

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A 2-ES TÍPUSÚ DIABETES MELLITUS MIKROVASZKULÁRIS HATÁSAI

DR. ERDEI NÓRA

Témavezető: DR. BAGI ZSOLT

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Kardiológiai Intézet

Klinikai Fiziológia Tanszék

Debrecen

2007

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Szívérrendszeri megbetegedések 2-es típusú diabetes mellitusban.....	7
2.2. Vazomotor működészavar 2-es típusú diabetes mellitusban.....	8
2.3. Vazomotor diszfunkció és oxidatív stressz	13
2.4. Diabetes mellitus, vazomotor diszfunkció és oxidatív stressz	18
2.5. Prosztaglandin szintézis eltérései 2-es típusú diabetes mellitusban	21
2.6. A levosimendan metabolit OR-1896 hemodinamikai és vazomotor hatásai	22
3. METODIKÁK.....	26
3.1. A 2-es típusú diabetes állatkísérletes modelljei.....	26
3.2. Szisztémás hemodinamikai mérések.....	27
3.3. Vérkémiai meghatározások/analitikai módszerek	28
3.4. Izolált mikroértechnika	28
3.5. Kísérleti protokollok izolált mikroereken	30
3.6. Reaktív oxigén szabadgyök származékok kimutatása	33
3.7. Immunhisztokémia.....	34
3.8. Western immunoblot.....	34
3.9. Statisztika	35
4. EREDMÉNYEK	36
4.1. A 2-es típusú diabetes mellitus diétával indukált modellje.....	36
4.2. A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai modellje	45
4.3. A levosimendan és az OR-1896 vazoaktív hatásai.....	56
5. MEGBESZÉLÉS.....	60
6. ÖSSZEFOGLALÁS	74
7. IRODALOMJEGYZÉK	75
8. TÁRGYSZAVAK	100
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	101
10. FÜGGELÉK.....	102

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE: angiotenzin-konvertáz enzim

ACh: acetilkolin

AD: aktív átmérő

AT-1: angiotenzi II 1-es típusú receptor

AT-2: angiotenzi II 2-es típusú receptor

BH₄: tetrahidrobiopterin

cAMP: ciklikus adenosin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

COX: ciklooxygenáz

COX-1: ciklooxygenáz-1 izoenzim

COX-2: ciklooxygenáz-2 izoenzim

DCHF: diklorodihidrofluoreszcein

EDHF: endothel-dependens hiperpolarizáló faktor

EDRF: endothel által termelt relaxációs faktor

eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid szintáz

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

FMN: flavin-mononukleotid

GLI: glibenclamid

HFD: magas zsírtartalmú diéta

H₂O₂: hidrogén-peroxid

IBTX: iberiotoxin

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

L-NAME: L-nitro-arginin-metil-észter

LOX: lipoxigenáz

LVDA: bal kamrai diasztolés area

LVEDD: bal kamrai vég diasztolés átmérő

LVESD: bal kamrai vég szisztolés átmérő

LVSA: bal kamrai szisztolés area

MCP-1: monocita kemoattraktáns fehérje-1

NADH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid

NADPH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát

nNOS: neurális nitrogén-monoxid szintáz

NO: nitrogén-monoxid
NO⁺: nitrozónium kation
NO⁻: nitroxil anion
NOS: nitrogén-monoxid szintáz
O₂⁻: szuperoxid anion
·OH: hidroxil gyök
ONOO⁻: peroxinitrit
PG: proszttaglandin
PGE₂: proszttaglandin E₂
PGH₂/TXA₂: proszttaglandin H₂/tromboxán A₂
PGI₂: prosztaciklin
PD: passzív átmérő
RNS: reaktív nitrogén szabadgyökök
ROS: reakítv oxigén szabadgyökök
sGC: szolubilis guanilát-cikláz
SHR: spontán hipertenzív patkány
SNP: nitroprusszid-nátrium
SOD: szuperoxid-diszmutáz
STZ: streptozotocin
TEA: tetraetil-ammónium
TP: tromboxán A₂
VCAM-1: vaszkuláris sejt adhézíós molekula-1
VSMC: vaszkuláris simaizom sejt
XD: xantin-dehidrogenáz
XO: xantin-oxidáz
2-DM: kettes típusú diabetes mellitus
4-AP: 4-aminopiridin

1. BEVEZETÉS

A szívérrendszeri megbetegedések (magasvérnyomás, iszkémiás szívbetegség, perifériás érbetegségek) komoly népegészségügyi problémát jelentenek, mivel a legtöbb fejlett országban, így hazánkban is, ezen betegségcsoport okozza a megbetegedések és halálozások legnagyobb hányadát. A 2-es típusú diabetes mellitus (2-DM) gyakorisága rohamos léptékben növekszik Magyarországon. Ismert, hogy a 2-DM jelentős mértékben fokozza a szívérrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát. Megdöbbentő statisztikai adat, hogy DM-ban a szívinfarktus kialakulásának kockázata a már korábban egyéb okból szívinfarktuson átesett betegek rizikófokozódásával egyenlő nagyságú. DM-ban a kis ereket érintő microangiopathia talaján kialakuló nephropathia, neuropathia, retinopathia, cerebrális-, kardiális, és alsó végtagi mikrokeringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az ezen betegségben szenvedők fokozott morbiditási és mortalitási rizikójához. Továbbá az is ismert, hogy a 2-DM gyakran társul magasvérnyomás betegséggel. 2-DM-ban a megváltozott mikroér működés természete és a háttérben álló pontos kórélettani mechanizmusok azonban nem kellően ismertek, ezért a szöveti keringést fenntartó, illetve az azt javító terápiás lehetőségek, valamint a 2-DM-hoz társult magasvérnyomás gyógyszeres kezelési elvei még nem kellő mértékben kidolgozottak.

A rezisztencia erek tulajdonsága, hogy bizonyos élettani stimulusokra jelentős értágulattal válaszolnak, ezáltal egyfelől biztosítva a fokozott szükségletnek megfelelő szöveti vérellátást, másfelől hozzájárulva a perifériás ellenállás és következményes szisztémás vérnyomás kialakításához. Ismert, hogy a mikroerek átmérőjének szabályozásában kiemelkedően fontos szerepe van az érfalban lokalizált nyomás-érzékeny miogén, valamint az endothelium által közvetített mechanizmusoknak. A mikroerek átmérőjének, ezáltal a szöveti perfúzió és perifériás vaszkuláris rezisztencia nagyságának kialakításában ugyancsak fontos szerepe van a

környező szövetekben termelődött, de az érfalra közvetlenül legtöbbször valamely receptoron keresztül ható vazóaktív hatású anyagoknak.

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy eltérő patológias állapotokban, mint például kísérletesen előidézett magasvérnyomásban, atherosclerosisban, hyperhomocysteinaemiában, és uraemiában az érfal-függő, áramlás-érzékeny, valamint az egyes receptorok által közvetített keringésszabályozó mechanizmusok működése károsodik, ami egyrészt a szöveti keringés zavarához vezethet, másfelől szerepet játszik a szisztémás vérnyomás növekedésének kialakításában. Azonban kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy 2-DM-ban hogyan változik meg a rezisztencia erek funkciója, és milyen mechanizmusok állnak a megváltozott mikroér működés hátterében.

Mindezek alapján tudományos kutatásaimban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg.

1. A 2-es típusú DM állatkísérletes modelljeiben vizsgáljam a rezisztencia erek endothel-függő és simaizom által közvetített vazomotor működésében létrejövő elváltozásokat.
2. Feltárjam a mikroerek vazomotor működészavarában szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, különös tekintettel az oxidatív stressz és megváltozott prosztaglandin szintézis mikrovaskuláris hatásaira.
3. Továbbá, hogy vizsgáljam olyan potenciálisan vazóaktív hatású vegyületek, mint például a levosimendan és metabolitja, az OR-1896 mikroér vazomotor működésre gyakorolt hatását, és annak pontos mechanizmusát, mely vegyületeknek szerepe lehet bizonyos kórállapotokban, például az általunk 2-es típusú DM-ban megfigyelt károsodott mikroérműködés helyreállítását célzó terápiájában.

A kísérleteink eredményei és az azokból levonható következtetések segíthetnek a humán 2-es típusú diabetes mellitusban kialakuló mikroér funkciózavar kórélettani folyamatainak megismerésében, valamint hozzájárulhatnak a kóros mikroérműködés és annak következtében kialakuló szisztémás hemodinamikai elváltozások megelőzésére és a kardiális rizikó csökkentésére irányuló gyógyszeres terápiás elvek kidolgozásához. Kísérleteink segítségével a koronária mikroereken ható új hatásmechanizmusú gyógyszerek kifejlesztése és azok hatásmechanizmusainak vizsgálata is megvalósítható lehet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Szívérrendszeri megbetegedések 2-es típusú diabetes mellitusban

A 2-es típusú diabetes mellitus különböző etiológiájú anyagcserezavarok összefoglaló neve, melyet elsősorban a szénhidrát, de a lipid anyagcserét is érintő folyamatok komplex eltéréseivel társuló krónikus hiperglikémia jellemez. ¹ Jól ismert, hogy a lipid anyagcsere kóros elváltozásai (hiperkoleszterinémia, hipertrigliceridémia, aterogén diszlipidémia szindróma) az iszkémiás szív-, agy- és perifériás érbetegségek létrejöttének egyik fő rizikófaktorát képezik. Az érrendszeri komplikációk nagyrészt a lipid anyagcsere zavar következményeként kialakuló atherosclerosis miatt jönnek létre. Korábbi vizsgálatok rámutattak arra a tényre, hogy a makrovaszkuláris atherosclerotikus érelváltozások mellett, illetve azt megelőzően diszlipidémiában funkcionális mikrovaszkuláris elváltozások alakulnak ki.^{2, 3} A diszlipidémia okozta makro- és mikrovaszkuláris funkciókárosodás hátterében részben az endothel működésének megváltozását feltételezik, amely központi szerepet játszhat egyes aterogén folyamatok elindításában és kialakításában. ⁴⁻⁷

A további klinikai kutatások rávilágítottak arra a tényre is, hogy a szénhidrát anyagcsere legjelentősebb zavarának, a ma már epidémia jellegű diabetes mellitusnak szintén szerepe van a kardiovaszkuláris rizikó fokozódásában.⁸ A diabetes mellitus önmagában olyan mértékű kardiovaszkuláris rizikó fokozódást jelent, ami a már korábban miokardiális infarktuson átesett betegek rizikó fokozódásával egyenlő nagyságú.⁹

Ezért nem meglepő, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában különösen komoly szereppel bírhat egy olyan kórállapot, amely a magas vércukorszint, károsodott glükóz tolerancia mellett egyéb lipid eltéréseket, így az emelkedett triglicerid szint és

csökkent magas denzitású lipoprotein (HDL) szint, valamint magas vérnyomás együttes előfordulását is magában foglalja.¹⁰ Korábbi tanulmány szerint elsősorban a lipid háztartás zavarait érintő, elhízással és magasvérnyomással társuló metabolikus szindróma esetén 3,53-szorosára, ugyanakkor a 2-DM együttes fennállása esetén 8,19-szorosára emelkedik a kardiovaszkuláris mortalitás.¹¹ 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeknél feltételezeten az anyagcsere-folyamatok kóros következményei miatt kialakuló kardiovaszkuláris (cerebrális, kardiális, alsó végtagi) szövődmények okozzák a betegek legnagyobb hányadának morbiditását és mortalitását.¹²⁻¹⁵ Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére a diabetes mellitusban megfigyelhető szív- és érrendszeri elváltozások pontos kórélettani mechanizmusai és a kialakulásukban szerepet játszó patológiai tényezők még ma sem teljesen tisztázottak. Prospektív populációs vizsgálatok kimutatták, hogy a szoros vércukor kontroll csökkenti a diabetesben szenvedő betegek mikroérrendszeri elváltozásaiból adódó vaszkuláris rizikófokozódást, ami a normálisnál magasabb plazma glükóz kóroki szerepére irányította a figyelmet.¹⁶

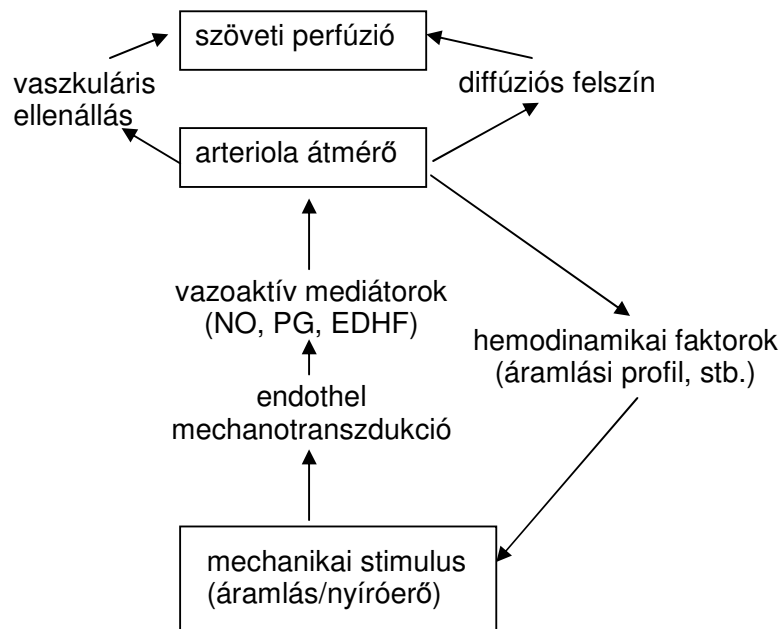
2.2. Vazomotor működészavar 2-es típusú diabetes mellitusban

A hosszú ideig fennálló 2-DM-ban a nagyerekben atherosclerosis alakul ki, amely nagymértékben hozzájárul a kardiovaszkuláris mortalitás növekedéséhez. Újabb vizsgálatokban felvetették azt a hipotézist, hogy 2-DM-ban már a nagy erek atherosclerosis előtt elváltozások jelennek meg a mikroerek szintjében. 2-DM-ban mind a makrovaszkuláris, mind a mikrovaszkuláris funkciózavar és érszövődmények kialakulásában jelentős szerepet tulajdonítanak a vaszkuláris endothel és simaizom funkcionális károsodásának.¹⁵ A mikroerek vazomotor működésének zavara a rezisztencia erek szintjében a lokális szöveti vérátáramlás szabályozó, adaptációs folyamatainak beszűküléséhez, valamint a perifériás ellenállás

megváltozásához, ezáltal magasvérnyomás betegség kialakulásához vezethet. 2-DM-ban a kis ereket érintő microangiopathia talaján kialakuló nephropathia, neuropathia, retinopathia, cerebrális, kardiális, és alsó végtagi mikrokeringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az ezen betegségben szenvedők fokozott morbiditási és mortalitási rizikójához. Azonban a mikroerek megváltozott vazomotor működésének természete és a háttérben álló pontos kórélettani mechanizmusok nem kellően tisztázottak.

Endothel diszfunkció

Az elmúlt évek kutatásai bebizonyították, hogy a vaszkuláris endothel nemcsak egy az ereket bélelő passzív barrier. Kis tömegéhez (~110 gramm) képest óriási felületet képez, (~350 m²) és aktívan részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer működésében. Fontos élettani feladata a vérkeringés lokális szabályozása, részt vesz az ion és folyadékcserében, kontrollálja a véralvadási mechanizmusokat, a vérlemezke és leukocita adhézio folyamatát, az érfalban zajló lokális gyulladásos folyamatokat, a vaszkulogenezist, és angiogenezist.¹⁷ Az endothel különböző fiziológiás stimulusokra értágító és érszűkítő anyagok szintézisével és felszabadításával válaszol, ezáltal szabályozva az adott érterület vérellátását, a szöveti perfúziót. Az endothel további alapvető tulajdonsága a szenzoros funkció, melynek során az endothel membrán receptor-függő és független mechanizmusok révén érzékeli a különböző mechanikai stimulusokat, így a transzluminális nyomásváltozást és az áramlás okozta nyíróerő/feszültség változásait.¹⁸ Ezen paraméterek változásai élettani mechanizmusokon keresztül szabályozzák a rezisztencia erek átmérőjét, ezáltal a szöveti keringés kialakításában töltenek be fontos szerepet. A lokális keringésszabályozás meghatározó a szövetek, szervek vérellátásának biztosításában, melyet a vérnyomás változása esetén a fokozódó anyagcsere igényekhez alakít, ezáltal a véráramlást függetleníti a vérnyomás pillanatnyi változásaitól. (1. ábra)



1.ábra. NO: nitrogén monoxid, PG: prosztaglandin, EDHF: endothel-dependens hiperpolarizáló faktor

A lokális keringésszabályozási mechanizmusokban korábban a vazoaktív metabolitok, az artériás pH, pO_2 , pCO_2 szerepét hangsúlyozták, azonban az elmúlt évtizedek kutatásai megmutatták, hogy az intrinzik vaszkuláris mechanizmusok (miogén mechanizmus, nyírófeszültség indukálta dilatáció) nagymértékben hozzájárulnak a lokális vérátáramlás szabályozásához. A sebészek és morfológusok körében már több száz éve ismert, hogy az erek nagysága a bennük áramló véráramlás nagyságával arányos, tehát nemcsak az érátérő határozza meg az áramlást, hanem e tétel fordítva is igaz.

