatív stressz vaszkuláris
hatásai**

Rutkai Ibolya

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A 2-es típusú diabetes és oxidatív stressz vaszkuláris
hatásai**

Rutkai Ibolya

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

A 2-es típusú diabetes és oxidatív stressz vaszkuláris hatásai

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok
tudományágban

Írta: Rutkai Ibolya okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája

(kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Bari Ferenc, akadémikus

Dr. Jeney Viktória, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. január 20. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Bak István, Ph.D.

Dr. Halmosi Róbert, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Bari Ferenc, akadémikus

Dr. Jeney Viktória, Ph.D.

Dr. Bak István, Ph.D.

Dr. Halmosi Róbert, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. január 20. 13:00 I. sz. Belgyógyászati Klinika

BEVEZETÉS

Szívérrendszeri megbetegedések 2-es típusú diabetes mellitusban

Napjainkban a kardiovaszkuláris betegségek (magas vérnyomás, perifériás érbetegségek, iszkémiás szívbetegség) a leggyakrabban előforduló egészségügyi problémák és a halálokok között is vezető szerepet játszanak. Kialakulásuk hátterében a megváltozott szénhidrátanyagcserének (metabolikus szindróma, cukorbetegség) és az oxidatív stressznek is szerepe lehet. A 2-es típusú diabetes mellitus különböző anyagcserezavarok összefoglaló neve, amit a megváltozott szénhidrát- és lipidanyagcsere-folyamatok jellemeznek. A kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában szerepet játszó diabetest jellemzi az emelkedett vércukorszint, károsodott glükóztolerancia, emelkedett triglicerid, valamint csökkent magas denzitású lipoprotein (HDL) szint és a társult magas vérnyomás. Az érrendszeri betegségek kialakulásában a nagy erek szintjén létrejövő elváltozásoknak (pl. atherosclerosis) és a kórosan megváltozott mikrocirkulációnak (arteriola, venula, nyirokér) egyaránt fontos szerepe van. Cukorbetegségben a kis erek szintjén fellépő mikrokeringési zavarok (agyi, kardiális, alsó végtagi) hozzájárulnak az ezen betegségben szenvedők fokozott morbiditásához és mortalitásához. A 2-es típusú diabetes mellitusban (2-DM) nem kellően ismert a megváltozott mikroér működés patomechanizmusa, ezért nagyon fontos kutatási terület a szöveti keringést fenntartó/javító terápiás lehetőségek, valamint a 2-DM-hoz társult magas vérnyomás gyógyszeres kezelési elveinek kidolgozása. Az utóbbi években derült fény a reaktív oxigén gyökök (ROS) *in vivo* jelentőségére. A sejtek működése során kis mennyiségben minden esetben termelődnek reaktív oxigén gyökök, melyeknek fontos szerepe van a jelátviteli folyamatok szabályozásában. Kóros körülmények között, illetve citosztatikus terápia mellékhatásaként (pl. doxorubicin kezelés) a ROS fokozott mértékben termelődhetnek.

Endothelium funkció

Az endothelium (a vér- és nyirokereket bélelő sejtréteg, egy endokrin-parakrin-autokrin szerv) startégiai szerepet játszik a vaszkuláris homeosztázis fenntartásában és kialakításában. Véralvadási folyamatokban sima felszíne miatt csökkenti a vérlemezke és leukocita adhéziót, így antitrombotikus hatású. Szerepe van az ion- és folyadékcsereben, hozzájárul az érfalban zajló lokális gyulladásos folyamatokhoz. Mindemellett az endothelium különböző ingerekre vasoaktív anyagokat szintetizál és szabadít fel, melyek az ér simaizom kontrakcióját és relaxációját szabályozzák, ezáltal befolyásolva az adott érterület vérellátását és a szöveti perfúziót.

A lokális keingés szabályozásában fontos szerepe van a miogén tónusnak, különböző anyagcseretermékeknek ($p\text{CO}_2$, tejsav, $p\text{O}_2$, pH), érsérüléseknek, hőmérsékletváltozásnak, hormonoknak, a szimpatikus aktivitásnak és az endothelsejtekben termelődő faktoroknak (NO, endotelinek, prosztaciklinek). Az endothelium által termelt vazodilatátorok közül a NO az egyik legfontosabb vegyület. A NO egy szabadgyök, mely a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) által katalizált reakcióban L-argininből és oxigénből citrullin keletkezésén keresztül képződik és gyorsan lebomlik. Ép endothelium funkció esetén különböző humorális és mechanikai ingerek hatására (például acetilkolin, hisztamin, trombin, fokozott áramlás miatt keletkező nyíróerő) fenntartott a NO termelés. A NO az artériák, a kapillárisok és a vénák területén is fontos szerepet játszik az érátmérő szabályozásában. Az endothelből felszabaduló NO aktiválja az ér simaizom rétegében található szolubilis guanilát-ciklázt (sGC), ami az intracelluláris ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentráció növekedéséhez vezet, melyet az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és/vagy simaizom Ca^{2+} érzékenység csökkenés és végső soron simaizom relaxáció

követ. A NO *in vivo* játszott szerepére utal, hogy a saját kísérleteinkben is használt patkány gracilis izomból izolált, ép endothellel rendelkező artériákban az L-arginin analógok csökkentették az acetilkolin hatására létrejövő dilatáció mértékét, igazolva, hogy az endotheliumból felszabaduló NO részt vesz a vázizom arteriolák acetilkolinra adott dilatatív válaszában.

A lokális vérátáramlás szabályozásában szerepe van a miogén és a metabolikus mechanizmusoknak is a neurális és humorális faktorokkal együtt. A vaszkuláris endothelium a vazodilatátor természetű anyagok mellett vazokonstriktor anyagokat is termel, melyek közül az endotelin szerepe a legismertebb. Az endotelin egy 21 aminosavat tartalmazó polipeptid, három izoformája létezik (endotelin-1, 2 és 3), melyek különböző endotelin receptorokon fejtik ki hatásukat. Az angiotenzin II szintén endothel által termelt fontos vazokonstriktor anyag, mely angiotenzin I-ből főként az endothel felszínén lévő angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hatására képződik. Az angiotenzin II a simaizomsejteken található G-fehérje kapcsolt receptorok stimulálásával fejt ki hatását: növeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, a protein kináz C aktivációt, a simaizomsejt migrációt és a proliferációt.

A miogén tónus

A rezisztenciaerek állandó nyugalmi tónussal, vagy más néven miogén tónussal bírnak, ami lehetővé teszi az erek különböző stimulusokra (vazokonstriktív illetve vazodilatatív faktorokra, a transzmurális nyomás emelkedésére illetve csökkenésére) bekövetkező konstriktióját vagy dilatációját, ezáltal hatékonyan szabályozva az anyagcsereigényeknek megfelelő szöveti perfúziót. 2-DM-ban az endothel és simaizom funkcionális károsodásának szerepet tulajdonítanak mind a makrovaszkuláris, mind a mikrovaszkuláris funkciózavar és érszövődmények kialakulásában.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A renin angiotenzin rendszer (RAS) koordinálja azt a hormonális kaszkád útvonalat, mely fontos szerepet játszik mind a veseműködés, mind az érátmérő szabályozásában. A rendszer első eleme a renin, amely a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből szabadul fel. A kaszkád következő lépésében a renin elhasítja a májban termelődő angiotenzinogént, amelynek során az inaktív deka-peptid, az angiotenzin I (Ang I) képződik. Az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) által katalizált reakcióban jön létre AngI-ből az aktív angiotenzin II (Ang II) peptid. Az Ang II-nek két receptorát jellemezték behatóan (AT1R és AT2R). Az AT1R közvetített folyamatok Ang II általi szabályozása számos élettani folyamatban szerepet játszik, úgy mint a vazokonstrikció, sejt differenciálódás, aldoszteronszekréció és a reninfelszabadulás. Habár az AT2R funkciója kevésbé feltárt, általánosan elfogadott, hogy Ang II stimulációjának következtében az AT1R-ral ellentétes hatást fejt ki. Az Ang II metabolikus termékei közül az angiotenzin 1-7 (Ang1-7) és az angiotenzin III (Ang III vagy des-aspartyl-AngII) érdemel még említést.

Vaszkuláris prosztaglandin szintézis

A gyulladás a szervezet komplex válaszreakciója, feladata a károsító hatás megszüntetése, a normál struktúra és funkció helyreállítása. A védelemben fontos szerepet játszanak a különböző proteolitikus kaszkádrendszerek és gyulladásos mediátorok, például a leukotriének és a prosztaglandinok. A kardiovaszkuláris megbetegedések egy része krónikus, alacsony szintű szöveti gyulladással társul. A gyulladásos folyamatok jelentős része a kis artériák (rezisztenciaerek) szintjén játszódik le. Az érfalban létrejövő gyulladásos válasz ugyanakkor fontos szerepet tölt be élettani körülmények között is azáltal, hogy az érfal felépítésében és működésében változásokat vált ki, így biztosítva a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodást. Az utóbbi évek kutatásai szerint az alacsony szintű szöveti gyulladásos folyamatok központi szerepet játszhatnak a diabeteses vaszkuláris szövődmények kialakításában. A