Az endothel által termelt legfontosabb vazodilatátor anyagok a nitrogén monoxid (NO), a prosztaciklin (PGI_2) és a mai napig tisztázatlan természetű endothel-dependens hiperpolarizáló faktor (EDHF). Az egyes vazodilatátorok a különböző érterületeken eltérő mértékben járulnak hozzá a vazodilatáció kialakításához.¹⁹ Furchgott és Zawadzki

bizonyították először, hogy az acetilkolin (ACh) kiváltotta relaxációra csak az ép endothellel rendelkező erek képesek. Ez vezetett az endothel által termelt relaxációs faktor (EDRF) felfedezéséhez²⁰, amelyről Palmer és mtsai 1987-ben bizonyították be először, hogy a NO-dal azonos.²¹ Az azóta eltelt évek kutatásai részletesen feltárták a NO élettant, biokémiáját. A NO a nitrogén monoxid szintáz (NOS) által katalizált reakcióban L-argininből és oxigénből képződik, miközben L-citrullin és NO szabadul fel. A NOS több izoformája található meg az emlős szervezetben, az endotheliális (eNOS), neurális (nNOS) és az indukálható (iNOS) izoforma, melyek szabályozása, és élettani funkciói eltérőek.²² A biokémiai reakció kofaktorai a redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) és a tetrahydrobiopterin (BH₄).²³ A NOS obligát alkotórésze a hem vas, a flavin-mononukleotid (FMN)²⁴ és a flavin-adenin-dinukleotid (FAD).²⁵ A vaszkuláris szövetekben termelődött és felszabadult NO a vaszkuláris simaizomban a szolubilis guanilát-cikláz (sGC) enzim aktivációjához vezet, mely enzim emeli az intracelluláris ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentrációt. Ennek következtében a Ca²⁺ koncentráció és/vagy a simaizom Ca²⁺ érzékenység csökkenés révén vaszkuláris simaizom relaxáció jön létre.^{26, 27} Az endothel vazodilatátor működése további az endothel által termelt dilatátor faktorok, mint például a mai napig tisztázatlan természetű endothel-dependens hiperpolarizáló faktor (EDHF), és a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) rendszeren keresztül ható ciklooxygenáz (COX) izoenzimek (COX-1 és COX-2) termelte prosztaglandinok, a prosztaglandin E₂ (PGE₂) és a PGI₂ következménye is.^{28, 29}

Az endothel azonban nem csak dilatátor természetű, hanem konstriktor anyagokat is termel. Ilyen anyag az endothelin, amely egyike a leghatékonyabb vazokonstriktor molekuláknak. Három izoformája létezik (endothelin 1,2,3), melyek az endothelin különböző receptorain keresztül fejtik ki hatásukat.³⁰ Az endothel által termelt másik fontos vazokonstriktor anyag az angiotenzin II. Az angiotenzin II az angiotenzin I-ből képződik az

angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hatására, mely enzim a lokális renin-angiotenzin rendszer részeként feltehetőleg a vaszkuláris endothelben és a simaizomban is megtalálható.³¹

³² Az angiotenzin II a simaizomsejtek felszínén található receptoraihoz (AT-1 és 2) kötődik, a G-protein rendszeren keresztül fejti ki hatását, melynek eredménye az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése, a protein kináz C aktivitásának és a simaizomsejtek migrációjának és proliferációjának fokozódása.³³ A ciklooxygenáz izoenzimek nemcsak vazodilatátor, hanem vazokonstriktor természetű prosztaglandinokat is termelnek. Ilyen a prosztaglandin H_2 /tromboxán A_2 ($\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$), amely a simaizomsejteken megtalálható receptorok aktivációjával erőteljes vazokonstriktort idéz elő.³⁴

Az endothel rendkívül összetett, egymással párhuzamosan működő és kölcsönhatásban álló élettani folyamatainak megbomlott egyensúlya bizonyos kórélettani körülmények között az endothel kóros működéséhez, endothel diszfunkcióhoz vezethet. Az endothel diszfunkció esetén megbomlik a vazodilatátor (NO, PGI_2 , EDHF) és vazokonstriktor (endothelin-1, angiotenzin II, vazokonstriktor prosztaglandinok) tényezők közötti egyensúlyi állapot. Így a vazodilatátor mechanizmusok csökkenése, vazodilatátor adaptációs folyamatok beszűkülése, vazospasmus alakul ki. Azonban a lokális szöveti faktorok aktiválódása és az endothel működési egyensúlyának megbomlása következtében nemcsak az endothel-függő vazodilatátor folyamatok sérülnek, hanem a vérlemezkék, monocyták és egyéb sejtes elemek adhéziója következtében fokozott trombóziskészség, az érfali simaizomsejtek proliferációja és az érfalban lokálisan zajló gyulladás alakul ki,^{18, 35} melyek tovább károsíthatják az endothel működését.

A miogén tónus diabetes mellitusban

A vaszkuláris rezisztencia kialakításában szerepet játszó egyik legfontosabb tényező a

miogén válasz, amely elsősorban a mikroerek szintjében működik.³⁶ A rezisztencia erek állandó tónussal bírnak, amely további konstriktórt, vagy dilatációt tesz lehetővé. Ennek következtében hatékonyan szabályozható az anyagcsere igényekhez igazított szöveti perfúzió. A mikrovaszkuláris tónust a környező szövetek metabolikus igénye, az idegrendszer, a keringő és lokálisan termelődő hormonok, és mechanikai tényezők együttesen szabályozzák. A szisztémás vérnyomás emelkedése a mikroerek elsősorban simaizom-közvetítette vazokonstriktóját eredményezi, ezt a jelenséget miogén tónusnak nevezzük. Az érfalban termelődő, vagy a környezetben felszabaduló vazokonstriktor anyagok hatására az értónus fokozódhat, míg ha az endothelből vazodilatátor természetű anyagok szabadulnak fel, akkor a tónus mértéke csökken. A bazális miogén tónus a szöveti vérátáramlás gyors és hatékony szabályozását teszi lehetővé. A miogén tónusnak a különböző kórállapotokban bekövetkező változásai még nem teljesen ismert. Néhány munkacsoport tanulmányozta csupán a miogén válasz lehetséges változását diabetesben, elsősorban vázizom mikrokeringésben. Streptozotocinnal (STZ) előidézett diabeteses patkányok cremaster arterioláiban in vivo kísérletekben a miogén konstriktor válasz károsodásodott.³⁷ Hill és Ege patkányból izolált cremaster arteriolákban azt találták, hogy mind az aktív, mind a passzív nyomás-indukált érválasz károsodik, azaz a miogén válasz megváltozott működése alakul ki diabetes mellitusban.³⁸

Számos tanulmányban leírták a simaizom Ca^{2+} érzékenységének megváltozását, amelynek következtében fokozott bazális miogén tónus és agonista-kiváltotta vazokonstriktó alakul ki diabetes mellitusban.³⁹⁻⁴¹ Az érintett útvonalak némelyike szerepet játszik az intravaszkuláris nyomásváltozás mechanotranszdukációjában, azonban nem ismert pontosan az, hogy ezen elváltozások hogyan befolyásolják a vázizom arteriolák miogén választ.

2.3. Vazomotor diszfunkció és oxidatív stressz

A sejtek működése során normálisan kis mennyiségben termelődnek reaktív oxigén

szabadgyökök (ROS), melyeknek fontos szerepe van a szignáltranszdukciós folyamatok szabályozásában.⁴² Kóros körülmények között azonban a ROS fokozott mértékben termelődhetnek, amely meghaladja az antioxidáns rendszerek kapacitását, és a különböző makromolekulák (DNS, proteinek, szénhidrátok, lipidek) oxidációja jöhet létre, ami a sejtek funkcionális és morfológiai károsodásához vezethet. Ezt a jelenséget oxidatív stressznek nevezzük. Az oxidatív stressznek fontos szerepet tulajdonítanak számos betegség, így az Alzheimer betegség, a daganatos megbetegedések, és az atherosclerosis pathomechanizmusában.^{43, 44}

Szabadgyököknek nevezzük azokat a molekulákat, amelyek egy vagy több párosítatlan spinű elektronnal rendelkeznek. Az oxigént is tartalmazó szabadgyököket reaktív oxigén szabadgyököknek (ROS-nek), míg a nitrogént tartalmazókat reaktív nitrogén szabadgyököknek (RNS-nek) nevezzük. A ROS csoportjába tartozó elsődleges szabadgyök a szuperoxid anion (O_2^-), amelyből más molekulákkal reakcióba lépve „szekunder” ROS képződhet, így hidrogén peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök ($\cdot OH$), és a lipid peroxil gyökök. RNS tulajdonképpen a NOS által termelt NO, amelynek számos fiziológiai funkciója van (pl.: neurotransmisszió, vérnyomás-szabályozás, vazodilatáció).^{44, 45} A NO-ból számos más RNS képződhet, így a nitrozonium kation (NO^+), a nitroxyl anion (NO^-) és a peroxinitrit ($ONOO^-$).^{43, 44}

Az emlős sejtekben az élettani folyamatok során ROS-et a mitokondriális elektron transzport lánc, a xantin-oxidáz (XO), a NAD(P)H-oxidáz, a NOS, a COX izoenzimek, a lipoxigenáz (LOX), és a citokróm p450 monooxygenázok termelik. A ROS és származékaik élettani funkcióik mellett károsíthatják a sejtek működését, ezért a sejtek többszörös antioxidáns védelemmel rendelkeznek, melyek szabályozzák a ROS szintjét. Ilyen antioxidáns védelmet biztosít a sejtek szuperoxid-diszmutáz (SOD) rendszer, a kataláz, a glutation-peroxidáz rendszer és a ROS termelő folyamatok nagyfokú kompartmentalizációja.⁴²

A ROS termelő és elimináló rendszerek a vaszkuláris sejtekben is megtalálhatóak és

újabbban számos esetben kimutatták, hogy az oxidatív stressznek a kardiovaszkuláris megbetegedések pathogenezisében fontos szerepe lehet.⁴⁶⁻⁵⁰ Az oxidatív stressz során a ROS és a RNS az érfal számos fontos fiziológiai funkcióját károsíthatják.^{51, 52} A ROS és RNS feltételezett vaszkuláris hatásait az alábbi táblázat foglalja össze. (1. táblázat)

Oxidatív ágens	Célmolekula	Hatás
O₂⁻	NO	A NO inaktivációja következtében csökken a sGC aktiválása Peorxinitrit képződés
	Fe-S komplexek	Az aktonitáz és mitokondriális respiráció gátlása Fe felszabadulás következtében, mely OH [•] képződést eredményez
	Katekolaminok	Az epinephrin és norepinephrin gátlása az adrenerg aktivitást csökkenti
H₂O₂	Kataláz	sGC aktiváció
	GSH peroxidáz	GSSG termelődés
	COX	Peroxid képződés
	PGI ₂ szintáz	ROS és RNS inaktiváció
OH[•]	Thiolok	sGC inaktiválása
	Lipidek	Vazoaktív izoprosztánok és oxidált lipid termékek képződése
NO	sGC hem része	sGC aktiválás
	Citokróm-oxidáz	A respiráció reverzibilis gátlása
RNS	Thiolok	sGC inaktiválása
	COX	Peroxinitrit aktiválás

	Tirozin	PGI ₂ nitrálása és inaktiválása
	Fe-S komplex	Az akonitáz és mitokondriális respiráció gátlása Fe felszabadulás következtében, mely (RS) ₂ Fe(NO) ₂ komplex képződést eredményez

1. táblázat. A reaktív oxigén gyökök és származékaik hatása a vaszkuláris rendszerre⁵²

A vaszkuláris szövetekben is megtalálható a citoplazmatikus Cu-Zn-SOD, a mitokondriális Mn-SOD és az extracelluláris SOD, melyek fő funkciója, hogy megakadályozzák a NO és a O₂⁻ reakcióját, ezáltal növelve a NO biológiai aktivitását.⁵² A vaszkuláris SOD aktivitásának eredményeként a O₂⁻ koncentráció a pikomoláris tartományban marad és az igen gyorsan (~10⁻⁹ másodperc alatt) lejátszódó reakció eredményeként H₂O₂ keletkezik. Bár a H₂O₂ gyengébb oxidáló hatással bír, könnyen képes átdiffundálni a plazmamembránokon⁵³. Újabban azt feltételezik, hogy a H₂O₂-nak fontos szerepe lehet az érátmérő szabályozásában. Különböző érterületeken leírták mind vazokonstriktor,^{54, 55} mind pedig vazodilatátor hatását.^{56, 57} A H₂O₂ a szöveti kataláz-antioxidáns rendszer hatására molekuláris oxigénné és vízzé alakul át. A SOD aktivitásának hiányában, vagy fokozott O₂⁻ produkció esetén az O₂⁻ szint nanomoláris tartományba emelkedhet, és reakcióba léphet a vaszkuláris NO-dal peroxinitritet képezve. Ez a reakció rendkívül gyorsan (6,7x 10⁹ mol/Lxs⁻¹)⁵⁸, a O₂⁻ inaktiválásánál háromszor gyorsabban játszódik le. A O₂⁻ és NO reakciója során keletkező ONOO⁻ egy igen stabil, erős oxidáló ágens.

Az érfalban terelődő szabadgyökök többféle mechanizmus útján hoznak létre endothel diszfunkciót. A O₂⁻ egyrészt inaktiválja a NO-t képződés közben, így csökken a NO biológiai hozzáférhetősége, ezáltal károsodik az endothel dependens vazodilatáció⁵⁹, másrészt az LDL oxidálódását váltja ki⁶⁰. A O₂⁻ és annak metabolitja a H₂O₂ a génexpressziót is befolyásolják. A redox-szenzitív kinázokat aktiválva és specifikus foszfatázokat inaktiválva a génexpresszió fokozódik, így nő pl. a vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1 (VCAM-1), és a monocyta

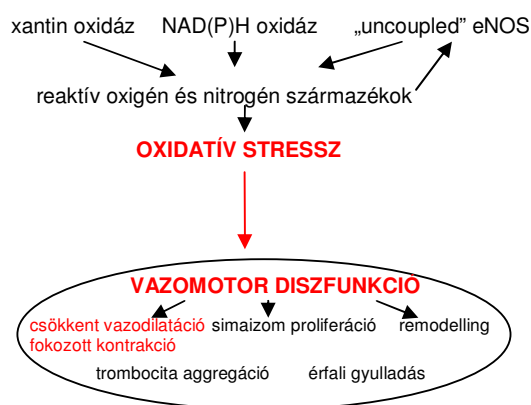
kemoattraktáns fehérje-1 (MCP-1) expressziója.⁴² A ROS olyan géneket is aktivál, melyek expressziója az oxidatív hatásra adott adaptív válasz részét képezik. Ilyen gének maguk az antioxidáns enzimrendszereket kódoló gének (SOD és kataláz) aktiválódása is.⁶¹ A O_2^- és a H_2O_2 a vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC) és a fibroblasztok növekedését és a VSMC migrációt aktiválva, valamint a celluláris apoptózist indukálva hozzájárul a vaszkuláris remodelling létrejöttéhez is.⁶²

Újabb kísérletes megfigyelések szerint a vaszkuláris ROS termelésében három fő enzim, a NAD(P)H-oxidáz, a xantin-oxidáz (XO) és a NOS vesz részt.⁴⁶ A vaszkuláris endothel sejtekben és simaizomban a ROS egyik lehetséges forrása a membránhoz kötött NAD(P)H-oxidáz.^{63, 64} A NAD(P)H-oxidáz az oxigént a NADH illetve a NADPH egy elektronját felhasználva O_2^- -dá redukálja.⁶⁵ A vaszkuláris NAD(P)H-oxidázt a citokinek, hormonok és az érrendszerre ható mechanikai erők egyaránt aktiválhatják⁶⁶.

A xantin-oxidáz (XO) a purin metabolizmus során a hypoxantin és xantin oxidációját katalizálja. A xantin-dehidrogenáz (XD) reverzibilis (intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés, oxidatív stressz), vagy irreverzibilis (proteolízis) módosítás által xantin-oxidázzá (XO) alakulhat. A XD a reakció során NAD^+ -t, míg a XO a molekuláris O_2 -t redukálja, miközben O_2^- és H_2O_2 képződik.⁶⁷ A mikroerek endothelsejteiben nagy mennyiségben megtalálható az enzim.⁶⁸ In vivo spontán hipertenzív patkányokkal (SHR) végzett kísérletek során merült fel először, hogy a XO által termelt O_2^- -nak szerepe lehet a NO biológiai hozzáférhetőségének csökkentésében. A SHR-nál a rekombináns SOD szignifikánsan csökkentette a vérnyomást, míg normál vérnyomású patkányokban nem befolyásolta azt. A XO gátlószere, az oxypurinol szintén csökkentette a SHR-ok vérnyomását, mely szintén arra utal, hogy a XO-nak szerepe van a magasvérnyomás kialakításában.⁶⁹ Kísérletesen előidézett atherosclerosisban az emelkedett O_2^- szintet a XO gátló oxypurinol szintén csökkentette,⁷⁰ hiperkoleszterinémiás betegekben pedig az oxypurinol javította a károsodott vazodilatációt.⁷¹

A vaszkuláris O_2^- lehetséges harmadik forrása az eNOS. Az eNOS a tetrahidrobiopterin (BH_4) kofaktor jelenlétében, mely az enzimhez annak hem csoportja körül kötődik, az L-arginin guanidino csoportjának nitrogénjére juttat egy elektront, miközben NO képződik. Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a neurális NOS képes ROS-t termelni L-arginin vagy BH_4 hiány esetén.⁷¹ Inzulín rezisztens patkányokban a fokozott vaszkuláris ROS termelést a BH_4 terápia adása csökkentette, mely arra utal, hogy a BH_4 hiánya következtében az eNOS O_2^- -t termel.⁷²

Összefoglalva tehát elmondható, hogy az eltérő etiológiájú betegségekben megfigyelhető endothel diszfunkció hátterében oxidatív stressz állhat. A ROS-t a vaszkuláris szövetekben található három enzimrendszer, a XO, NAD(P)H-oxidáz és az eNOS termelheti. Az enzimek által termelt ROS, főként a O_2^- , a NO-dal reakcióba lépve csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét és endothel diszfunkcióhoz vezethet.



2. ábra. Oxidatív stressz indukálta endothel diszfunkció mechanizmusai.

2.4. Diabetes mellitus, vazomotor diszfunkció és oxidatív stressz

Kezdeti humán vizsgálatokban a DM-ban szenvedő betegeknél a nagyerek (aorta, koronária) felgyorsult ütemű atherosclerosisát figyelték meg. Későbbi vizsgálatokban azonban azt találták, hogy még az atherosclerotikus, illetve kis erek esetében a

mikroangiopathiás morfológiai elváltozások megjelenése előtt, illetve azzal párhuzamosan károsodik mind a nagy konduktancia erek, mind a mikorerek funkcionális vazomotor működése ⁷³, amely a szöveti perfúzió károsodásával az iszkémiás állapotok kialakulását teszi lehetővé.