gyulladásos folyamatok mediátorai közül a proszttaglandinok arachidonsavból származó biokatív anyagok, az arachidonsavból a ciklooxygenáz (COX) hatására a proszttaglandin G₂, majd abból H₂ (PGH₂) képződik, melyből további származékok is létrejönnek. A COX egy membránkött két funkciójú enzim, ami katalizálja az arachidonsav PGG₂-vé történő konverzióját ciklooxygenáz aktivitásának köszönhetően és a PGG₂, PGH₂ átalakulását peroxidáz aktivitása révén. A COX enzimek két izoformáját azonosították, a COX-1-et és COX-2-t. A COX-1 konstitutívan expresszálódik a legtöbb szövetben és felelős a proszttaglandin szintézisért élettani körülmények között. Ezzel szemben a COX-2 egy indukálható enzim, szintje alacsony a legtöbb szövetben, azonban gyulladásos stimulusokra, mint például citokinek, mitogén faktorok, expressziója jelentős mértékben megnő. Számos tanulmányban leírták, hogy a COX-2 aktiválódása kulcsszerepet játszik a gyulladásos betegségek, a szívelégtelenség és az atherosclerosis patofiziológiájában. DM-ban a proszttaglandinszintézis növekedése vaszkuláris működési zavarokhoz vezet. A glükóz és metabolitjai valószínűleg azáltal fejtik ki hatásukat, hogy megváltoztatják a különböző biokatív mediátorokat, melyek szerepet játszanak a vaszkuláris sejtek funkciójában és főként a celluláris integritásban. A vaszkuláris sejtekben számos különböző prosztanoid szekretálódik mint például PGI₂, PGE₂, PGF α , továbbá az érfal számos sejtje reagál prosztanoidokra. A proszttaglandin receptorok nevüket a preferált szubsztátjaikról kapták. A klasszikus prosztanoid receptorok plazmamembránhoz kötöttek és G protein kapcsolnak. A legtöbb prosztanoidot az endothelsejtek szekretálják, többek között a COX útvonalon keresztül szintetizálódó PGI₂-t, ami fontos a vaszkuláris homeosztázis és trombózis szabályozásában. A vaszkuláris simaizomban található IP receptorokhoz kötődve növeli az intracelluláris cAMP koncentrációját antagonizálva ezáltal a konstriktív hatásokat és gátolva a MAPK útvonalat. A PGE₂ és PGF₂ α a PGI₂-vel ellentétben attól függően, hogy mely

receptorához kötődik képes mind vazokonstrikciót, mind vazodilatációt kiváltani. A PGE₂ EP₂ receptoron keresztül hatva a simaizomsejtek relaxációjához vezet.

Oxidatív stressz

Szabadgyököknek nevezzük azokat a vegyületeket, amelyeknek külső elektronhéján egy vagy több párosítatlan elektron található. Oxigén szabadgyökökről beszélünk, amennyiben a párnélküli elektron vagy elektronok egy oxigén atom külső elektronhéján helyezkednek el. A szervezetben a szabadgyökök hatása kétirányú, egyrészt nélkülözhetetlenek bizonyos biokémiai, immunológiai és enzimatisz folyamatoknál, másrészt a képződő szabadgyökök károsíthatják a sejtek, szövetek működését. A sejtek működése során általában kis mennyiségben termelődnek reaktív oxigéngyökök (ROS). Mennyiségük patológiás körülmények között meghaladhatja az antioxidáns rendszer kapacitását, minek következtében különböző makromolekulák (proteinek, lipidek, szénhidrátok, DNS) oxidációja jöhet létre, ami funkcionális és morfológiai károsodáshoz vezethet. Számos tanulmány foglalkozik a ROS szerepével a DM következtében kialakuló vaszkuláris diszfunkció patogenezisében. Ezt a jelenséget oxidatív stressznek nevezzük, melynek a kardiovaszkuláris megbetegedéseken túl igen fontos szerepet tulajdonítanak a daganatos betegségek patomechanizmusában is. A diabeteses komplikációk és az oxidatív stressz között szoros összefüggés áll fenn. A ROS csoportjába tartozó elsődleges szabadgyök a szuperoxid anion (O_2^-), melyből más molekulákkal történő interakció során további ROS képződhetnek: hidroxil gyök ($OH\cdot$), proxilok, alkoxilok (RO_2^- , $RO\cdot$), nitrogén oxidok ($NO\cdot$, $NO_2\cdot$). A ROS forrásai lehetnek: a mitokondriális elektrontranszport lánc, a fagocitózis folyamata, továbbá az enzimrendszerek működése során (NADPH-oxidáz, xantin-oxidáz, monoamino-oxidáz, citokróm P450-oxidáz, NOS, COX izoenzimek, lipoxigenázok) is számos ROS keletkezhet. Hidroxil gyök

keletkezhet a Fenton és a Haber-Weiss reakciók révén is. A ROS termelő és elimináló rendszerek a vaszkuláris sejtekben is megtalálhatóak és számos esetben kimutatták, hogy az oxidatív stressznek fontos szerepe van a kardiovaszkuláris megbetegedések patogenezisében, továbbá az oxidatív stressz során keletkező ROS befolyásolja illetve károsítja az érfal fiziológiai funkcióját.