Humán kísérletekben az a.brachialis endothel funkcióját vagy ismert hatású agonista szerrel, vagy a végtagot ellátó artéria 5 perces leszorítása utáni felengedésének kapcsán kialakuló érátmérő-változással, az ún. áramlás-indukálta dilatációval mérik. Ilyen kísérletes körülmények között Clarkson és mtsai I. típusú diabetes mellitusban szenvedő betegeken az a.brachialisban csökkent mértékű áramlás-függő dilatációt találtak. ⁷⁴ Vehkavaara és mtsai ⁷⁵, valamint Makimattila és mtsai ⁷⁶ II. típusú diabeteses betegeken az a.brachialis csökkent mértékű endothel-függő dilatációját írták le, míg az endothel-független vazodilatáció nem változott a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Hasonlóan a humán megfigyelésekhez a DM különböző állatkísérletes modelljeiben is megfigyelték az eltérő érterületek agonista szerek kiváltotta, endothel-függő érválaszainak károsodását. Tesfamariam és mtsai alloxánnal kezelt diabeteses nyulak abdominális aortáján (izolált érgyűrű preparátumon) ⁷⁷, míg Keegan és mtsai STZ-indukálta diabeteses patkányok thoracalis aortáján találtak csökkent mértékű ACh-indukálta dilatációt. ⁷⁸ Koltai és mtsai alloxánnal kezelt diabeteses kutyák koronária erein figyeltek meg csökkent mértékű endothel-függő ACh-kiváltotta dilatációt. ⁷⁹

Hasonló eredményekről számoltak be a mikroerek funkcionális elváltozásaival kapcsolatban is. Palmer és mtsai az ACh-indukálta dilatáció csökkenését mutatták ki STZ-indukálta diabeteses patkányok mesenterialis arterioláiban, ⁸⁰ míg Haygate és mtsai inzulinrezisztens patkányok mesenterialis artériáján csökkent bradikinin- és ACh-indukálta dilatációról számoltak be. ⁸¹ Lagaud és mtsai inzulin rezisztens db/db egerek mesenterialis arterioláiban az ACh- és bradikinin-kiváltotta endothel-függő dilatáció csökkenését

tapasztalták.⁸² Erdős és mtsai fruktózzal etetett inzulin rezisztens patkányok a.cerebi mediajában csökkent mértékű endothel-dependens vazodilatációt találtak, míg az endothel független, nitroprusszid-nátrium(SNP)-kiváltott dilatáció nem különbözött a kontroll csoporthoz viszonyítva.⁸³ Ugyanakkor Frisbee és mtsai in vivo cremaster izom mikroereiben mind az ACh-, mind pedig a SNP-kiváltotta dilatáció csökkenést figyeltek meg diabeteses patkányokon az egészségesekhez viszonyítva.⁸⁴

A humán és az állatkísérletes ereken végzett vizsgálatok eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a DM-ban mind a nagy erekben, mind pedig a mikroerekben csökken az endothel-dependens agonista és/vagy áramlás kiváltotta dilatáció. A nagy konduktancia ereken végzett vizsgálatokból azonban csak korlátozottan vonhatók le következtetések az endotheliális mechanizmusok sérülésére, mivel ezeken az ereken sem a használt agonista szereknek, sem az áramlásnak nincs érátmérő szabályozó szerepe. Így a legtöbb nagy éren végzett vizsgálat eredményeiből csupán arra lehet következtetni, hogy DM-ban károsodik az endothel funkció. Ugyanakkor a DM-ban a mikroerekben megfigyelt megváltozott endothel működés már közvetlenebb bizonyítékokkal szolgál a szöveti perfúzió kóros elváltozásairól, mivel ezen mikroereknek fontos szerepe van a keringés lokális szabályozásában. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre azonban arra vonatkozóan, hogy hogyan változik meg a mikroerek működése DM-ban, és mi az elváltozások pontos kórétlettani mechanizmusa.

Az előbbieken részletezett vizsgálatokban a csökkent mértékű endothel-függő dilatáció hátterében a legtöbb tanulmányban az endotheliális eredetű NO csökkent biológiai aktivitását, az NO-mediálta dilatációs mechanizmus sérülését feltételezték DM-ban. Számos korábbi tanulmány számolt be arról, hogy diabetes esetén az agonista szerek kiváltotta NO-mediálta dilatáció nem változik az endotheliális NO-szintáz farmakológiai gátlása után, ami közvetett bizonyítékkal szolgál a NO-mediálta folyamatok sérülésére. Továbbá a legtöbb vizsgálatban a direkt NO donor szerek (SNP, nitroglicerín) vazodilatátor hatásában nem

találtak különbséget a kontroll erekhez viszonyítva, ami arra enged következtetni, hogy a vaszkuláris simaizom NO érzékenysége nem változik diabetes mellitusban. A megfigyelt csökkent mértékű NO-mediálta válaszok hátterében ugyanakkor a csökkent NO szintézis, vagy a NO fokozott lebomlása is állhat. A NO-szintáz élettani működéséhez szükséges bizonyos prekursorok és kofaktorok (L-arginin, NADPH, BH₄) nem megfelelő koncentrációban történő jelenléte, hiányuk, vagy csökkent működésük a NO csökkent mértékű szintéziséhez vezethet. Továbbá a NO szabadgyök tulajdonsága révén rendkívül reakcióképes molekula, és ezáltal reakcióba léphet számos más szabadgyök természetű, vagy egyéb vegyülettel, ezáltal a sejten belüli biológiailag hatékony szintje csökkenhet. Ilyen a NO szöveti szintjét befolyásolni képes molekulák a reaktív oxigén szabadgyökök, melyek szerepe előtérbe került a DM-ban megfigyelhető endothel diszfunkció kialakításában.

2.5. Prostaglandin szintézis eltérései 2-es típusú diabetes mellitusban

Ismert, hogy az egyes kardiovaszkuláris megbetegedésekhez krónikus, alacsony szintű szöveti gyulladás társul. Az érfalban megfigyelhető gyulladásos választ nem lehet figyelmen kívül hagyni, ugyanis fontos szerepet tölt be a homeosztázis fenntartásában azáltal, hogy az érfal felépítésében és működésében változásokat indukál, így biztosítva a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodást.⁸⁵ Az utóbbi időben az alacsony szintű szöveti gyulladás, mint a diabeteses érszövődmények kulcsmechanizmusa lépett a vizsgálódások középpontjába.⁸⁶

A ciklooxygenáz (COX) enzimek és az általuk termelt proszttaglandinok jelentősége a krónikus gyulladásban megalapozottnak látszik. Sok egyéb faktor mellett a proszttaglandinok jelentős mediátorai a gyulladásos folyamatoknak, és az is ismert, hogy számos proszttaglandin származék fontos szerepet tölt be a vazoregulációban, ezen belül az arteriolák átmérőjének

szabályozásában.⁸⁷ Újabb vizsgálatok szerint a proszttaglandin metabolizmus megváltozása diabetes mellitusban jelentős mértékben hozzájárul a lokális vazoregulatorikus mechanizmusok felborulásához. Korábban már kimutatták, hogy az 1-es típusú, inzulin-dependens diabetes mellitusban,⁸⁸ és a 2-es típusú, nem inzulin-dependens diabetes mellitusban fennálló ciklooxygenáz- és citokin- (főként interleukin-6) mediált gyulladás jelenléte egyenes arányban áll az ún. glikémiás státusszal, azaz a HbA1c szintjével.⁸⁹

Emlős sejtekben az COX enzim két izoformáját ismerjük. A COX-1 konstitutív módon expresszálódik a legtöbb sejtben, így az endothel sejtekben is, ahol a celluláris homeosztázis fenntartásában – ezen keresztül az értónus szabályozásában – játszik szerepet.⁹⁰ Ezzel szemben a COX-2 izoforma normális körülmények között enyhe mértékben vagy egyáltalán nem kimutatható, de gyulladásos, mitogén és egyéb élettani hatásokra gyorsan felszaporodik.⁹¹

Egy korábbi in vitro tanulmány szerint abban az esetben, amikor mind a COX-1, mind a COX-2 enzim kimutatható, a tényleges prosztaciklin szintézist a COX-2 izotípus végzi.⁹² Feltételezések szerint a krónikus gyulladással járó diabetesben az érfali proszttaglandin szintézis megváltozása a módosult COX-2-expresszióknak tudható be. Ezen állatkísérletekben felvetették, hogy diabetesben mind a nagy-, mind a kiserek szintjén fokozott a COX-2 expressziója, ami befolyásolja az erek vazomotor funkcióit. Azonban 2-DM-ban a COX-2 expressziója, illetve a COX-2 expresszió következtében kialakuló funkcionális mikroér elváltozások teljes mértékben feltáratlanok.

2.6. A levosimendan metabolit OR-1896 hemodinamikai és vazomotor hatásai

A mikrocirkuláció és a következményesen létrejövő szisztémás hemodinamikai és keringésélettani paraméterek diabetes mellitusban megváltoznak, melyek jelentősen

hozzájárulnak a szívérrendszeri morbiditás és mortalitás fokozódásához. Ezért kiemelkedően fontos az olyan terápiás megoldások kifejlesztése, amelyek a diabétes mellitusban kialakuló, a mikroereket érintő vazomotor működészavar helyreállítását tűzik ki célul. A levosimendan egy a szívelégtelenség kezelésében alkalmazott új gyógyszer család, a Ca^{2+} -érzékenyítők csoportjába tartozó szer. Kedvező kardiális hatását a szívizom kontrakcióját szabályozó molekula a troponin C kalcium érzékenységének fokozásával éri el a szisztole alatt, ezáltal pozitív inotróp hatással bír anélkül, hogy befolyásolná a miokardium oxigénfogyasztását és a szívfrekvenciát.⁹³ Mind in vitro,⁹⁴ mind in vivo⁹⁵ kísérletekben felmerült, hogy a levosimendan kedvező hemodinamikai hatásait nem csupán a szívizom kontraktilitási paramétereinek kedvező befolyásolása, hanem a perifériás keringésre gyakorolt hatásai révén éri el. Érdekes megfigyelés, hogy a klinikai gyakorlatban elterjedt intravénás alkalmazása során a levosimendan hatás a szer beadását követően 5 órával alakul ki, és hosszabb ideig, akár napokig is fennállhat. A levosimendan féléletideje azonban igen rövid, csupán 1 óra^{96, 97} és mivel >90%-a albuminhoz kötött a plazmában, ezért csupán kis hányada (~4%) biológiailag hozzáférhető. A levosimendan beadását követően a szervezetben 2 biológiailag aktív metabolittá, az OR-1855-té, és az OR-1896-tá alakul. Az OR-1855 is később OR-1896-tá alakul át,^{98, 99} melynek féléletideje már 75-80 óra, és maximális plazmakoncentrációját 2 nappal a levosimendan beadását követően éri el.^{99, 100} Az OR-1896-nak csupán 40%-a kötődik plazmafehérjékhez, így jóval nagyobb a szabad vegyület aránya. Mivel egyszeri levosimendan adás után a kedvező hemodinamikai hatások 7-9 napig fennállnak feltételezhető, hogy ezek fenntartásában az OR-1896 is fontos szerepet játszhat. Az OR-1896 farmakológiailag aktív vegyületnek bizonyult, számos kísérletben igazolták Ca^{2+} -érzékenyítő, ezáltal pozitív inotróp hatását.^{101, 102}

Kísérletes eredmények szerint a levosimendan különböző mechanizmusokon keresztül vazodilatátor hatással bír mind az artériás, mind a vénás oldalon. Számos munkacsoport

igazolta különböző érterületeken végzett kísérletekben, hogy a levosimendan a K^+ csatornák aktivációjával membrán hiperpolarizációt vált ki, gátolva ezáltal a befelé irányuló Ca^{2+} áramot. A vazodilatáció a csökkent intracelluláris Ca^{2+} koncentráció következtében jön létre.

¹⁰³ Pataricza és mtsai izolált sertés epicardiális koronária ereken mutatta ki, hogy a levosimendan aktiválja a feszültség-függő és nagy konduktanciájú K^+ csatornákat. ¹⁰⁴ Höhn és mtsai az ATP-függő K^+ csatornák és a Ca^{2+} -függő K^+ csatornák szerepét hangsúlyozták humán v.saphenán végzett kísérleteikben. ¹⁰⁵ Yield és mtsai humán a.mammaria internán a levosimendan vazodilatátor hatását az ATP-függő K^+ csatornák aktivációjával, míg az a.umbilicalisban a feszültségfüggő-, és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák aktivációjával magyarázták. ^{106, 107} Szintén az ATP-függő K^+ csatornák aktivációját okozza a levosimendan patkány mesenterialis erekben, és a levosimendan vazodilatátor hatását az endothel eltávolítása nem befolyásolja ezen érterületen. ¹⁰⁸

A levosimendan vazodilatátor hatásáért azonban egyéb mechanizmusok is felelősek lehetnek. Míg a miokardium kontraktilitását a Ca^{2+} érzékenység fokozásával éri el, ⁹³ addig a vaszkuláris simaizomsejtek Ca^{2+} érzékenységét éppen ellenkezőleg befolyásolja, azaz csökkenti azt. ¹⁰⁹ Magasabb koncentráció esetén (~ 1 mM) a foszfodiészteráz enzimet is gátolja, megnö az intracelluláris cAMP koncentráció, és vazodilatáció alakul ki, ¹¹⁰ azonban kérdéses még, hogy ennek az útvonalnak van-e jelentősége a vazodilatáció kialakításában. Mivel feltehetőleg mind a vénás, mind az artériás oldalon vazodilatációt okoz, csökkenti a szív elő- és utóterhelését. A miokardium oxigénigényét csökkenti, és mivel a koronária konduktancia, és rezisztencia erekre vazodilatátor hatással bír, ¹¹¹ anti-iszkémiás tulajdonságú. ¹¹²

A fent említett kísérletek tanulsága szerint a levosimendan elsősorban bizonyos kálium csatornák aktivációját eredményezi, amely folyamat a vaszkuláris simaizomsejtek hiperpolarizációjához és következményes érrelaxációhoz vezet. Ismert, hogy a mikroerek

átmérőjének szabályozásában kiemelkedően fontos egyes kálium csatornák aktivációja és az annak következtében kialakuló, endothel-függő dilatáció. A levosimendan mikroerek vazomotor működésére gyakorolt hatása azonban még nem ismert, továbbá az sem tudott, hogy a levosimendan hosszú féléletidejű metabolitja, az OR-1896 rendelkezik-e vazoaktív tulajdonságokkal és hatását milyen mechanizmusok által fejti ki mikroereken. Ezért kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk mind az anyavegyület, a levosimendan, mind metabolitjának, az OR-1896-nak a mikrovaskuláris érműködésre gyakorolt hatásait, különös tekintettel a kálium csatornák aktivációjának lehetséges szerepére.

3. METODIKÁK

Kísérleteink első részében hím Wistar patkányokat használtunk (Charles River, Magyarország). Kísérleteink második részében 12-14 hetes hím db/db (C57BL/KsJ-db⁻/db⁻), valamint kontroll heterozigóta (C57BL/KsJ-db⁺/db⁻) egereket használtunk (Jackson Laboratories, Ann Arbor, USA). A kísérleti protokollok után valamennyi állaton 150 mg/tskg nembutal intraperitoneális injekció adásával eutanáziát végeztünk.

3.1. A 2-es típusú diabetes állatkísérletes modelljei

A 2-es típusú diabetes mellitus diétával indukált állatmodellje

A 2-es típusú diabetes mellitust hím Wistar patkányokban magas zsírtartalmú diéta (High Fat Diet; HFD; PMI Nutritional International) alkalmazásával idéztük elő. A HFD patkányok (n=20) magas (60%-os) zsírtartalmú tápot kaptak 10 héten keresztül. A kontrollként használt patkányokat (n=20) 10 hétig normál zsírtartalmú táppal etettük. A 10 hétig tartó magas zsírtartalmú diéta hatására a HFD patkányok elhíztak, hiperinzulinémia, és hiperglikémia jelentkezett.

A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai állatmodellje

Kísérleteink második részében a 2-es típusú diabetes mellitus genetikai modelljét használtuk. Az ún. db/db egerekben (C57BL/KsJ-db⁻/db⁻) a 4-es kromoszómán található mutáció meggátolja a leptin receptor expresszióját. A működőképes leptin receptor hiányában a táplálkozási idő megnyúlik a homozigóta (db/db) egerekben, amelyek súlyos mértékben elhízhatnak és hiperglikémiások lesznek. Kontrollként heterozigóta egereket (C57BL/KsJ-

db⁺/db⁻) használtunk, melyek sem morfológiailag, sem élettani működésük tekintetében nem különböznek a normál egerektől.

Mind a diétával előidézett, mind a genetikailag spontán kifejlődött 2-es típusú diabetes mellitus során kialakuló metabolikus eltérések hasonlóak a humán 2-es típusú diabetes mellitusra jellemzőkhöz, azaz elhízás, inzulin rezisztencia/hiperinzulínémia, és hiperglikémia jelentkezik.^{113, 114} A két állatkísérletes modell metabolikus paramétereiben megfigyelt eltéréseket az eredmények fejezetben tárgyaljuk.

3.2. Szisztémás hemodinamikai mérések

Artériás vérnyomásmérés

Arteria carotis katéteres módszer. Az állatokat intraperitoneális nátrium-pentobarbitállal (Nembutal 80 mg/tskg) altattuk el. Ezt követően kipreparáltuk az állatok bal carotis artériáját. Az arteria carotis kanülálását követően nyomás transzducer segítségével (SPR 524, Millar Instruments, Texas, USA) mértük meg az artériás középnyomást.

„Tail-cuff” módszer. A db/db egerek esetében éber állatokban mértük a vérnyomást ún. tail cuff módszer segítségével. Az egerek farkára pneumatikus pulzusérzékelővel felszerelt mandzsetta került, melynek segítségével meghatároztuk az állatok vérnyomását, és szívfrekvenciáját.¹¹⁵

Echocardiográfia

A db/db és kontroll egerek esetében echocardiográfiás vizsgálatokra is sor került Acuson Sequoia 256 15 MHz-es lineáris transzducerrel ellátott készülék segítségével. A vizsgálat során éber állatokon parasternális rövidtengelyi felvételtől a bal kamrai falvastagságot, az end diastoles átmérőt (LVEDD), az end systoles átmérőt (LVESD)

határozták meg. Ezután parasternális hossz tengelyi felvételtől a bal kamrai diastoles area (LVDA), a bal kamrai end sistoles area (LVSA) mérése történt. Az így nyert adatokból meghatározásra került az ejekciós frakció, a perctérfogat, valamint az arteriális középnyomás figyelembe vételével a teljes perifériás ellenállást is kiszámítottuk.¹¹⁶

3.3. Vérkémiai meghatározások/analitikai módszerek

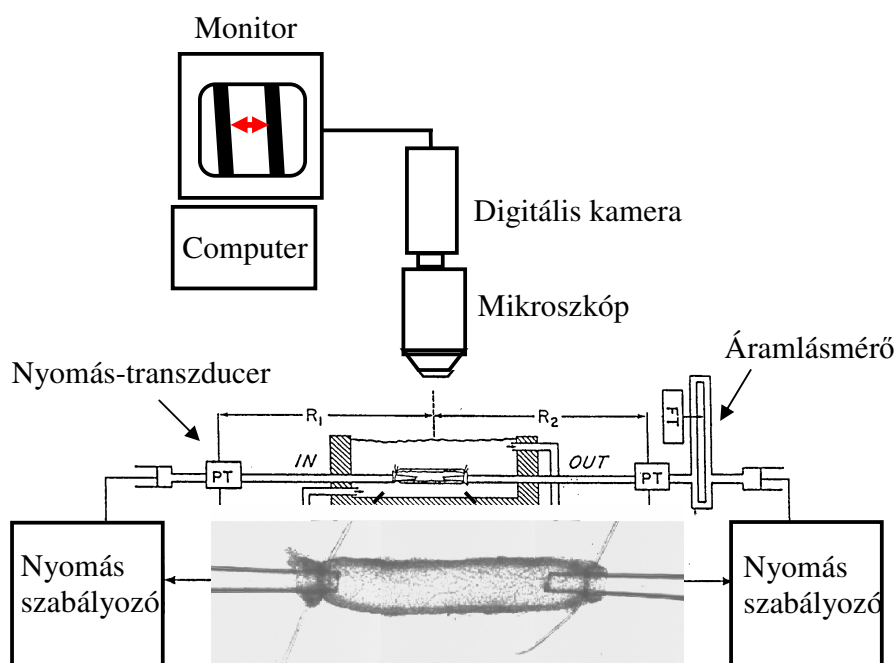
Kísérleteink során az altatott állatok arteria carotisából vért vettünk, melyet 4 °C-on azonnal centrifugáltunk, és a szérumot a különböző kémiai meghatározásokig -80 °C-on tároltuk.¹¹⁵ Az állatok szérumából teljes koleszterin és glükóz meghatározás történt kolorimetriás assay segítségével (Cobas Integra, Roche), illetve inzulinszint mérés radioimmun alapú assay segítségével (BYK Sangtec). Az analitikai méréseket a DE OEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében végezték.