Doxorubicin és PARP-2

A doxorubicin (DOX) egy széles körben alkalmazott, antraciklin alapú citosztatikum, melyet elsődlegesen szolid tumorok, limfómák és leukémiák kezelésére használnak. Hatásának alapját az jelenti, hogy képes beépülni a DNS-be, megváltoztatni a szerkezetét, DNS töréseket okozni és ezen keresztül apoptózist indukálni tumorsejtekben. Emellett a mitokondriumok egyes enzimei képesek a DOX-ból szemikinin gyökök képzésére. A képződött szemikinin instabil és elektronját könnyen továbbadja, elősegítve ezzel különböző reaktív intermedierek képződését. Számos tanulmány azt sugallja, az előbb említett szabadgyökök károsítják a vaszkulaturát és a szívizmot. Mindezen megfigyelésekkel összhangban a DOX kezelés legjelentősebb mellékhatása súlyos kardiotoxicitása. A DOX okozta kardiotoxicitáshoz hozzájárulhat endothelium károsodást okozó tulajdonsága is. Az endothel diszfunkció létrejöttének hátterében a ROS képződés, valamint a megváltozott NO szintézis állhatnak. A DOX kezelés ROS termelést fokozó hatása a DNS törések kiváltásával aktiválhatja a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) enzimeket is, mely folyamat hozzájárulhat a kezelést követő vaszkuláris funkciózavar kialakulásához. Ezen funkciózavar kialakulásának oka lehet a PARP aktiváció következtében lecsökkenő NAD^+ szint, amely a sejtek elhalásához vezethet. A PARP-2 a poli-ADP-ribóz polimeráz enzimes család tagja. A poli(ADP-ribozil)áció a fehérjék poszttranszlációs módosítása a PARP enzimek által,

minek során a NAD^+ bontásából származó ADP-ribóz polimereket (PAR) kapcsolnak intracelluláris fehérjékhez.

CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos kutatásaimban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. A 2-es típusú diabetes mellitus állatkísérletes modelljében vizsgáljam a vázizomzatban található rezisztenciaerek működésében létrejövő elváltozásokat, különös tekintettel a megváltozott proszttaglandin szintézis mikrovaszkuláris és szisztémás hatásaira.
2. Feltárjam a poli-ADP-ribóz polimeráz-2 szerepét a reaktív oxigén szabadgyök termelést kiváltó doxorubicin kezelés vaszkuláris hatásaiban.

METODIKÁK

A 2- DM genetikai állatmodellje

Kísérleteinkben 12-14 hetes hím db/db (C57BL/KsJ-db⁻/db⁻), valamint kontroll heterozigóta (C57BL/KsJ-db⁺/db⁻) egereket használtunk. A működőképes leptin receptor hiányában a táplálkozási idő megnyúlik a homozigóta (db/db) egerekben, melynek következtében súlyos mértékben elhíznak és hiperglikémiások lesznek. A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai állatmodelljében kialakuló metabolikus eltérések hasonlóak a humán 2-es típusú diabetes mellitus során létrejövő elváltozásokhoz.

PARP-2 knock out egerek

12-14 hetes PARP-2^{-/-} és vad típusú egereket (C57BL/6-Parp2^{tm1Jmdm}) használtunk. Az egereket négy csoportra osztottuk: PARP-2^{+/+} kontroll; PARP-2^{-/-} kontroll; PARP-2^{+/+} DOX kezelt; PARP-2^{-/-} DOX kezelt. Kísérleteink során a kezelt csoport egyedeit intraperitoneálisan 25 mg/kg DOX-nal illetve a kontroll csoport állatait sóoldattal oltottuk be.

Az artériás vérnyomás mérése

Az egerek vérnyomását éber állatokban az ún. „tail cuff” módszer segítségével mértük. Az egerek farkára pneumatikus pulzusérzékelővel felszerelt mandzsetta került, melynek segítségével meghatároztuk az állatok vérnyomását és szívfrekvenciáját.

Izolált mikroértechnika

Izolált mikroér kísérleteinket egér *musculus gracilis*-ból izolált arteriolákon végeztük. Pentobarbitál nátriummal altatott állatokból steril körülmények között metszettük ki a megfelelő arteriolát tartalmazó szövetdarabot és jégbe hűtött Ca^{2+} mentes Krebs oldatot tartalmazó Petri-csészében izoláltuk. Az arteriola 1-2 mm-es szakaszát kipreparáltuk, majd hideg oxigenizált Ca^{2+} mentes Krebs oldatot tartalmazó szervkádba helyeztük. Az arteriolákat üvegapillárisok segítségével kanuláltuk és egy nyomás-szervó rendszerre csatlakoztattuk. Ezután beállítottuk az eredeti érhosszt, a hőmérsékletet 37 °C-ra emeltük és a szervkádban lévő Ca^{2+} mentes Krebs oldatot 2,5 mM CaCl_2 -ot tartalmazó Krebs oldatra cseréltük, melyben a kísérleteket végeztük. A belső érátmérő változását videómikroszkópos rendszer segítségével detektáltuk.

Izometrikus kontrakciómérés

Az egerek exterminálását követően eltávolítottuk az aortát, amit 4 °C-os, oxigenált Ca^{2+} mentes Krebs-et tartalmazó Petri-csészében rögzítettünk és

mikrosebészeti eszközök segítségével megtisztítottunk a környező szövetektől. Preparálást követően az aortát ~4 mm hosszú gyűrűkre vágtuk és izometriás kontrakció mérő rendszeren két, egyenként 40 μm átmérőjű fém drótot vezettünk az ér lumenébe, majd az egyik oldalt a mozgatható, a másik oldalt a fix erőmérő karhoz rögzítettük. A rögzítést követően a Ca^{2+} -mentes Krebs oldatot Ca^{2+} -tartalmúra cseréltük és a kísérlet végéig oxigenizáltuk és 37 °C-on tartottunk.

A miogén tónus vizsgálata

Kísérleteinkben vizsgáltuk a db/db egerekből izolált gracilis arteriolák spontán kifejlődő miogén tónusának mértékét. Az arteriolákban 20 Hgmm-es kezdőnyomásról kiindulva az intraluminális nyomást 20 Hgmm-enként emeltük egészen 120 Hgmm-ig. Minden egyes nyomásérték beállítását követően megvártuk a spontán miogén tónus kifejlődését, az adott nyomás mellett kialakuló érátmérő meghatározása során. Az arteriolák átmérőjét egyaránt vizsgáltuk Ca^{2+} tartalmú (aktív átmérő) és Ca^{2+} -mentes (passzív átmérő) Krebs oldatban.

Western immunoblot

Az EP1 és EP4 receptor expresszióját a kontroll és db/db egerekből származó izolált aortákon vizsgáltuk. Az aortákat eltávolítottuk, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd az aortadarabokat 200 μl SDS mintapufferben homogenizáltuk és főztük (10 perc). A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 150 V feszültségen 1 óra alatt választottuk el, majd polyvinil membránra transzferáltuk. Az EP1 és EP4 receptorok kimutatására poliklonális antitestet, míg fehérje mennyiség kontrollként anti- β -aktin ellenes antitestet használtunk. A kemilumineszcens jeleket autoradiográfiával vizualizáltuk és az optikai denzitást a NIH Image szoftver segítségével számszerűsítettük és a β aktinra kapott jel mértékére normalizáltuk.

Kanulált erek válaszainak értékelése

A vazoaktív szerek hatására kialakuló átmérőváltozásokat abszolút értékekben, illetve a Ca^{2+} mentes oldatban megfigyelt passzív átmérő százalékában fejeztük ki. A normalizált érátmérőt az adott nyomásértéken mért aktív és passzív érátmérő arányokból határoztuk meg. Az arteriolák miogén tónusát az ugyanazon a nyomásértéken mért aktív (Ca^{2+} tartalmú Krebs-ben mért) átmérő Ca^{2+} mentes Krebs oldatban mért (passzív) átmérőjének százalékában adtuk meg. A statisztikai analízishez ANOVA-t használtunk, amit Tukey post hoc teszttel egészítettünk ki. Az értékeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $P < 0,05$ volt.

Izometriás rendszeren (ring) mért válaszok értékelése

Eredményeink kiértékelésére Student-féle t-próbát használtunk, ahol a $P < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Eredményeinket a vazokonstriktív anyagok esetében abszolút egységekben, mN-ban ábrázoltuk, míg a vazodilatatív anyagok hatására bekövetkező kontraktilis erő csökkenést a norepinefrin válasz százalékában adtuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

db/db egerek vizsgálata

Eredményink szerint a db/db egerekben éber állapotban mért szisztolés vérnyomás értékek (155 ± 5 Hgmm) szignifikánsan magasabbak a kontroll állatokban mért értékekhez (136 ± 4 Hgmm) viszonyítva, míg a szívfrekvencia hasonló a két csoportban.