3.4. Izolált mikroértechnika

Izolált mikroér kísérleteinket patkány, valamint egér gracilis vázizomból izolált arteriolákon (patkány: ~160 µm; egér: ~90 µm) végeztük. Nembutállal altatott állatokból steril körülmények között eltávolítottuk a musculus gracilis vázizmot és egy hideg (0-4°C, pH 7.4) Krebs oldatot tartalmazó szilikonalapú Petri-csészében tűkkel rögzítettük. Egérben az elsőrendű gracilis arteriolát, patkányban a gracilis arteriola másodrendű ágának 2-3 mm-es szakaszát izoláltuk, majd egy hideg oxigenizált Krebs oldatot tartalmazó szervedénybe helyeztük. Az arteriolát sztereomikroszkóp (Nikon) segítségével, mikrosebészeti eszközöket használva először egyik oldalán megkanuláltuk, rögzítettük, majd 20 Hgmm-es perfúziós nyomással a lumenből a vérsejteket eltávolítottuk. Ezután az ér disztális végét is

megkanuláltak, és egy mikroszavar segítségével beállítottuk az eredeti érhosszt, majd egy állandó hőmérsékletű ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.4$) oxigenizált szervfürdőbe helyeztük. A szervkamrát folyamatosan oxigenizált (O_2 : 10%, CO_2 : 5%, N_2 : 85%) Krebs oldattal áramoltattuk át (40 ml/min). Az intraluminális nyomást hidrosztatikus rezervoárok segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és ~60 percig azon tartottuk, amíg az ér állapota stabilizálódott. A belső érátmérő változását egy videomikroszkóphoz (Nikon, Eclipse 80i) rögzített kamerával (CFW 1310, Scion Corp) detektáltuk és számítógépes program segítségével mértük (Image J Software).

(3. ábra)



3. ábra. A videomikroszkópos rendszer vázlatos rajza

3.5. Kísérleti protokollok izolált mikroerekben

Arterioláris dilatáció vizsgálata vazoaktív szerekkel patkány izolált vázizom ereken

A kísérletekben az izolált vázizom arteriolák dilatációs válaszait ismert hatásmechanizmusú receptor-mediálta vagy receptor független vazoaktív farmakonokkal teszteltük. Az izolált arteriolákban az endothel-függő dilatációt acetilkolin (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) és hisztamin (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) alkalmazásával vizsgáltuk. Az endotheltől függetlenül, a vaszkuláris simaizomra ható direkt NO donorként a nitroprusszid-nátrium (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) dózisfüggő hatásait figyeltük meg. Az egyes kumulatív dózis-hatás görbéket kimosási periódus követte, ezután 10 percet vártunk. Ezidő alatt az arteriolák visszanyerték kiindulási tónusukat. A patkányból izolált vázizom arteriolákat 30 percig NO-szintáz gátló N^G -nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME, 2×10^{-4} mol/L) jelenlétében inkubáltuk, majd ismételten megfigyeltük az acetilkolin, hisztamin, és a SNP növekvő dózisainak hatására átmérőváltozásait. Kísérleteink másik részében a feltételezetten jelenlevő szuperoxid anion eliminálása céljából szabadgyökfogó tulajdonságú Tiron (10^{-6} mol/L) jelenlétében 30 percen keresztül inkubáltuk a patkány vázizom arteriolákat, majd ismételten megmértük az agonista szerekre kialakuló átmérőváltozásokat. Más protokollokban az arteriolákat a specifikus NAD(P)H-oxidáz inhibitor apocynin (10^{-5} mol/L), vagy a specifikus xantin-oxidáz inhibitor allopurinol (10^{-4} mol/L) jelenlétében is inkubáltuk, ezután ismételten megmértük az agonista szerek növekvő dózisainak hatására kialakuló átmérőváltozásokat.

A nyomás indukálta arterioláris miogén tónus vizsgálata db/db egerekben

Kísérleteinkben vizsgáltuk az egerből izolált gracilis arteriolák spontán kifejlődő tónusának mértékét. Ennek során 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, majd az így kialakuló érátmérőt megmértük. Az arteriolák adott nyomásértékre jellemző átmérőjét egyaránt vizsgáltuk kalcium tartalmú (aktív átmérő, aktív diameter, AD) és kalcium-mentes (passzív átmérő, passzív diameter, PD) Krebs oldatban. Ezután az arteriolákat 200 U/ml katalázzal inkubáltuk 30 percig, majd ismét mértük az egyes nyomásértékeken kialakuló érátmérőket. A kalcium tartalmú Krebs oldatban meghatározott normalizált arterioláris átmérőt az adott nyomásértéken mért aktív és passzív átmérő hányadosaként határoztuk meg. A normalizált arterioláris átmérőt $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ receptor antagonistá SQ-29548 (10^{-6} mol/L), szelektív COX-1 inhibitor SC-560 (10^{-6} mol/L), valamint szelektív COX-2 inhibitor NS-398 (10^{-5} mol/L) jelenlétében is meghatároztuk.

A hidrogén-peroxid vazoaktív hatásának vizsgálata

A db/db és kontroll egerekből izolált gracilis arteriolák esetében a H_2O_2 érátmérőre gyakorolt hatását a H_2O_2 növekvő dózisainak (10^{-7} - 10^{-4} mol/L) hatására kialakuló érátmérő változások mérésével vizsgáltuk. A H_2O_2 hatására kialakuló érátmérő változásokat a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ receptor antagonistá SQ-29548 (10^{-6} mol/L) jelenlétében is meghatároztuk. További kísérleteinkben a tromboxán receptor agonista U-46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} mol/L) érátmérőre gyakorolt hatását mértük a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ receptor antagonistá SQ-29548 (10^{-6} mol/L) jelenlétében, illetve hiányában.

Endothel eltávolítása

Az endothel eltávolítását intraluminálisan 20 Hgmm nyomással egy percen keresztül átáramoltatott levegőbuborékkal értük el. Az endothelfosztás eredményességét az endotheltől függő vazodilatátor ACh (10^{-7} mol/L) és az endotheltől független NO donor SNP (10^{-7} mol/L) alkalmazásával ellenőriztük. Endothel eltávolítás előtt mindkét szer hatására az arteriolák

dilatációja volt megfigyelhető, mely dilatáció endothel eltávolítás után csak a SNP-re alakult ki, az endothel dependens vazodilatátor ACh-ra nem volt megfigyelhető. Endothel eltávolítást követően vizsgáltuk a db/db és kontroll egerekből izolált gracilis arteriolákban a H_2O_2 növekvő dózisainak hatására kialakuló átmérőváltozásokat.

A levosimendan és OR-1896 vazoaktív hatásainak vizsgálata

Kísérleteinkben a levosimendan (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) és OR-1896 (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) növekvő dózisa hatására kialakuló érátérőváltozásokat mértük patkányból izolált gracilis mikroerekben. A K^+ csatornák szerepének tisztázására az OR-1896 hatására kialakuló érátérőváltozásokat a nem specifikus K^+ csatorna blokkoló, a tetraetilammónium (TEA, 10^{-3} mol/L koncentráció 30 percig) jelenlétében is vizsgáltuk. A vizsgált érterületen az ATP függő K^+ csatornák jelenlétét a csatorna nyitószere a pinacidil (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) növekvő koncentrációinak hatására kialakuló dilatáció mérésével tanulmányoztuk. A csatorna szelektív gátlószerét, a glibenclamidot (GLI) 3 különböző koncentrációban (10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} mol/L 30 percig) használva meghatároztuk az effektív gátló koncentrációt. Ezután az ATP függő K^+ csatornák szerepét az OR-1896 kiváltotta vazodilatációban a rá jellemző, effektív glibenclamid koncentráció jelenlétében vizsgáltuk (5×10^{-6} mol/L). Kísérleteink utolsó szakaszában a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák szerepét tanulmányoztuk. Az arteriolákat a csatorna szelektív gátlószerével, az iberiotoxinnal (IBTX, 10^{-7} mol/L 10 percig) inkubáltuk, és ismételten mértük az OR-1896 hatására kialakuló érátérő változásokat. Végül a feszültségfüggő K^+ csatornák szerepének tisztázása céljából az arteriolákat a csatorna szelektív gátlószerével, az 4-aminopirdinnel (4-AP, 3×10^{-3} mol/L 10 percig) inkubáltuk, majd mértük az OR-1896 hatására kialakuló érátérő változásokat.

3.6. *Reaktív oxigén szabadgyök származékok kimutatása*

Szuperoxid anion kimutatása lucigenin chemilumineszcencia segítségével.

A kontroll és HFD patkányokból izolált carotis erekben az érfalban termelődött szuperoxid mennyiségét lucigenin chemilumineszcencia segítségével vizsgáltuk Mozzahab és mtsai módosított protokollja szerint.⁶⁴ Az a.carotis egy darabját eltávolítottuk, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, és 37°C hőmérsékletű PSS-ben inkubáltuk 60 percen keresztül. Az artériákat ezután szcintillációs csövekbe helyeztük, amelyek HEPES-pufferelt (10^{-2} mol/L, pH 7.4) PSS-t és lucigenint (10^{-5} mol/L; Sigma) tartalmaztak. A chemilumineszcenciát folyadék szcintszámláló (Tri-Crab 2800TR; Perkin-Elmer) segítségével mértük, a háttérre korrigáltunk, és a beütésszámot egységnyi tömegre számítva adtuk meg. A beütésszámot allopurinol (10^{-4} mol/L 30 percig) vagy apocynin (10^{-4} mol/L 30 percig) hozzáadása után, valamint Tironnal (10^{-6} mol/L) történő inkubációt követően szintén meghatároztuk. Kísérleteink következő részében miután az alap beütésszámot meghatároztuk, a stimulált szuperoxidtermelést 10^{-4} mol/L NADH-val vagy 10^{-4} mol/L xantinnal történő 30 perces inkubációt követően határoztuk meg. Ennek segítségével a NAD(P)H-oxidáz, és a xantin-oxidáz által termelt szuperoxid mennyiségét becsültük.⁶⁴

Hidrogén peroxid kimutatása DCHF fluoreszcencia segítségével

A db/db és kontroll egerekben az érfalban termelődő H_2O_2 mennyiségét dichlorodihydroflorescein (DCHF) segítségével határoztuk meg.⁵⁷ A carotis artériákat (kontroll: n=4, db/db: n=4) eltávolítottuk, és mikroszkóp alatt megtisztítottuk a környező kötőszövetes elemektől. Ezután fénytől védett kamrában az érdarabokat 5×10^{-6} mol/L dichlorodihydrofloresceinnel (DCHF) inkubáltuk 37 °C-on 30 percig 200 U/ml kataláz jelenlétében vagy hiányában. Az ereket ezután Krebs oldatban mostuk. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során a DCHF-t 488 nm-en gerjesztettük. Az ereket ugyanazon

mikroszkóp-beállítás mellett, párosával vizsgáltuk. A felvételeken a fluoreszcencia intenzitást az erek proximális, középső, és disztális részén mértük, és a két csoportból származó erek átlag intenzitását hasonlítottuk össze.

3.7. Immunhisztokémia

A kontroll és HFD patkányokból származó musculus gracilis darabokat fagyasztó médiumban (Thermoshandon, Cryomatrix) beágyaztuk. A 10 µm-es konszekutív metszeteket acetonos fixálás után monoklonális xantin-oxidáz ellenes antitesttel (1:50 hígítás, LabVision) jelöltük. Az immunjelölést avidin-biotin torna peroxidáz rendszerrel (Vectastatin Kit, Vector Laboratories) tettünk láthatóvá, diaminobenzidin tetrahidrokloridos festéssel. A nem-specifikus kötődést az elsődleges antitest elhagyásával vizsgáltuk. A metszetekről Nikon Eclipse 80 mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával (CFW-1310C, Scion) készítettünk felvételeket.

3.8. Western immunoblot

A kontroll és db/db egerekből származó aortákat eltávolítottuk, a környező kötőszövettől megtisztítottuk, majd az aortadarabokat 100 µl mintapufferben (Sigma Inc.) homogenizáltuk. A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen 125 V feszültségen 1 óra alatt szeparáltuk, majd polyvinil membránra transzferáltuk. A COX-1 és COX-2 ellenes elsődleges antitesteket (Cayman Chemicals) 1:500 hígításban használtuk. A jeleket chemilumineszcencia segítségével autoradiográfiás módszerrel vizualizáltuk. Loading controlként β-aktin ellenes antitestet használtunk. Az optikai denzitást Image J szoftver segítségével mértük.

3.9. Statisztika

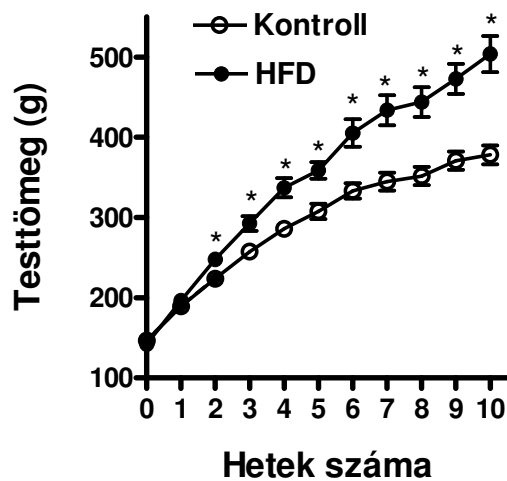
A vazoaktív szerek hatására kialakuló átmérőváltozásokat abszolút értékekben, illetve a Ca^{2+} mentes oldatban megfigyelt passzív átmérő százalékában fejeztük ki. A normalizált érátmérőt az adott nyomásértéken mért aktív és passzív érátmérő arányaként határoztuk meg. Az arteriolák miogén tónusát az ugyanazon a nyomáson mért aktív (Ca^{2+} tartalmú Krebs oldatban mért) átmérő Ca^{2+} mentes oldatban mért passzív átmérőjének százalékában adtuk meg. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei $\pm$ S.E.M szerepelnek. A statisztikai analízishez egy utas ANOVA-t használtunk, amit Tukey post hoc teszttel vagy Student's t-teszttel egészítettünk ki a protokolloknak megfelelően. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A 2-es típusú diabetes mellitus diétával indukált modellje

Metabolikus és egyéb mért paraméterek

A magas zsírtartalmú táppal etetett (HFD) patkányok testtömege már 2 hét elteltével szignifikánsan magasabb volt a kontrollokéhoz viszonyítva, a testsúlykülönbség a 10. hétig tovább fokozódott. (4. ábra)



4.ábra. Kontroll (n=20) és magas zsírtartalmú táppal (n=20) etetett patkányok testtömege az eltelt hetek függvényében.

A számított kalóriabevitel nem különbözött a két csoportban (kontroll: 623 cal/állat/hét; HFD: 613 cal/állat/hét). A HFD állatok inguinalis és retroperitonealis zsírpárnáinak tömege szignifikánsan nagyobb volt a kontrollokéhoz viszonyítva. A szérum inzulin, glükóz és összkoleszterin szintjük is szignifikáns emelkedést mutatott. Az altatott körülmények között, carotis kanüláció segítségével mért artériás középnyomás érték kismértékben, de szignifikánsan magasabb volt a HFD állatokban a kontroll diétán tartott állatokhoz viszonyítva. (2. táblázat)

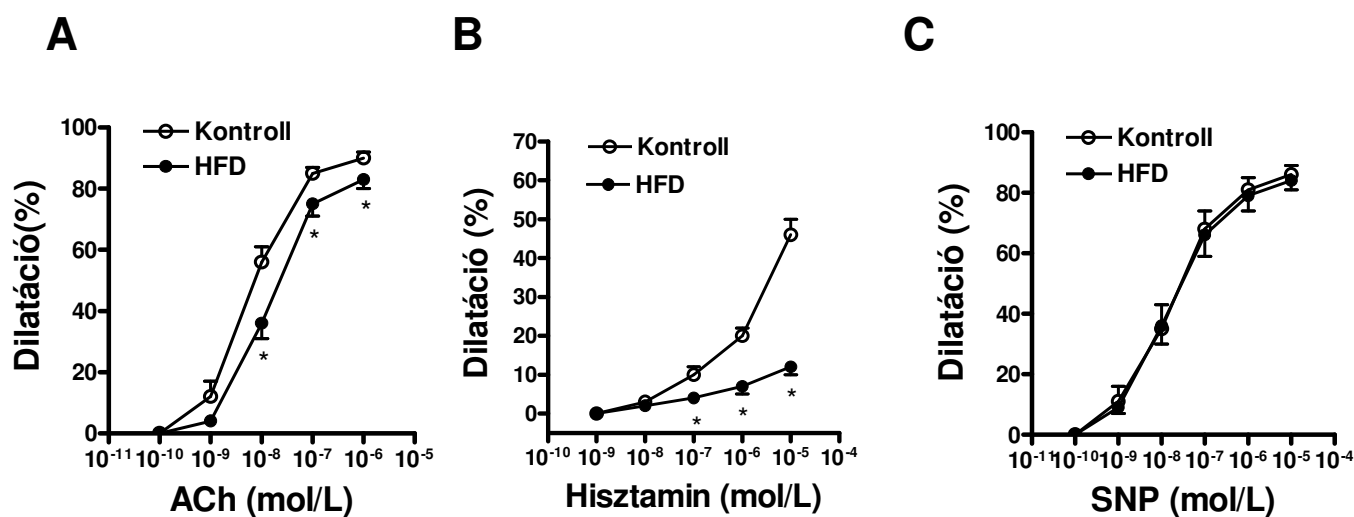
	Kontroll	HFD
Testtömeg (g)	378±12	504±23*
Retroperitoneális zsír tömeg (g)	4,8±0,5	22,7±2,6*
Szérum glükóz (mmol/L)	7,0±0,2	9,9±0,9*
Szérum inzulin (pmol/L)	96±9	244±15*
Szérum koleszterin (mmol/L)	1,10±0,09	1,72±0,09*

2. táblázat. A HFD hatása a patkányok zsírszövetének mennyiségére, élettani paramétereire, és artériás középnyomás értékére. A * a szignifikáns különbséget jelöli.