Hipotézisünk az volt, hogy a 2-DM állatmodelljeként szolgáló db/db egerekben az 1-es típusú PGE₂ (EP₁) receptor aktiváció felelős az arteriolák

fokozott tónusáért, aminek eredménye a magas szisztolés vérnyomás. Funkcionális kísérleteinkben elsőként az EP1 receptor aktivációjának szerepét vizsgáltuk az intraluminális nyomás és az agonista Ang II indukálta tónus kialakításában. A db/db egerek izolált arterioláiban minden nyomásértékre szignifikánsan nagyobb mértékű miogén tónus alakult ki a kontroll erekkel összehasonlítva, ami összhangban volt korábbi megfigyelésünkkel. Az Ang II indukálta kontrakció szintén szignifikánsan nagyobb mértékű volt a db/db egerek arterioláiban. Kísérleteinket elvégeztük a szelektív EP1 receptor antagonistá, az AH6809 jelenlétében, aminek a kontroll csoportban nem volt hatása a nyomás és Ang II indukálta válaszokra, azonban a db/db egerek arterioláinak mind a nyomás, mind az Ang II indukálta tónusát a kontroll erek szintjére csökkentette. Hipotézisünket alátámasztotta, hogy db/db egerek arterioláin mind a nyomás, mind az agonista Ang II által kiváltott kontrakció nagyobb mértékű volt a kontrollhoz viszonyítva, mely fokozott tónust a szelektív EP1 receptor antagonistá AH6809 jelentősen csökkentette. Ezen eredmények felvetették annak a lehetőségét, hogy db/db egerekben az endogén PGE₂ aktiválta EP1 receptoroknak van szerepe a nyomás és agonista indukálta tónus kialakításában. Ismert, hogy a PGE₂ négy különböző G fehérje kapcsolt receptort aktiválhat, melynek eredményeként mind vazodilatáció (EP2 és EP4), mind vazokonstriktó (EP1 és EP3) kialakulhat. Irodalmi adatok szerint a PGE₂ receptorai közül az egyes típusú PGE₂ receptor (EP1) aktivációja vezet elsősorban vazokonstriktóhoz. Saját kísérleteink során azt találtuk, hogy az exogén módon alkalmazott PGE₂ és a szelektív EP1 receptor agonista 17-fenil-trinor-PGE₂ által kiváltott kontrakció szignifikánsan nagyobb volt db/db egerek izolált arterioláiban, mely kontrakció kifejlődését az EP1 receptor antagonistá AH6809 mindkét csoportban gátolta. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az exogén PGE₂ izolált egér arteriolákon kontrakciót vált ki, továbbá hogy az emelkedő nyomás és Ang II indukálta kontrakcióban központi szerepe van az

EP1 receptor fokozott érzékenységének. Az EP4 receptor mediálta válaszok lehetőségének kizárására kísérleteinket elvégeztük a szelektív EP4 receptor gátló L161982 jelenlétében is mind kontroll, mind db/db egerek arterioláin. A PGE₂ hatására kialakult tónust a szelektív EP4 receptor antagonistá L-161982 (1 µM) nem befolyásolta egyik csoportban sem. Kísérleteink eredményei arra engedtek következtetni, hogy az EP4 receptornak a PGE₂ kiváltotta válaszokban nincs jelentős szerepe. 2-DM-ben a NO biológiai hozzáférhetősége csökkent, így a prosztanoidok indukálta válaszok fokozottak lehetnek. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára az NO szintézis gátló L-NAME-et használtuk és megállapítottuk, hogy a NOS gátlás sem az arteriolák tónusát, sem a PGE₂ kiváltotta kontrakciót nem befolyásolja számottevően egyik csoportban sem. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PGE₂ indukálta válaszokhoz a NO korlátozott mértékben járul hozzá. Meg kell jegyezni azonban, hogy a PGE₂ kiváltotta kontrakció nem volt teljes mértékben gátolható az EP1 receptor antagonistával egyik csoportban sem, azonban teljes mértékben megszüntethető volt a thromboxán A₂ receptor blokkoló SQ29548 alkalmazásával. Ezen megfigyelésünk alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a PGE₂ illetve metabolikus származékai nagyobb koncentrációkban aktiválhatják az arteriola falában található thromboxán A₂ receptorokat. Megfigyelésünk összhangban van más kutatócsoportok megállapításaival, melyek szerint az SQ29648 csökkenti a db/db egerek arterioláinak fokozott tónusát és a PGE₂ kiváltott kontrakciót mesenterialis arteriolákon. Ezek alapján feltételezhető, hogy a db/db egerek fokozott konstriktív hajlama a mikroérfalban megtalálható és ko-aktiválódó prosztaglandin és thromboxán receptoroknak tulajdonítható. Eddigi adataink az EP1 receptor központi szerepét támogatják, melyet western immunoblotlaltal is igazoltunk: db/db ergerekben fokozott EP1 receptor expressziót detektáltunk. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a fokozott expresszió jelenlétének nem egyértelmű következménye a fokozott kontrakció, ugyanis az EP1 receptor

jelátviteli útvonalai szintén szerepet játszhatnak a fokozott tónus kialakításában. Az EP1 receptor aktivitása igen összetett és még nyitott kérdés a szív-érrendszeri szabályozásban. A PGE₂ aktiválta receptorok hatással lehetnek más vérnyomás szabályozó mechanizmusokra, melyek az extracelluláris folyadék térfogatát szabályozzák a vesében és fontos szerepük lehet a központi idegrendszerben is. Spontán hipertenzív patkányokban és krónikus Ang II infúzió adásakor az EP1 receptor aktiválása hozzájárul a vérnyomás emelkedéséhez. A db/db egerek izolált ereiben, *in vitro* körülmények között megfigyelt fokozott EP1 receptor aktiváció *in vivo* szerepének tisztázása érdekében mind kontroll, mind db/db egerekben vizsgáltuk a szisztémásan adott EP1 receptor gátló vérnyomásra gyakorolt hatását. Az állatokat 9 napon keresztül tartottuk megfigyelés alatt. A 4. naptól számítva 4 napon keresztül részesültek az EP1 receptor gátló AH6809 kezelésben (10 mg/kg/nap, *per os*). Az éber állatok vérnyomását tail-cuff módszerrel mértük és azt találtuk, hogy a db/db egerek szisztolés vérnyomása magasabb a kontrollokéhoz viszonyítva. Az EP1 receptor gátló szignifikánsan csökkentette a db/db egerek vérnyomását, míg a kontroll egerek vérnyomására nem volt hatással. Mi több, a db/db egerekben az EP1 receptor antagonistá elhagyása után az állatok vérnyomása a kiindulási, magasabb értékre emelkedett. Eredményeink arra utalnak, hogy az EP1 receptor *in vivo* gátlása a szisztémás vérnyomás csökkenését eredményezi db/db egerekben. A PGE₂ akut, *in vivo* alkalmazásának hatására csökken a szisztémás vérnyomás, azonban ezen akut hatások nagyban függhetnek a kísérleti elrendezéstől. Hím egerekben megfigyelték, hogy az EP1 receptor hiánya is vérnyomáscsökkenést okoz, ami arra utal, hogy az EP1 receptornak hosszútávon döntő szerepe lehet a szisztolés vérnyomás emelkedésben. Ezzel összhangban van saját kísérletünk eredménye is, melyben az EP1 receptor gátló kezelés hatására csak a második nap után csökkent jelentősen a db/db egerek vérnyomása, azonban az EP1 receptor gátló közvetett hatását sem lehet kizárni.

PARP-2 vaszkuláris biológiai szerepének jellemzése doxorubicin kezelt egerekben

A DOX kezelés mind a szívet, mind az ereket károsítja. Az érrendszer esetében a DOX kezelés hatással van az endothelium funkciójára, azonban nincsenek pontos adatok arra, hogy a hatás a vaszkuláris simaizmon vagy az extracelluláris mátrixban bekövetkező változások miatt alakul ki. Kísérleteink során doxorubicin kezelt és kezeletlen kontroll (PARP-2+/+) és PARP-2 knock out (PARP-2-/-) egerekből származó aortákon izometriás kontrakció mérést végeztük. A kontrakciós erőt mN-ban rögzítettük. A konstriktív hatású anyagokat (KCl, 10 – 60 mM; szerotonin, 1 nM – 30 μ M; norepinefrin, 0,1 μ M – 30 μ M) kumulatív dózisban alkalmaztuk. A relaxáció vizsgálatát prekontrahált (norepinefrin, 3 μ M) ereken végeztük acetilkolinnal (Ach, 1 nM – 30 μ M) és nitroprusszid nátriummal (SNP, 10 nM – 300 μ M). Méréseink során nem találtunk különbséget a kezeletlen PARP-2+/+ és PARP-2-/- egerek aortáinak KCl, szerotonin (5-HT), norepinefrin (NE) válaszkészségében. Ugyanakkor DOX kezelés szignifikánsan csökkentette a NE, 5-HT és KCl indukálta kontrakciók mértékét PARP-2+/+ egerekben, míg a PARP-2-/- egerek részlegesen védettek voltak. Az endothelium funkciójának vizsgálatára acetilkolint használtunk. A DOX kezelés hatására bekövetkező válaszkészség csökkenés egyik csoportban sem mutatott szignifikáns különbséget. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy megerősítettük a DOX kezelés hatására bekövetkező endothelium funkció romlását, de ez független volt a PARP-2-től az általunk használt kísérleti elrendezésben 2 nappal a kezelés után. Fontos megemlíteni, hogy a korai DOX kezelésnek vaszkuláris simaizom károsító hatása is lehet: az alacsony dózisú doxorubicin kezelés szignifikánsan csökkentette a patkány thorakális aorta kontraktilis válaszait. Kísérleteink során az erek dilatatív kapacitását SNP-vel vizsgáltuk. Az SNP kiváltotta endothelium független vazorelaxációt nem befolyásolta sem a DOX kezelés, sem a PARP-2