A vázizom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata

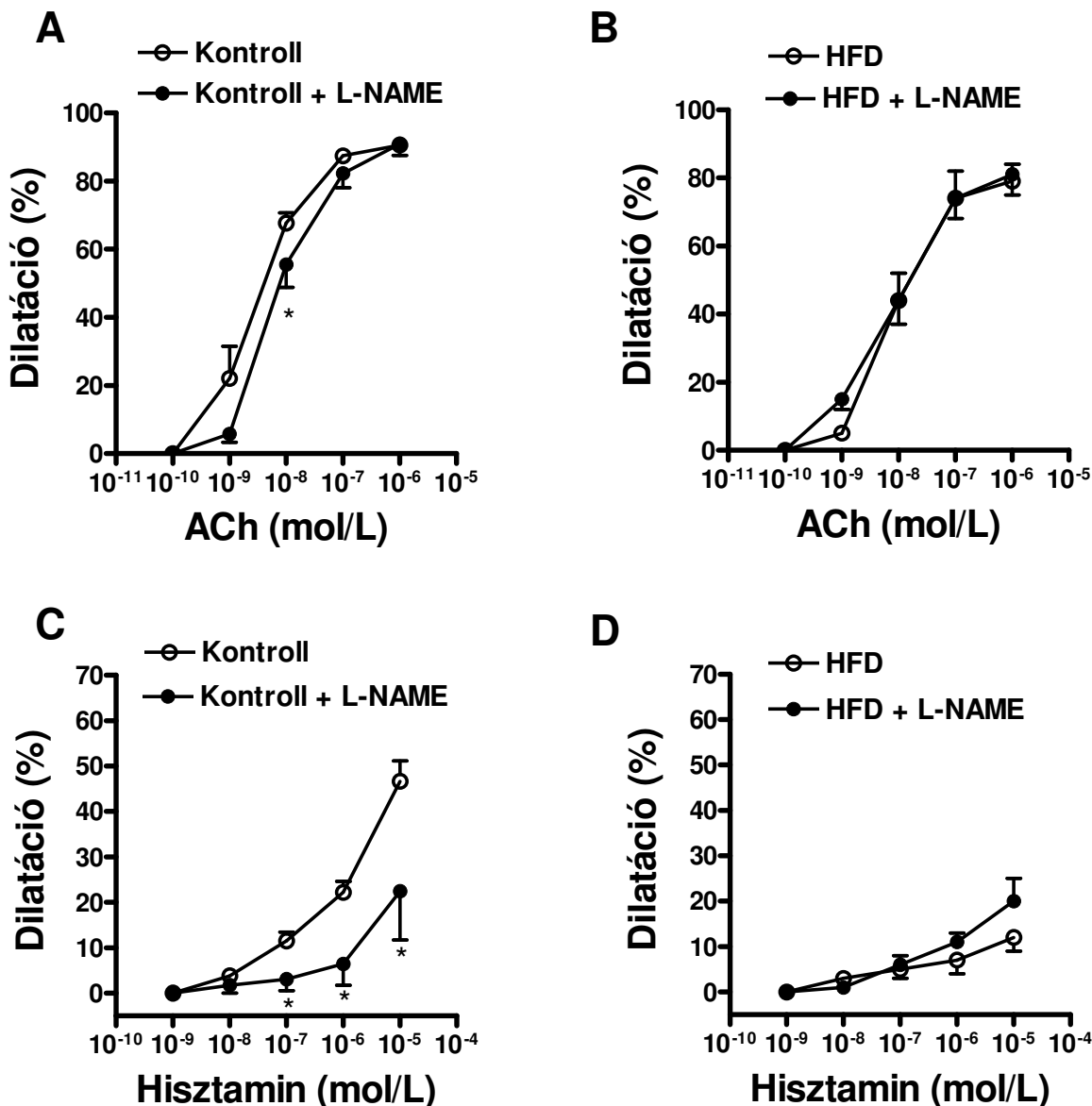
A HFD állatok izolált gracilis arterioláinak sem a Ca^{2+} -mentes közegben mért passzív (kontroll: $233 \pm 9 \mu\text{m}$, HFD: $242 \pm 10 \mu\text{m}$), sem a Ca^{2+} -ot tartalmazó Krebs oldatban mért aktív érátmérője (kontroll: $158 \pm 9 \mu\text{m}$, HFD: $177 \pm 10 \mu\text{m}$) nem különbözött a kontrollokéhoz viszonyítva.

A HFD arteriolákban az endothel-függő vazodilatátor acetilkolin (5. ábra A panel), valamint a hisztamin (5. ábra B panel) növekvő dózisainak hatására kialakuló vazodilatáció szignifikánsan csökkent a kontrollokéhoz viszonyítva, míg az endothel-független vazodilatátor, az SNP hatására kialakuló vazodilatáció nem különbözött a két csoportban. (5. ábra C panel)



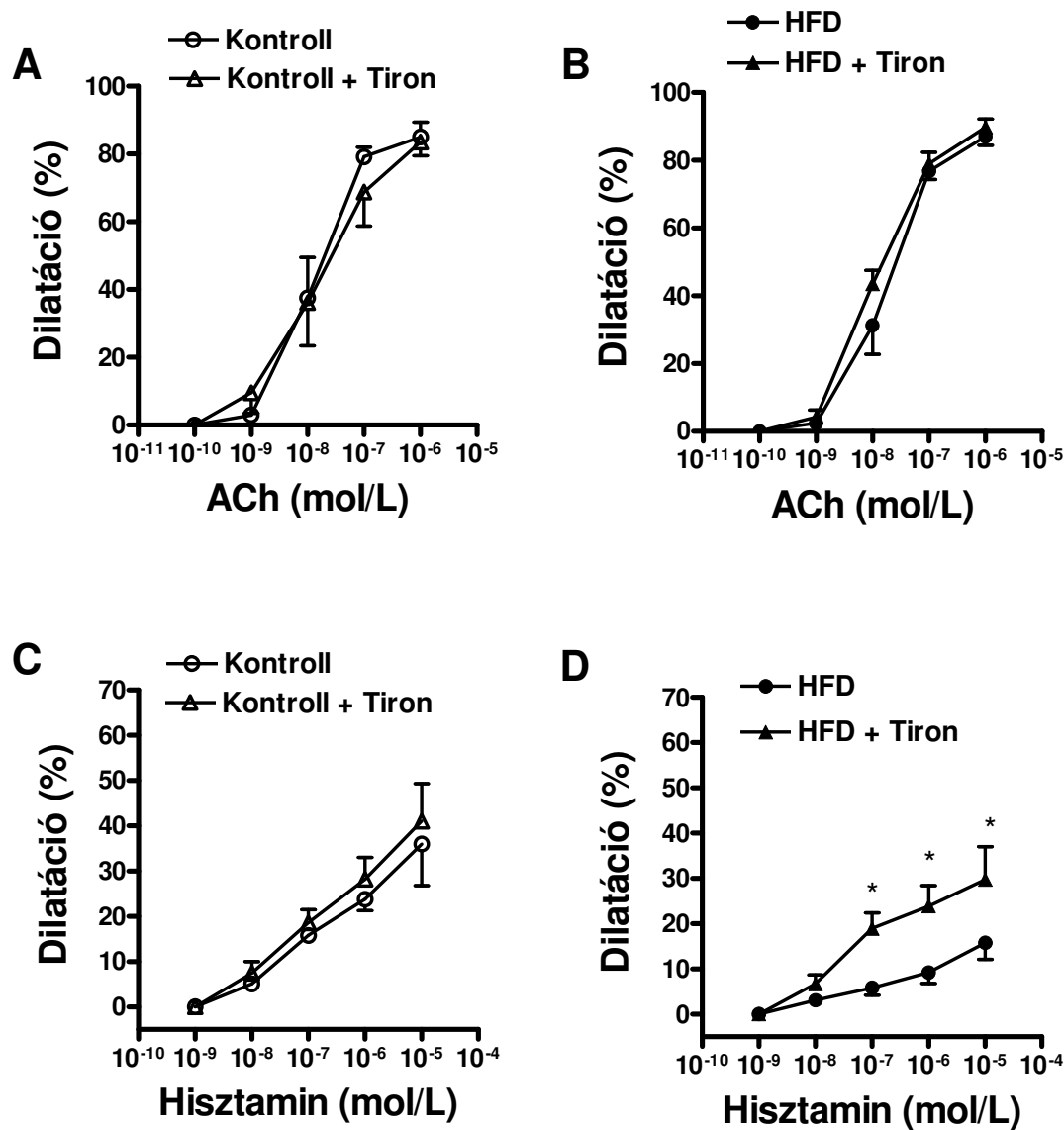
5. ábra. Kontroll ($n=18$) és HFD ($n=18$) patkányokból izolált arteriolák acetilkolin (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) (A panel) hisztamin (10^{-8} - 10^{-5} mol/L) (B panel) és SNP (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) (C panel) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai.

A kontroll állatokból izolált arteriolákban a NO-szintáz gátló, az L-NAME jelenlétében csökkent az acetilkolin és a hisztamin-kiváltotta vazodilatáció (6. ábra A és C panel), míg a HFD arteriolák érválaszt az L-NAME inkubáció nem befolyásolta. (6. ábra B és D panel)



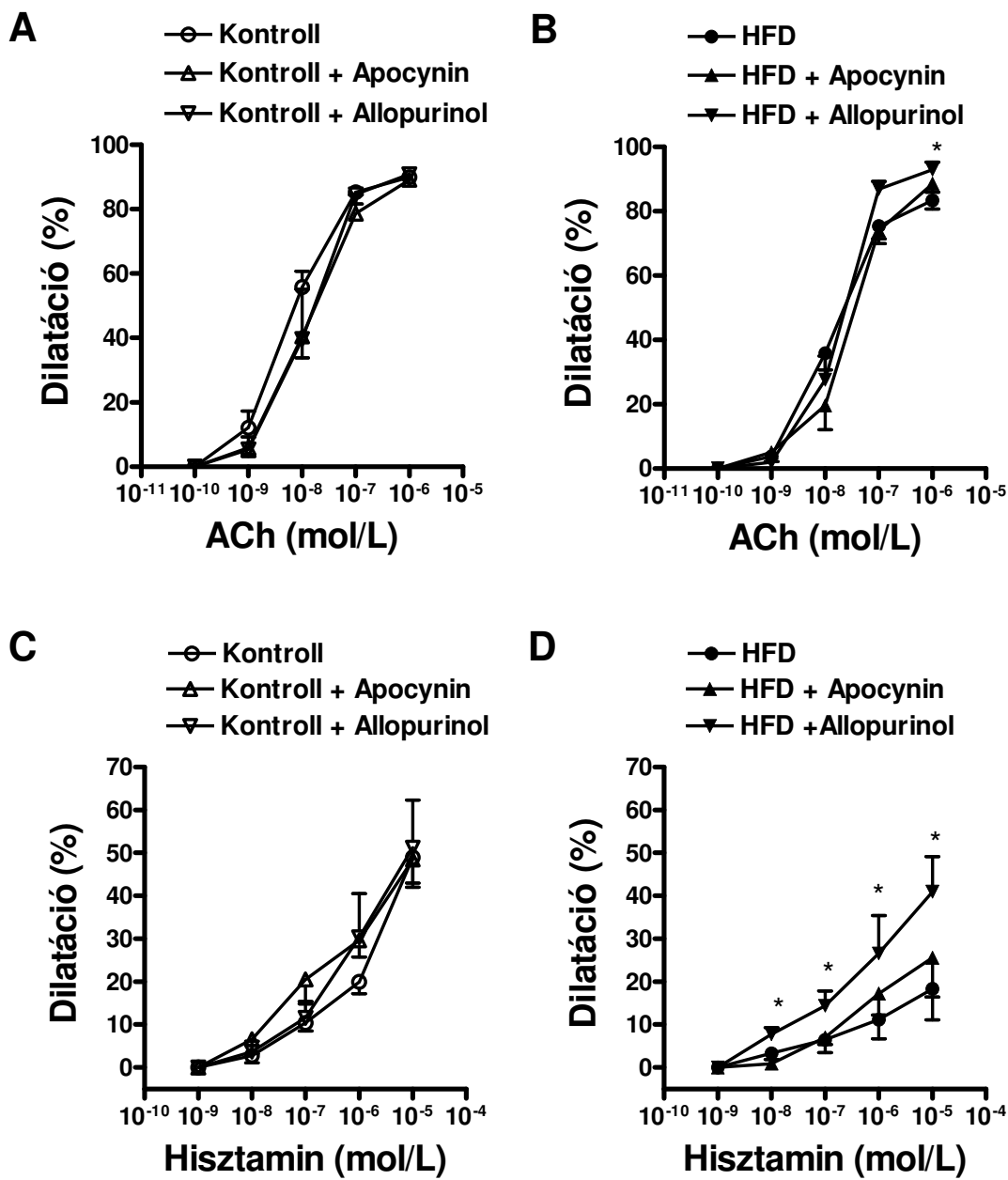
6. ábra. Kontroll (n=18) (A és C panel) és HFD (n=18) (B és D panel) patkányokból izolált arteriolák acetilkolin (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) hisztamin (10^{-8} - 10^{-5} mol/L) növekvő dózisainak hatására kialakuló érválaszai a NO-szintáz gátlószere, az L-NAME-mel történő inkubáció előtt, és után.

A szabadgyökfogó tulajdonságú Tiron extraluminális hozzáadása után a hisztamin indukált vazodilatáció fokozódott a HFD gracilis erekben (7. ábra D panel), míg a Tiron nem befolyásolta az acetilkolin-kiváltotta vazodilatáció mértékét (7. ábra B panel), valamint a kontroll erek acetilkolin és hisztamin választ. (7. ábra A és C panel)



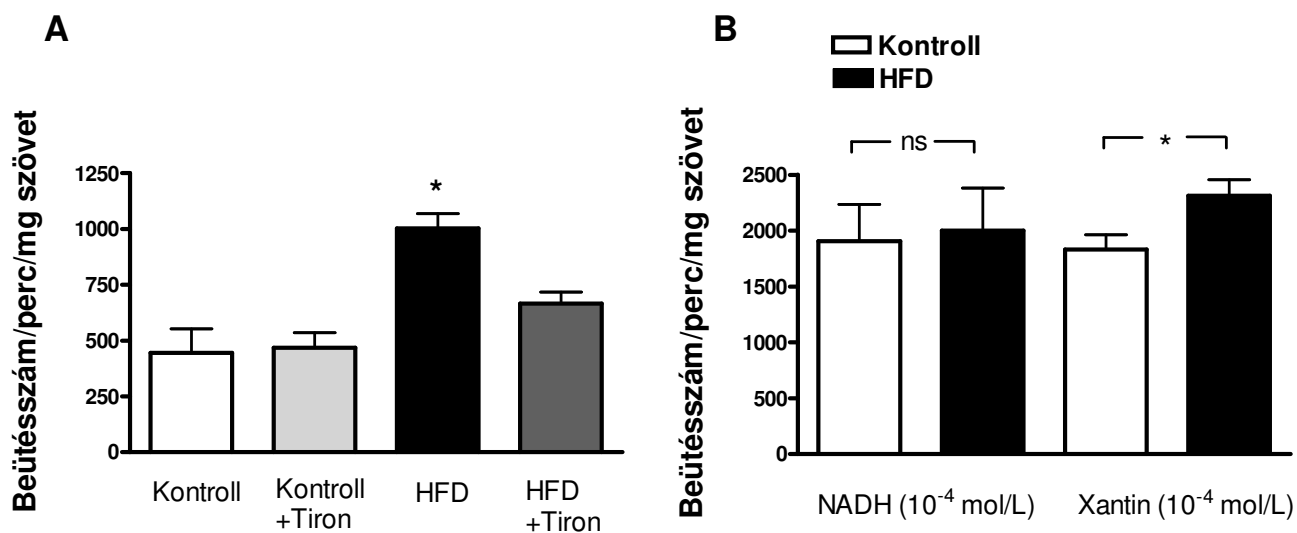
7.ábra. Az acetilkolin (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) és hisztamin (10^{-8} - 10^{-5} mol/L) növekvő dózisainak hatására kialakuló vazodilatáció a szabadgyökfogó hatású Tironnal történő inkubáció előtt és után kontroll (n=5) (A és C panel) és HFD ereken (n=5) (B és D panel)

Az acetilkolin és hisztamin-indukált vazodilatációt a NAD(P)H-oxidáz gátlószere, az apocynin, valamint a xantin-oxidáz gátlószere, az allopurinol jelenlétében is vizsgáltuk. A kontroll állatokból izolált arteriolákban sem az apocynin, sem az allopurinol nem befolyásolta sem az acetilkolin (8. ábra A panel), sem a hisztamin-kiváltotta vazodilatáció mértékét. (8. ábra C panel) Azonban a HFD állatok izolált mikorereiben az allopurinol jelenlétében a hisztamin növekvő dózisainak hatására kialakuló vazodilatáció fokozódott, míg az apocynin nem befolyásolta ugyanezen érválaszokat (8. ábra D panel). Az acetilkolin által kiváltott dilatáció mértékére sem az allopurinol, sem az apocynin nem volt szignifikáns hatással (8. ábra B panel).



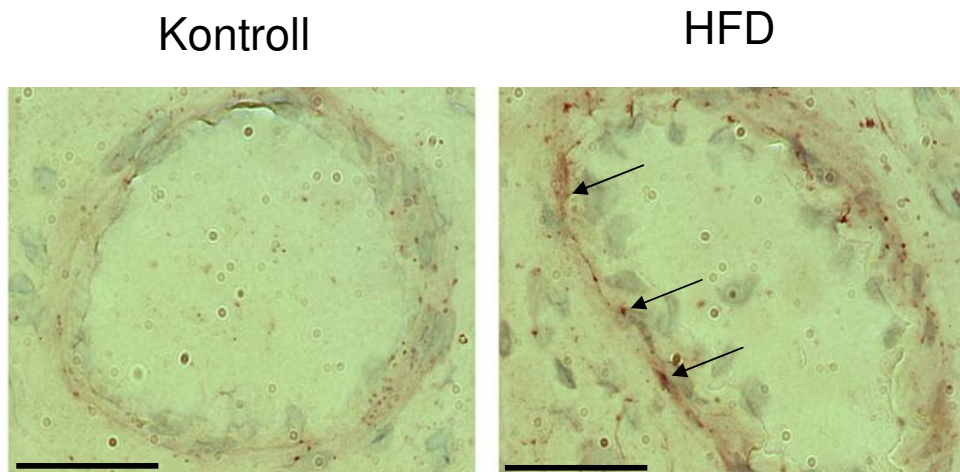
8.ábra. Az acetilkolin (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) és hisztamin növekvő dózisainak (10^{-8} - 10^{-5} mol/L) hatására kialakuló vazodilatáció a szabadgyökfogó hatású Tironnal történő inkubáció előtt és után kontroll (n=5) (A és C panel) és HFD ereken (n=5) (B és D panel).

Az érfali szabadgyöktermelést lucigenin chemiluminszcencia segítségével mértük carotis erekben. A HFD állatok carotis ereiben a szuperoxid mennyisége szignifikánsan magasabb volt, majd a szabadgyökfogó Tiron hozzáadása után a kontroll erekhez hasonló szintre csökkent. (9. ábra A panel) A NAD(P)H-oxidáz, és a xantin-oxidáz által termelt szuperoxid mennyiségét az enzimek szubsztrátjainak hozzáadásával vizsgáltuk. NADH jelenlétében nem volt különbség a két csoport között, míg xantin jelenlétében a HFD carotis erekben szignifikánsan több szuperoxid termelődött. (9. ábra B panel)



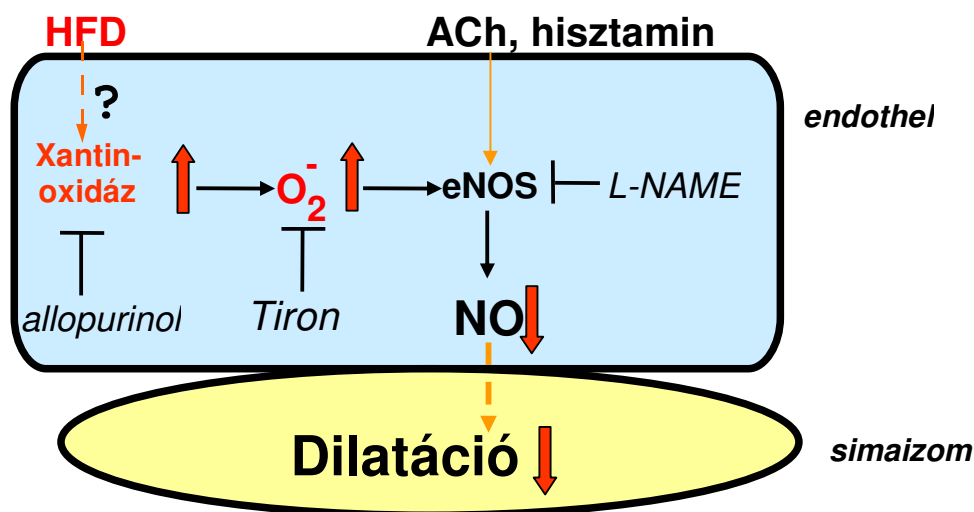
9.ábra. Lucigenin chemilumineszcenciával detektálható szuperoxid mennyisége a kontroll ($n=18$) és HFD ($n=18$) carotis erekben szabadgyökfogó Tiron hozzáadása előtt és után. (A panel) Lucigenin chemilumineszcenciával detektálható szuperoxid mennyisége NADH (10^{-4} mol/L) illetve xantin (10^{-4} mol/L) hozzáadása után kontroll ($n=4$) és HFD ($n=4$) carotis erekben. (B panel)

Immunhisztokémia segítségével a HFD állatokból származó gracilis erekben a subendotheliális rétegben fokozott mértékű xantin-oxidáz festődés volt kimutatható. (10. ábra)



10. ábra. Xantin-oxidáz immunfestés kontroll (n=4) és HFD (n=4) gracilis erekben.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a HFD-val etetett patkányokban fokozódik a xantin-oxidáz eredetű szuperoxid termelés, amely a NO-dal elreagálva csökkenti annak biológiai hozzáférhetőségét, így csökken a NO-mediált vazodilatáció mértéke a vázizom arteriolákban. Feltételezzük, hogy ezen elváltozásoknak szerepe van a mikrovaszkuláris diszfunkció és hipertónia kialakulásában HFD hatására kialakuló 2-es típusú diabetesben. (11. ábra)



11. ábra. A magas zsírtartalmú diéta hatására kialakuló endothel diszfunkció feltételezett mechanizmusa.

4.2. A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai modellje

Metabolikus és szisztémás hemodinamikai paraméterek

Kísérleteink következő részében a kettes típusú diabetes mellitus genetikai állatmodelljében vizsgáltuk részleteiben a mikroerek vazomotor működését. Továbbá arra is kerestük a választ, hogy a 2-DM ezen állatmodellen leírt előrehaladottabb formájában a feltételezetten jelenlévő mikrovaszkuláris működészavarral párhuzamosan milyen szisztémás hemodinamikai elváltozások jelentkeznek. Munkacsoportunk a korábbiakban már ismertette, hogy 12 hetes életkorban a db/db egerek testtömege, szérum glükóz, és inzulinszintje szignifikánsan magasabb a kontrollokénál. (3. táblázat) ¹¹³

	Kontroll(n=18)	db/db(n=18)
Testtömeg (g)	31,8±0,7	49,2±1,19*
Vércukor (mmol/L)	5,8±0,6	22,9±1,3*
Szérum inzulin (pmol/L)	173±38	2673±315*

3. táblázat. DM hatása az egerek élettani paramétereire. A * a szignifikáns különbséget jelöli ($p<0.05$). ¹¹³

Jelen kísérleteinkben elsőként kimutattuk, hogy az éber állapotban mért szisztolés és artériás középnyomás értékek szignifikánsan magasabbak voltak a db/db egerekben a kontroll állatokhoz viszonyítva. Az artériás középnyomás értékből, valamint az echocardiografiás mérések során kapott perctérfogat adatokból számított perifériás vaszkuláris rezisztencia szintén emelkedett volt a db/db egerekben. (4. táblázat)

	Kontroll(n=15)	db/db (n=15)
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	134±4	146±5*
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	81±6	87±2
Artériás középnyomás (Hgmm)	98±5	106±2*
Szívfrekvencia (ütés/perc)	532±7	563±13
Perctérfogat (ml/perc)	6,6±0,4	5,1±1,1*
Teljes perifériás ellenállás (Hgmm·ml ⁻¹ ·perc ⁻¹)	15±1	25±6*

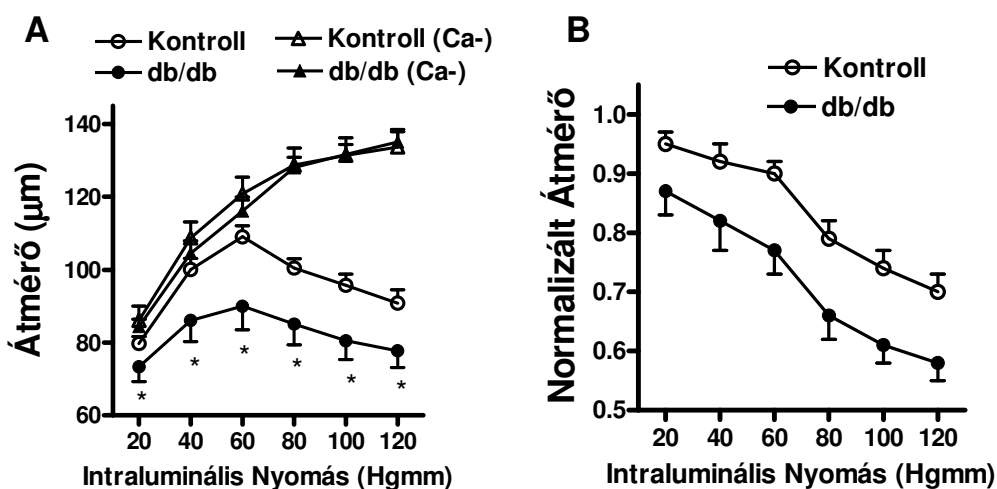
4. táblázat. DM hatása az egerek hemodinamikai paramétereire. A * a szignifikáns különbséget jelöli ($p<0.05$).

A vázizom arteriolák vazomotor működésének vizsgálata db/db egerekben

Kísérleteink során a preparálást követő egy órás inkubációs idő alatt az izolált gracilis arterioláknak spontán miogén tónusa fejlődött ki anélkül, hogy bármilyen vazoaktív anyagot használtunk volna. A db/db egerkből izolált vázizom arteriolák kalcium-mentes közegben kialakult passzív érátmérője nem különbözött a kontrollokhoz viszonyítva (kontroll: 129 ± 4 μm , db/db: 128 ± 3 μm), azonban a kalciumot tartalmazó Krebs oldatban kialakuló aktív érátmérő szignifikánsan kisebbnek bizonyult (kontroll: 101 ± 3 μm , db/db: 85 ± 5 μm).

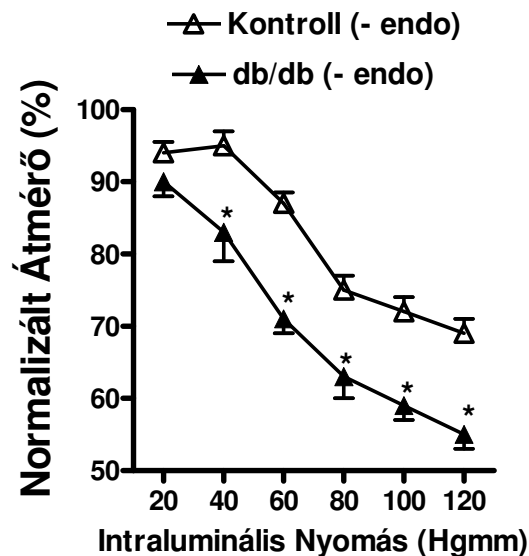
Az intraluminális nyomás 20 Hgmm-ről 120 Hgmm-re történő lépcsőzetes emelése hatására kalcium tartalmú közegben az arteriolák egyre nagyobb mértékű konstriktóját figyeltük meg, összhangban a korábban leírt irodalmi megfigyelésekkel, miszerint az arteriolákra a nagyobb nyomásértéken nagyobb spontán miogén tónus jellemző. A miogén tónus vizsgálatokor azt találtuk, hogy a db/db egerkből izolált gracilis arteriolákban minden nyomásértéken fokozottabb konstriktó alakult ki, mint a kontroll egerkből izolált erekben,

azaz a db/db egerek vázizom ereiben nagyobb miogén tónus volt jellemző. Az egyes nyomásértékeknél kalcium mentes közegben mért passzív érátmérőkben nem volt különbség a két csoport között. (12. ábra A panel) A normalizált arterioláris átmérő az adott nyomásértéken kalcium tartalmú Krebs oldatban meghatározott aktív és a kalcium mentes Krebs oldatban (Ca-) mért passzív átmérő hányadosaként számítható, a spontán miogén tónus mértékét jelző paraméter. A db/db egerek izolált vázizom arterioláiban a normalizált érátmérő minden egyes nyomásértéknél kisebb volt, azaz a db/db gracilis arteriolák spontán miogén tónusa fokozott volt a kontrollhoz viszonyítva. (12. ábra B panel)



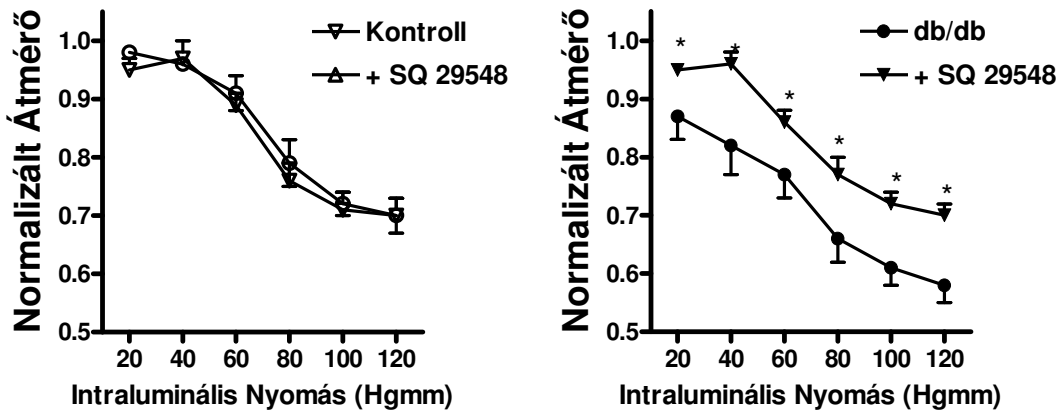
12.ábra. Kontroll ($n=15$) és DM ($n=15$) egerekből izolált arteriolák érátmérői az intraluminális nyomás függvényében. (A panel) Kontroll ($n=15$) és DM ($n=15$) egerekből izolált arteriolák normalizált átmérői az intraluminális nyomás függvényében. (B panel)

Az endothel eltávolítása (endo-) egyik csoportban sem befolyásolta a nyomás-átmérő görbéket, azt suggalva, hogy elsősorban simaizom eredetű folyamatok játszanak szerepet a db/db egerek mikroereire jellemző fokozott miogén tónus kialakításában. (13. ábra)



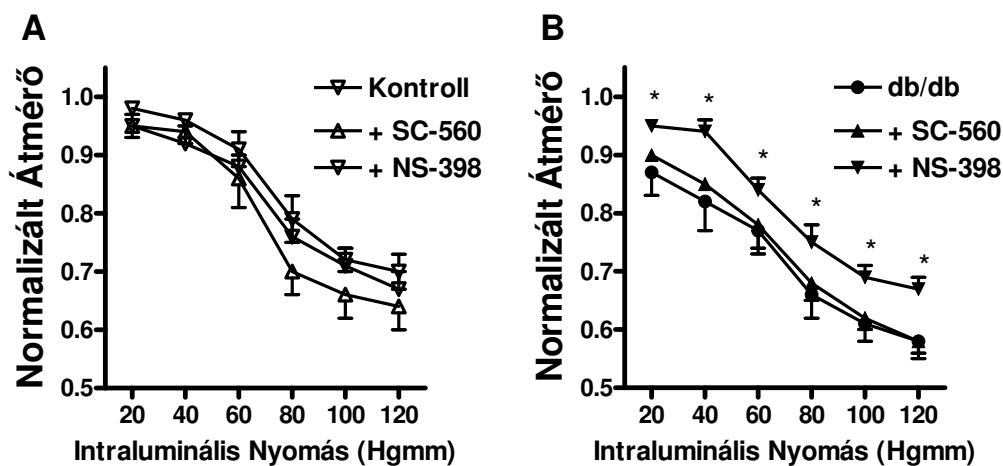
13.ábra. Kontroll (n=7) és DM (n=7) egerekből izolált arteriolák normalizált átmérői az intraluminális nyomás függvényében endothelfosztást követően.

Irodalmi adatok alapján feltételeztük hogy a simaizom-függő értónus növekedésének hátterében az érfalban lokálisan megfigyelhető fokozott konstriktor prosztaglandin termelődés is állhat. Az egyik legismertebb konstriktor prosztaglandin a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$, ami számos patológiás állapotban hozzájárul a mikroerek fokozott kontraktilitásához.¹¹⁷ Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ receptor gátlószere, SQ-29548 nem befolyásolta a kontroll erek nyomás-indukálta érválaszait, azonban a db/db egerek izolált vázizom ereiben a receptorblokkoló jelenlétében az adott nyomásértékeknél megfigyelt miogén tónus nagysága szignifikánsan csökkent. (14. ábra).



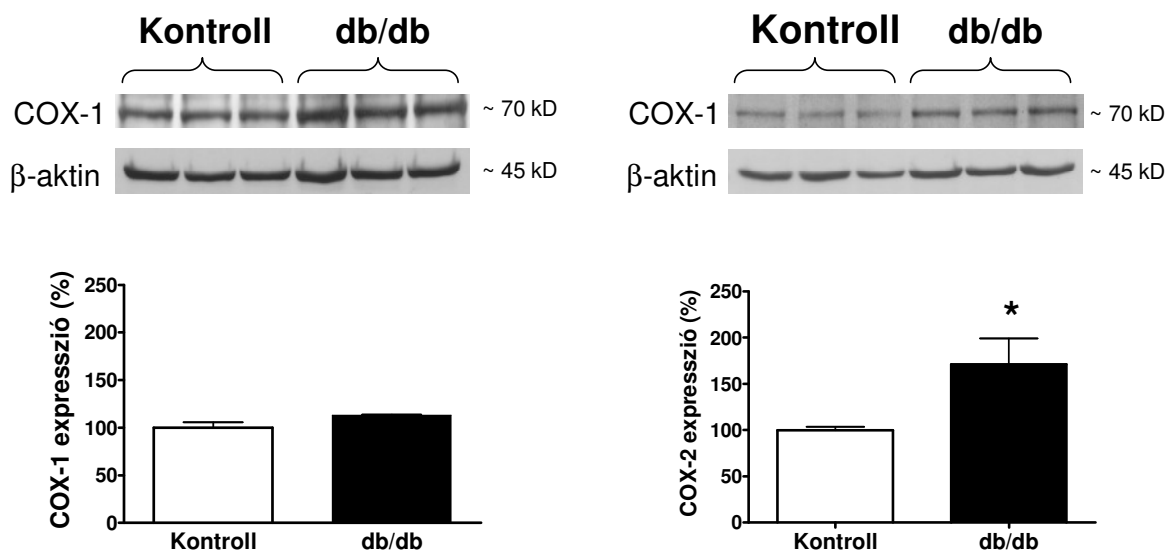
14.ábra. Kontroll (n=15) (A panel) és DM (n=15)(B panel) egerekből izolált arteriolák normalizált érátmérői a PGH_2/TXA_2 receptor blokkoló jelenlétében és hiányában.

A következőkben a konstriktor prosztaglandionok eredetének tisztázása végett a prosztaglandin termelésben kulcsszerepet játszó ciklooxygenáz enzim két izoformájának, a COX-1 és COX-2 enzimek szelektív gátlószereinek jelenlétében vizsgáltuk a normalizált érátmérőket. A COX-1 szelektív gátlószere, az SC-560 sem a kontroll, sem a db/db egerekből izolált erekben nem befolyásolta a normalizált érátmérőket, azaz a miogén tónus mértékét. A COX-2 szelektív gátlószere azonban a db/db gracilis arteriolákban szignifikáns mértékben csökkentette a miogén tónust, míg a kontroll erek nyomás-indukálta érválaszaira nem volt hatással. (15. ábra)



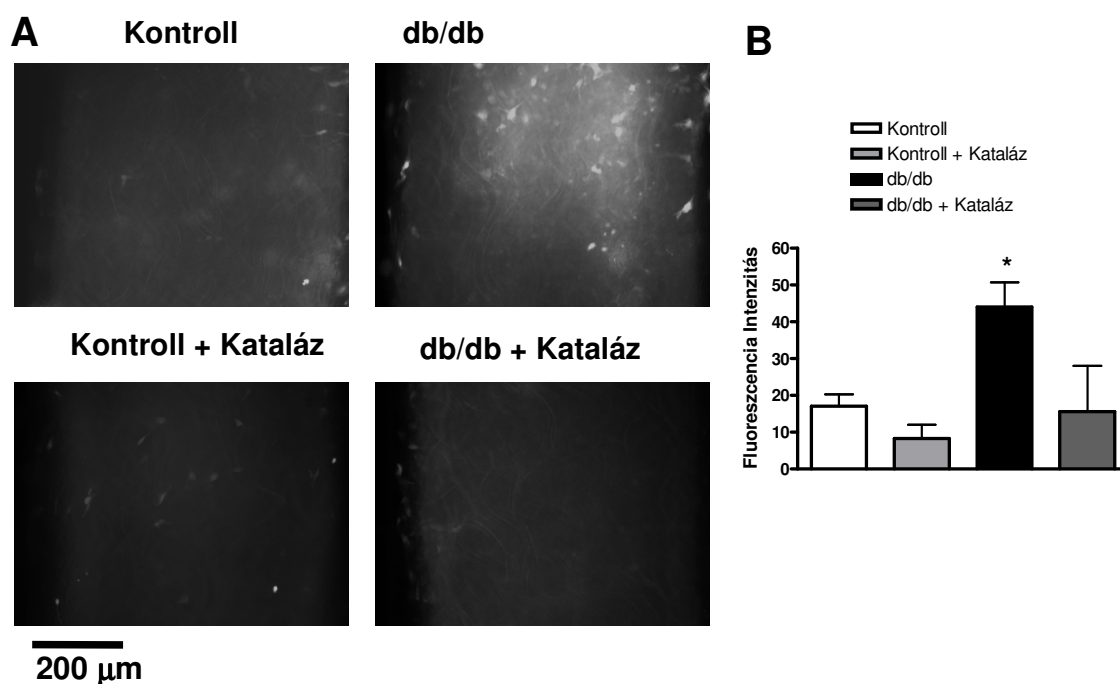
15.ábra. Kontroll (n=15) (A panel) és DM (n=15)(B panel) egerekből izolált arteriolák normalizált érátmérői szelektív COX-1 inhibitor SC-560 kezelés, illetve szelektív COX-2 inhibitor NS-398 kezelés előtt és után.