genotípus. Ez arra utal, hogy nincs összefüggés a csökkent acetilkolin válszok és a simaizomsejtek csökkent NO reaktivitása között. Eredményeink azt sugallják, hogy DOX kezelés hatására létrejövő simaizom funkció romlása PARP-2 függő folyamat.

ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban kimutattuk, hogy a genetikailag módosított db/db állatok vaszkuláris preparátumain nagyobb mértékű miogén tónus alakult ki a kontrollal összehasonlítva. Az Ang II indukálta kontrakció szintén szignifikáns mértékben nagyobb volt a kontroll csoporttal összehasonlítva. Megállapítottuk, hogy a db/db egerekből származó érpreparátumok fokozott tónusát az EP1 receptor antagonisták alkalmazása a kontroll csoport szintjére csökkentette, azonban a PGE2 hatására kialakult tónust a szelektív EP4 receptor antagonistá vagy NOS inhibitor alkalmazása nem befolyásolta. A db/db egerekben fokozott az EP1 receptor expresszió, valamint az éber állapotban mért vérnyomásértékeik a kontroll csoportéhoz hasonlítva. Ezen emelkedett vérnyomást az EP1 receptor antagonistá alkalmazása a kontroll csoport értékére csökkentette. Megállapításaink felvetik az EP1R gátláson alapuló terápiáját a 2-es típusú diabetes-hez kapcsolódó mikorvaszkuláris vazomotor diszfunkció és a magas vérnyomás kezelésében.

PARP-2 knock out egerek aortáin végzett kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a PARP-2 deléció véd a doxorubicin okozta vaszkuláris károsodás ellen. Eredményeink azt sugallják, hogy az endothelfunkcióban bekövetkező romlás nem PARP-2 mediált folyamat, azonban a simaizomfunkció romlása

PARP-2 mediált. Megfigyeléseink felvetik a PARP-2 farmakológiai gátlásának hatásosságát a doxorubicin által kiváltott kardiovaszkuláris mellékhatások megelőzésében.

Iktatószám: DEENKÉTK /285/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Rutkai Ibolya

Neptun kód: HDBA73

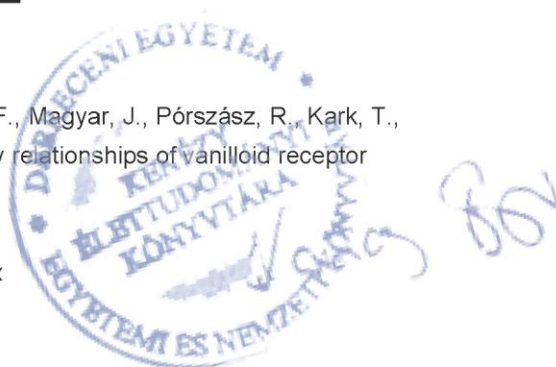
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szántó, M., **Rutkai, I.**, Hegedűs, C., Czikora, Á., Rózsahegy, M., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., Tóth, A., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction.
Cardiovasc. Res. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr246>
IF:6.051 (2010)
2. **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

További Közlemények

3. Czikora, Á., Lizanecz, E., Bakó, P., **Rutkai, I.**, Ruzsnavszky, F., Magyar, J., Pórszász, R., Kark, T., Facskó, A., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1.
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of Print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x>
IF:4.925 (2010)



4. Fehér, A., **Rutkai, I.**, Beleznai, 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
5. Jebelovszki, É., Király, C., Erdei, N., Fehér, A., Pásztorné Tóth, E., **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

Összesített impakt faktor: 26,471

Összesített impakt faktor (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 11,852

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, 2011.11.16