A COX-2 funkcionális jelenléte miatt fokozott COX-2 fehérje expressziót sikerült kimutatni a db/db egerek aortájában Western immunoblot segítségével, míg a COX-1 expressziója nem különbözött szignifikánsan a két csoportban. (16. ábra)



16.ábra. COX-1 és COX-2 expresszió kontroll és db/db egerek aortájában (n=5-5).

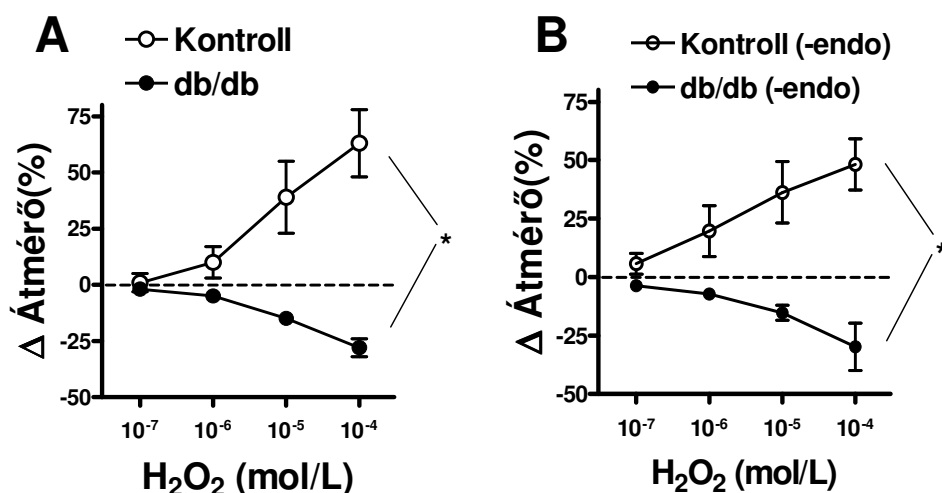
A következőkben arra kerestünk a választ, hogy milyen stimulus(ok) állhat(nak) a fokozott COX-2 eredetű konstriktor prosztoglandin szintézis hátterében db/db egerekben. Korábbi kísérletes megfigyelések alapján feltételeztük, hogy az érfali ROS hatással lehet az erek prosztoglandin szintézisére. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a db/db egerek carotis artériáiban a DCFH-nel detektálható fluoreszcencia intenzitás fokozott volt, amely az érfalban nagyobb mennyiségben jelen levő H₂O₂-ra utal. Ezen feltételezésünket igazolta, hogy kataláz kezelés hatására a db/db carotis erekben a fluoreszcencia intenzitás szignifikáns mértékben csökkent, azonban a kontroll erekben számottevő mértékben nem változott. (17. ábra)



17.ábra. Kontroll (n=4) és DM (n=4) egerekből izolált carotis artériák dichlorofluoreszeinnel jelölt fluoreszcens felvételei. Reprezentatív képek (A panel), illetve összegzett eredmények (B panel).

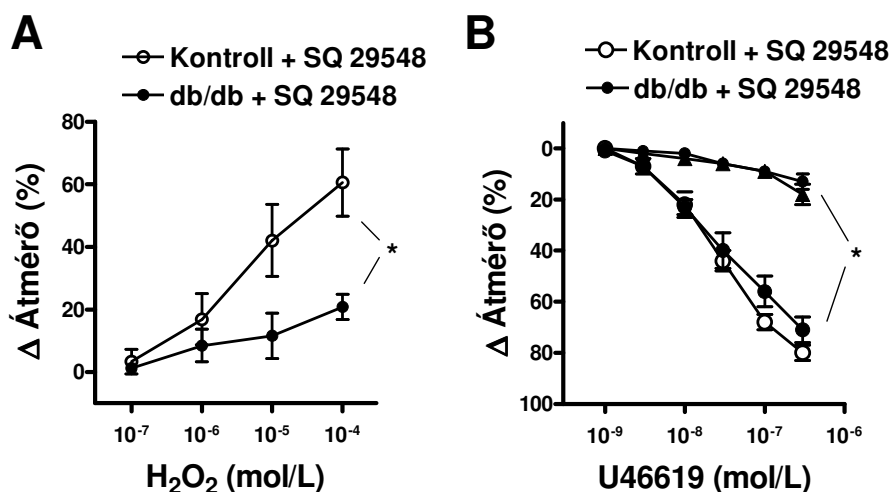
Kísérleteink következő részében azt vizsgáltuk, hogy milyen hatása lehet a db/db erekben megfigyelt fokozottan jelenlevő H₂O₂-nak az erek prosztoglandinok által közvetített

vazomotor működésére. Ezért az exogénen adott H_2O_2 növekvő dózisainak hatására kialakuló érátérő változásokat figyeltük meg db/db és kontroll egerek izolált vázizom arterioláin. A H_2O_2 a kontroll állatokból izolált arteriolákban dózis-függő vazodilatációt okozott, azonban a db/db egerek vázizom arterioláiban dózis-függő vazokonstrikció alakult ki. (18. ábra A panel) Az endothel eltávolítás nem befolyásolta egyik csoportban sem a H_2O_2 növekvő dózisai hatására kialakuló érválaszokat. (18. ábra B panel)



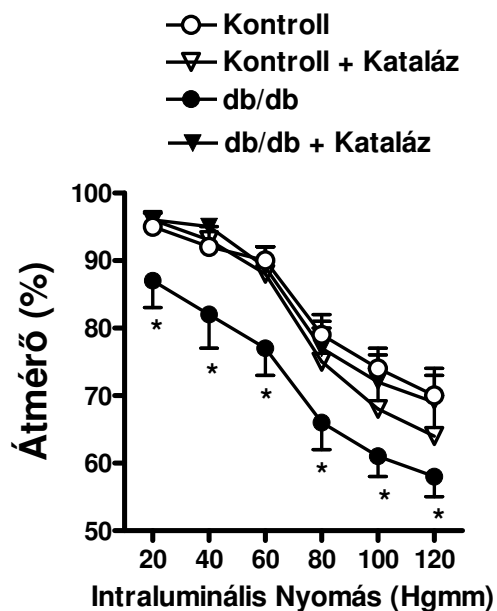
18. ábra. Kontroll ($n=5$) és DM ($n=5$) egerekből izolált arteriolák H_2O_2 növekvő dózisainak (10^{-7} - 10^{-4} mol/L) hatására kialakuló érválaszai endothelfosztás előtt (A panel) és után (B panel).

Továbbá azt is kimutattuk, hogy a PGH_2/TXA_2 receptor gátlószere, az SQ-29548 nem befolyásolta a kontroll ereken a H_2O_2 hatására kialakuló vazodilatáció mértékét, azonban a db/db egerek gracilis arterioláiban ezen receptorblokkoló a vazokonstrikciót megszüntette, és jelenlétében a H_2O_2 hatására vazodilatáció alakult ki, ami azonban szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a kontroll ereken megfigyelt dilatáció mértéke. (19. ábra A panel) A PGH_2/TXA_2 receptor agonistája, az U-46619 mindkét csoportból izolált vázizom arteriolákban hasonló mértékű vazokonstrikciót okozott, melyet receptor gátlószere mindkét csoportban hasonló, szignifikáns mértékben csökkentette. (19. ábra B panel)



19.ábra. Kontroll (n=5) és DM (n=5) egerekből izolált arteriolák H_2O_2 növekvő dózisainak (10^{-7} - 10^{-4} mol/L) hatására kialakuló érválaszai a PGH_2/TXA_2 receptor gátlószere, az SQ-29548 jelenlétében (A panel). Kontroll (n=7) és DM (n=7) egerekből izolált arteriolák U-46619 növekvő dózisainak (10^{-9} - 3×10^{-4} mol/L) hatására kialakuló érválaszai a PGH_2/TXA_2 receptor gátlószere, az SQ-29548 jelenlétében (B panel).

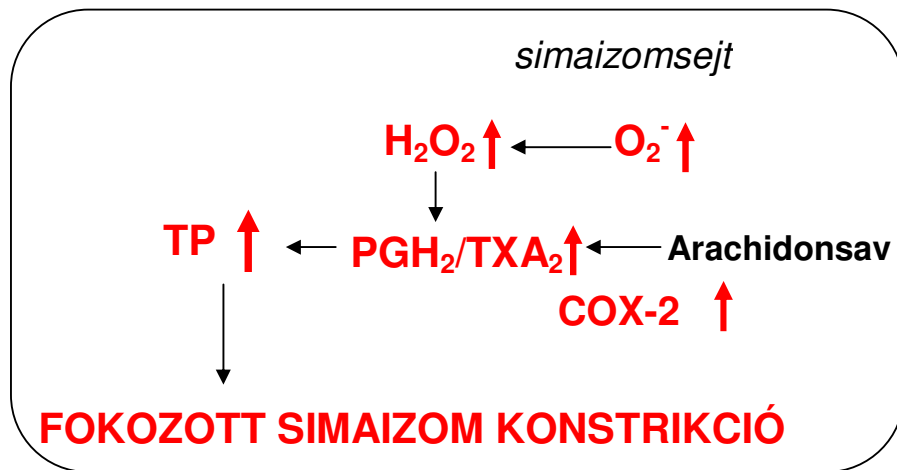
A következő protokollokban arra kerestünk választ, hogy az endogénen termelődő H_2O_2 szintjének normalizálásával csökkenthető-e a db/db erekben megfigyelt fokozott artériás tónus. Azt találtuk, hogy a kontroll egerekből izolált arteriolákban az egyes nyomásértékeken számított normalizált érátmérők 200 U/ml katalázzal történő inkubáció hatására nem változtak, azonban a db/db egerekből izolált erekben kataláz jelenlétében a miogén tónus a kontroll értékekhez hasonló szintre csökkent. (20. ábra)



20.ábra. Kontroll (n=7) és db/db (n=7) egerekből izolált arteriolák normalizált érátmérői 30 perces 200 U/ml-es kataláz kezelés előtt és után.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a 2-es típusú diabetes mellitus ezen előrehaladottabb fázisát modellező db/db egerekben az érfali simaizomsejtekben fokozódik a H_2O_2 termelése, amely nagyobb mennyiségben termelődő PGH_2/TXA_2 révén a bazális miogén tónus fokozódásához vezet. Feltételezzük, hogy az emlkedett érfali H_2O_2 termelés aktiválja és/vagy upregulálja a ciklooxygenáz-2 izoenzimet a simaizomsejtekben. Így fokozódik a vazokonstriktor hatású PGH_2/TXA_2 termelődése, amely a TP receptorok aktivációjával miogén tónus fokozódását eredményezi vázizom arteriolákban. (21. ábra)

2-es típusú Diabetes Mellitus

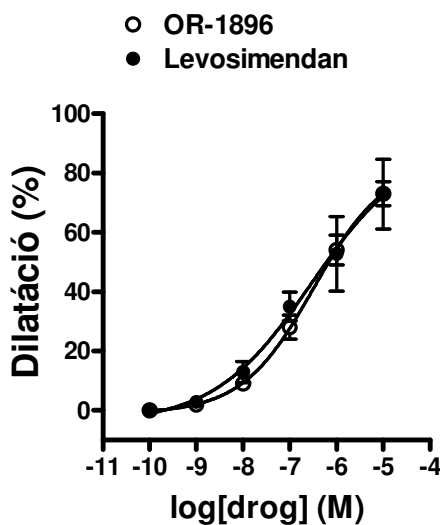


21.ábra. A konstriktor prosztaglandinok, így a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ termelésének fokozódásához vezető lehetséges mechanizmusok 2-es típusú diabetes mellitusban.

4.3. A levosimendan és az OR-1896 vazóaktív hatásai

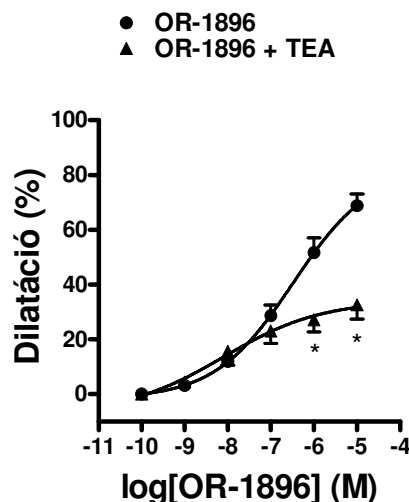
Kísérletsorozataink utolsó részében potenciálisan vazóaktív hatású és elsősorban bizonyos kálium csatorna aktiváció által dilatációt okozó szerek érátmérőre gyakorolt hatását tanulmányoztuk.

Az OR-1896 növekvő dózisa (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) hatására vazodilatáció alakult ki a vázizom arteriolákban, amely hasonló mértékű volt a levosimendan növekvő dózisainak (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) hatására kialakuló vazodilatációval (22. ábra)



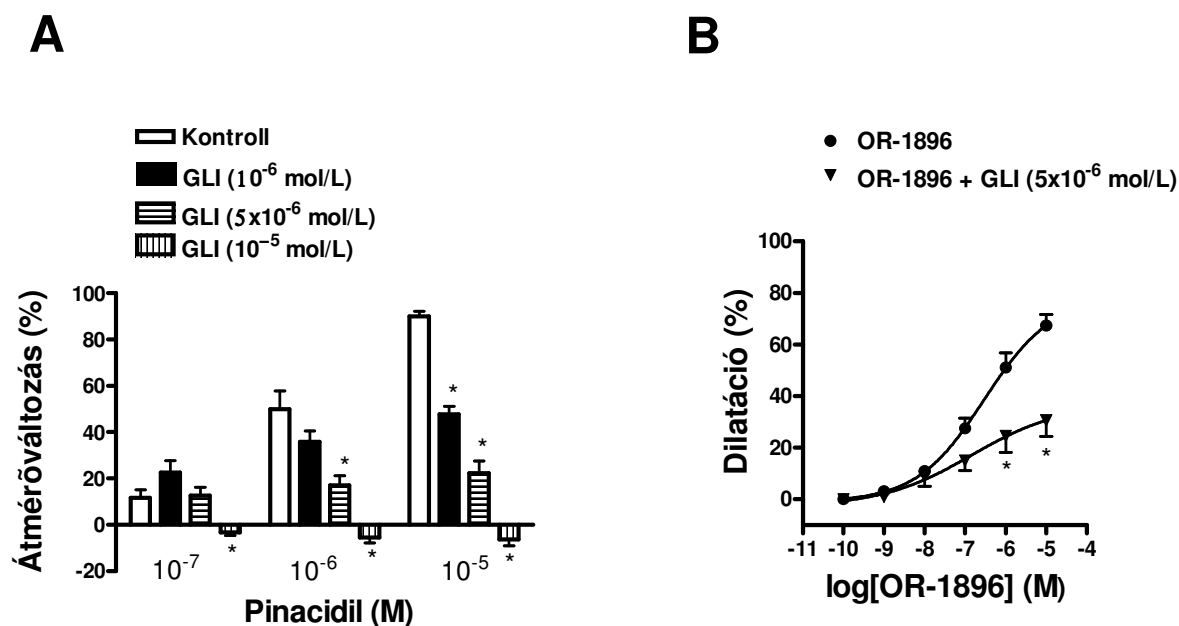
22.ábra. A levosimendan és az OR-1896 növekvő dózisainak hatására kialakuló vazodilatáció izolált gracilis arteriolákon.

A további protokollokban az OR-1896 vazodilatátor hatásának kialakulásában szerepet játszó K^{+} csatornákat vizsgáltuk. A nem-szelektív K^{+} csatorna blokkoló tetraetilammónium (TEA) jelenlétében az OR-1896 kiváltotta vazodilatáció szignifikáns mértékben csökkent (23. ábra).



23.ábra. OR-1896 növekvő dózisainak (1 nM-1 μ M) hatására kialakuló vazodilatációja a nem-szelektív K^+ csatorna blokkoló TEA jelenlétében (n=6).

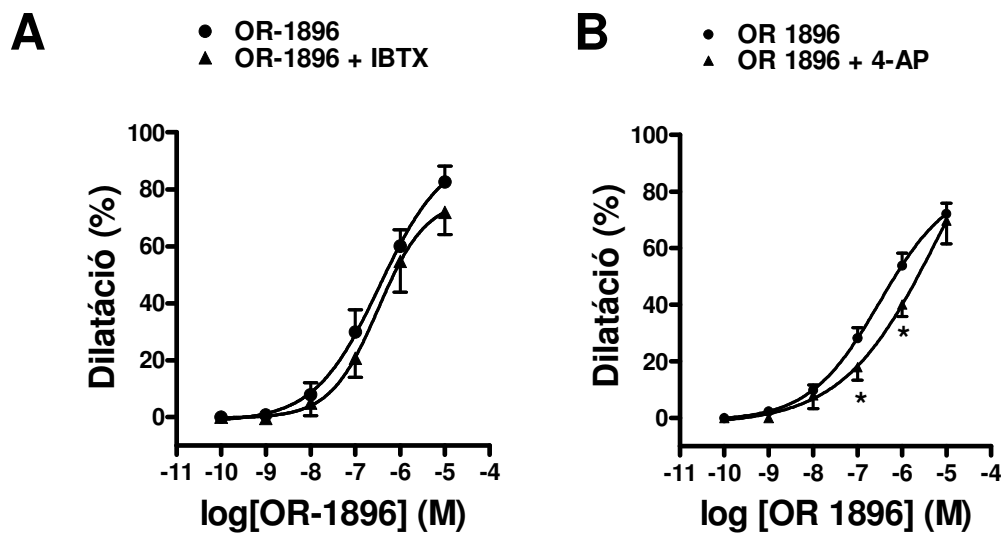
Az OR-1896 által aktivált K^+ csatornák természetének tisztázása végett a további protokollokban szelektív K^+ csatorna gátló szereket alkalmaztunk. Az ATP-függő K^+ csatornák funkcionális jelenlétét a csatorna szelektív nyitója, a pinacidil növekvő dózisainak hatására kialakuló vazodilatáció mérésével vizsgáltuk. A pinacidil dózis-dependens vazodilatációt okozott, amit a csatorna szelektív gátlószere, a glibenclamid növekvő koncentrációi gátoltak (24. ábra A panel). A következőekben 5×10^{-6} mol/L glibenclamid jelenlétében vizsgáltuk az OR-1896 hatására kialakuló vazodilatációt. Az izolált gracilis ereknél 5 μ M glibenclamid jelenlétében az OR-1896-kiváltotta vazodilatáció szignifikánsan csökkent (24. ábra B panel).



24.ábra. A pinacidil növekvő dózisainak (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) hatására kialakuló vazodilatáció glibenclamid inkubáció (10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} mol/L) előtt és után *gracilis* ($n=6$) ereken. (A panel)

A *gracilis* mikorerek OR-1896 növekvő dózisainak hatására kialakuló százalékos átmérőváltozása glibenclamid (5×10^{-6} mol/L) jelenlétében és hiányában. (B panel)

Végül a nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^{+} csatorna szelektív gátlószere, az iberiotoxin valamint a feszültségfüggő K^{+} csatorna gátló 4-aminopiridin jelenlétében is megfigyeltük az OR-1896 hatására kialakuló érátmérő változásokat. Azt találtuk, hogy míg az iberiotoxin (25. ábra A panel) nem volt hatással az OR-1896 kiváltotta vazodilatációra, addig a 4-aminopiridin szignifikáns csökkentette a dilatáció mértékét (25. ábra B panel).



25.ábra. Az OR-1896 növekvő koncentrációinak hatására kialakuló érátmérő változások az IBTX (A panel), valamint 4-AP (B panel) jelenlétében és hiányában vázizom mikroerekben ($n=5-5$).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a levosimendan metabolit, az OR-1896 részben az ATP-függő és részben a 4-AP szenzitív kálium csatornák aktivációja révén a levosimendanhoz hasonló mértékű vazodilatációt okoz izolált vázizom mikroereken. Kísérleteink alapján feltételezzük, hogy az OR-1896 jelentős mértékben hozzájárul a levosimendan terápia során megfigyelt hosszútávú hemodinamikai hatások kialakulásához.

5. MEGBESZÉLÉS

A 2-es típusú diabetes mellitus (2-DM) megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással járó kórállapot,¹⁶ mely komoly népegészségügyi problémát jelent Magyarországon. 2-DM-ban a kis ereket érintő microangiopathia talaján kialakuló nephropathia, neuropathia, retinopathia, cerebrális, kardiális, és alsó végtagi mikrokeringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az ezen betegségben szenvedők fokozott morbiditási és mortalitási rizikójához. Korábbi vizsgálatok szerint 2-DM-ban már a nagyerek atherosclerotikus elváltozásai és a mikroerek morfológiai eltérései előtt a rezisztencia erek endothel és simaizom által mediált vazomotor működése megváltozik, melynek fontos szerepet tulajdonítanak a megnövekedett kardiovaszkuláris rizikó kialakításában.¹⁹ Feltételezik, hogy 2-DM-ban a mikroerek vazomotor működésének zavara a lokális szöveti vérátáramlást szabályozó, adaptációs folyamatainak beszűküléséhez vezet, valamint hozzájárul a perifériás érellenállás fokozódásához és következményesen kialakuló magasvérnyomás betegség kialakulásához. Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére a 2-DM-ban megfigyelhető mikroérrendszeri elváltozások pontos kórélettani mechanizmusai és a kialakulásában szerepet játszó patológiai tényezők még ma sem teljesen tisztázottak.

Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a 2-DM-ban a rezisztencia erek vazomotor működésében létrejövő elváltozásokat. E cél érdekében a 2-DM két eltérő módon indukált állatkísérletes modelljében vizsgáltam az izolált vázizom arteriolák endothel-függő és simaizom által közvetített vazomotor működésének eltéréseit. Továbbá célul tűztem ki, hogy feltárjam az egyes mikroerek vazomotor működészavarában szerepet játszó lehetséges mechanizmusokat, különös tekintettel az oxidatív stressz és megváltozott prosztaglandin szintézis mikrovaszkuláris hatásaira.

2-es típusú diabetes mellitus magas zsírtartalmú diétával előidézett állatmodellje

Kísérleteinkben elsőként 10 hetes magas zsírtartalmú diétával (HFD) idéztünk elő 2-DM-t hím Wistar patkányokban. Elfogadott, hogy ebben az állatmodellben a humán, nyugati típusú étrendhez társuló 2-DM-hoz hasonló metabolikus elváltozások alakulnak ki. Továbbá feltételeztük, hogy a magas zsírtartalmú diéta segítségével előidézett 2-DM lehetőséget teremt a betegség korai stádiumában kialakuló funkcionális mikroérelváltozások tanulmányozására is. Ezen feltételezésünket arra a megfigyelésünkre alapoztuk, hogy patkányokban a magas zsírtartalmú diéta hatására a jelentősen emelkedett inzulin értékek mellett, a szérum vércukor szint kisebb mértékű, de szignifikáns emelkedését mértük (glükóz, kontroll: ~ 6-7 mmol/L, HFD: ~ 9-10 mmol/L). Spontán genetikai alapokon kialakuló 2-DM modellben (db/db egerek) azonban a magas szérum inzulin értékekhez már jóval magasabb, közel négyszeres vércukorszint emelkedés társult (glükóz, kontroll: ~ 6-7 mmol/L, db/db: ~ 20-25 mmol/L). A 2-DM betegség korai és előrehaladottabb állapotának ilyen módon történő elválasztása azonban limitálhatja az eredményeinkből az érműködés progressziójára vonatkozó következtetéseinket. A táplálék minőségének (HFD) vagy mennyiségének (db/db egér) eltérései, valamint a kísérletekben használt különböző állatfajokból (patkány vagy egér) fakadó eltérések, és az egyéb általunk nem vizsgált paraméterek különbözősége mind limitáló tényező lehet. Mindazonáltal a két diabetes modellben megfigyelt eltérő metabolikus paraméterek hozzájárulhatnak az alábbiakban részleteiben tárgyalt, az adott modellben megfigyelt mikrovaszkuláris elváltozások kialakításában.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a magas zsírtartalmú étrend következtében 10 hét elteltével állatok testtömege magasabb volt a kontroll, normál diétát fogyasztó patkányokhoz viszonyítva. A hiperinzulinémia és enyhe mértékű hiperglikémia mellett a HFD állatok szérum összkoleszterin szintje, valamint a viscerális elhízás mértékét jellemző retroperitoneális zsírtömege szignifikánsan emelkedett volt. Az altatott állatokban

meghatározott artériás középnyomás értékek szintén magasabbnak bizonyultak, az ugyanolyan körülmények között altatott kontroll patkányokhoz viszonyítva. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a magas zsírtartalmú diéta hatására a patkányokban olyan metabolikus és szisztémás hemodinamikai elváltozások alakulnak ki, melyek nagymértékben hasonlítanak a humán elhízáshoz társult, annak következtében kifejlődő 2-DM betegséghez.¹¹⁸

A magas zsírtartalmú diéta következtében létrejövő mikroér vazomotor működésének elváltozását HFD állatok *m.gracilis* izmából izolált arteriolákon végeztük (belső érátmérő ~ 160 μ m). Elsőként a HFD állatokból izolált *gracilis* arteriolák spontán kifejlődő, ún. bazális tónusának mértékét vizsgáltuk. Korábbi kutatások igazolták, hogy *in vivo* körülmények között a *gracilis* arteriolában az intraluminális nyomás közel 80 Hgmm.³⁸ Azt találtuk, hogy a 80 Hgmm-en meghatározott spontán kifejlődő aktív érátmérő és basális értónus nagysága nem különbözött a HFD és kontroll állatok izolált mikroereiben. Továbbá nem volt különbség az izolált erek kalcium-mentes közegben mért passzív átmérőjében sem. Ebből arra következtettünk, hogy a HFD állatok izolált vázizom mikroereinek elsősorban a simaizomsejtek által kialakított alaptónusa megtartott. Azonban amikor az izolált erek endothel funkcióját vizsgáltuk ismert vazóaktív anyagok alkalmazásával, lényeges különbség mutatkozott a két állatcsoport között. A HFD állatokból izolált *gracilis* arteriolákban az endothel-függő vazodilatátorok, az acetilkolin és hisztamin hatására kialakuló vazodilatáció szignifikánsan kisebb volt a kontrollokéhoz viszonyítva. Az endothel független, simaizom sejtekre közvetlen ható vazodilatátor, a NO donor nitroprusszid-nátrium hatására kialakuló vazodilatáció mértéke nem különbözött a két csoportban. Úgy tűnik tehát, hogy a HFD állatok arterioláiban szelektíven károsodik az endothel-függő vazodilatáció, azaz endothel diszfunkció alakul ki. Ezen megfigyeléseink egybehangzanak más nagy ereken végzett korábbi vizsgálatok eredményeivel, melyekben a magas zsírtartalmú diétán tartott sertések a. brachialis és coronaria ereiben,¹¹⁹ valamint patkányok aortáján¹²⁰ figyeltek meg csökkent

mértékű ACh és bradikinin hatására kialakuló endothel-függő vazodilatációt. A nagy konduktancia ereken végzett vizsgálatok eredményeiből csak korlátozott mértékben vonhatók le következtetések a rezisztencia erek működésére vonatkozóan. Ezért úgy gondoljuk, hogy az általunk kapott eredmények közvetlen bizonyítékkal szolgálhatnak a 2-DM-ban kialakuló mikorvaszkuláris endothel funkcionális károsodására ezen kísérleti modellben.

Tovább kísérleti protokollokban arra kerestünk választ, hogy mi állhat a HFD hatására kialakuló károsodott endothel működés hátterében. Korábban számos betegségben, többek között a diabetes mellitus más állatmodelljeiben arról számoltak be, hogy az endothel-függő vazodilatáció károsodásának hátterében a NO csökkent szintézise, vagy biológiai hozzáférhetősége áll.^{83, 84, 113, 117} Ezért következőkben az agonista-kiváltotta érválaszokat megvizsgáltuk a NO-szintáz gátlószere jelenlétében is. Azt találtuk, hogy a NO-szintáz gátlása szignifikáns mértékben csökkentette mind az ACh, mind a hisztamin hatására kialakuló vazodilatáció mértékét kontroll állatokból izolált ereken, míg az a HFD állatokból izolált mikroerek érválaszait nem befolyásolta. Ebből arra következtettünk, hogy a HFD állatok mikroereiben csökken az agonista szerek NO által közvetített dilatációja. A csökkent NO által közvetített érválaszok hátterében a NO csökkent mértékű szintézise vagy annak csökkent biológiai hozzáférhetősége állhat. Eredményeink az utóbbi hipotézist támogatják, mivel az antioxidáns Tiron alkalmazásával a HFD állatokból izolált ereken növekedett a hisztamin hatására kialakuló vazodilatáció mértéke. Meg kell jegyezni, hogy az ACh esetében, ahol a válaszok kialakításában csak kis mértékben játszik szerepet a NO, a Tiron jelenlétében mért dilatációs válaszkészség fokozódás nem volt szignifikáns. Mindazonáltal elmondhatjuk, hogy kísérleti eredményeink alapján feltehetőleg a HFD állatok izolált mikroereiben az oxidatív stressz következtében károsodik az agonista szerek által indukált, NO közvetítette dilatáció. A HFD állatok ereiben kialakuló oxidatív stressz szerepét tovább vizsgálva carotis ereken mértük lucigenin chemilumineszcencia segítségével a szuperoxid

anion mennyiségét. A HFD patkányok carotis ereiben a szuperoxid termelés fokozódott, amit a szabadgyökfogó Tiron a kontroll erekben mérhető szintre csökkentett.

Korábbi vizsgálatok a vaszkuláris szabadgyök termelésben elsősorban a xantin-oxidáz és a NAD(P)H-oxidáz szerepét hangsúlyozták hyperhomociszteinémiában¹¹⁷, atherosclerosisban⁷⁰ és hypertóniában.¹²¹ Jelen kísérleteinkben azt találtuk, hogy HFD állatokból izolált arteriolákban az endothel-függő vazodilatáció fokozódott a xantin-oxidáz inhibitor allopurinol jelenlétében, míg a NAD(P)H-oxidáz inhibitor apocynin nem befolyásolta a vazodilatáció mértékét. Ezzel párhuzamosan a HFD állatok carotis ereiben a lucigenin chemilumineszcenciával detektálható szuperoxid termelés a xantin-oxidáz enzim szubsztrátja, a xantin jelenlétében szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a kontroll erekben, míg NADH jelenlétében nem volt mérhető különbség a termelődött szuperoxid mennyiségében a kontroll és HFD carotis erekben. Továbbá fokozott xantin-oxidáz immunfestődés tapasztaltunk a HFD állatok garcilis arterioláiban.

Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy a 2-DM magas zsírtartalmú diétával indukált állatmodelljében a xantin-oxidáz eredetű szuperoxid termelés fokozódik, ami csökkenti a NO által közvetített endothel-függő vazodilatációt vázizom mikroerekben. Úgy gondoljuk, hogy az általunk leírt mikrovaszkuláris endothel diszfunkció szerepet játszhat a 2-DM korai, elsősorban inzulin rezisztenciával jellemzett szakaszában jelentkező szöveti perfúziózavar és következményes komplikációk, mint például az általunk is megfigyelt szisztémás vérnyomás emelkedés kialakulásában.

A 2-es típusú diabetes mellitus genetikai modellje

Az ún. db/db egerekben hiányzik a funkcionális leptin receptor, ezért az állatok nem éreznek jóllakottságot, és a krónikus túltápláltság következtében viszonylag korán - 12 hetes életkorra - kialakul a jelentős testsúlygyarapodással, hiperinzulinémiával és hiperglikémiával

jelentkező 2-DM. Munkahipotézisünk szerint ezen állatmodell lehetővé teszi tehát a 2-es típusú diabetes mellitus egy előrehaladottabb formájának tanulmányozását, melyben markánsabban és feltételezéseink szerint súlyosabb érintettséggel jelentkeznek mikrovaskuláris és egyéb szisztémás elváltozások. Kísérleteink során elsőként db/db és kontroll egerek szisztémás hemodinamikai paramétereiben jelentkező elváltozásokat vizsgáltuk. 12 hetes életkorban az éber állatokban mért szisztolés vérnyomás és artériás középnyomás magasabb volt a db/db állatokban a kontrollhoz viszonyítva. Emellett azt találtuk, hogy az echocardiográfiával mért perctérfogat csökkent, míg a számított perifériás ellenállás magasabb volt a db/db egerekben.

Hasonlóan a fentiekben már tárgyalt kísérletes elrendezéshez a 2-DM következtében létrejövő mikroér vazomotor működésének elváltozását db/db egerek m.gracilis izmából izolált arteriolákon végeztük (belső átmérő ~ 90 μ m). Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a db/db egerekből izolált vázizom arteriolák 80 Hgmm-en mért átmérője szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll állatok izolált ereiben mérhető átmérő. Mivel a kalcium-mentes közegben kialakult passzív érátmérő nem különbözött a két csoportban, arra következtettünk, hogy a spontán kifejlődő bazális tónus fokozódásáért valamilyen aktív konstriktós folyamat, és nem az erek már in vivo körülmények között kialakult kisebb érátmérője felelős. A következő kísérleti protokollokban a db/db egerek mikroereinek 20 és 120 Hgmm intraluminális nyomás között kialakuló bazális tónusának elváltozásait vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az intraluminális nyomás 20 Hgmm-ről 120 Hgmm-re történő 20 Hgmm-enkénti lépcsőzetes emelése hatására a db/db egerekből izolált mikroerekben minden egyes nyomásértéknél szignifikánsan kisebb aktív érátmérő alakult ki, míg az adott nyomásértékeken kalcium-mentes közegben kialakuló passzív érátmérő nem különbözött a két csoportban. Tehát úgy tűnik, hogy a db/db egerek izolált vázizom ereiben szignifikánsan nagyobb intraluminális nyomás-kiváltotta spontán miogén tónus alakul ki. Az endothel eltávolítása egyik csoportban

sem befolyásolta a nyomás-érátmérő görbéket azt sugallva, hogy ezen kísérletes elrendezésben az izolált erek miogén tónusának kialakításában elsősorban simizom eredetű folyamatok játszanak szerepet, amely mechanizmusok azonban fokozott érkonstriktiót eredményeznek a db/db egerek mikroereiben.

Jól ismert, hogy a rezisztencia ereken az intraluminális nyomás növekedésére, annak függvényében fokozott mértékű vazokonstriktió alakul ki. A jelenséget miogén tónusnak nevezzük, mely mint fontos szabályozó mechanizmus lehetővé teszi a szöveti perfúzió aktuális igényeknek megfelelő, a szisztémás nyomásváltozásoktól független kialakítását. Jelen kísérletes megfigyeléseinkhez hasonlóan korábban 2-DM betegek bőrének mikrokeringését vizsgálva leírták, hogy a bőr mikroereiben is fokozódik a vaszkuláris rezisztencia.¹²² 2-DM állatmodelljeiben több érterületen, így vázizom¹²³, valamint mesenterialis ereken⁸² is leírtak hasonló jelenséget. Jelen és az említett kísérletes megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a 2-DM-ban a rezisztencia ereken fokozott miogén tónusa alakul ki, ami közvetlen hozzájárul a perifériás rezisztencia fokozódáshoz és következményes szisztémás vérnyomás emelkedés kialakításához. Ugyanakkor más elképzelések szerint¹²² a mikroerek szintjén jelentkező fokozott tónus csupán másodlagos, adaptív folyamat és fontos szerepe van abban, hogy megakadályozza a magasabb szisztémás vérnyomás áttevődését a kapilláris keringésre. Jelen eredményeink alapján egyik elképzelés sem zárható ki. A szisztémás vérnyomás szabályozása rendkívül összetett és számos központi idegrendszeri, hormonális, humorális és egyéb lokális faktorok által mediált. További vizsgálatoknak kell tisztázni azt, hogy a vázizom rezisztencia ereinek fokozott miogén tónusa milyen mértékben járul hozzá, hozzájárul-e egyáltalán a magasvérnyomás kialakulásához 2-DM-ban.

A db/db egerekben megfigyelt fokozott miogén válasz akár elsődlegesen jelentkező elváltozás, akár azért alakul ki, hogy megakadályozza az emelkedett szisztémás vérnyomás disztális érterületekre történő áttevődését, végső soron a teljes perifériás ellenállás fokozását

eredményezheti. A db/db mikroerekre jellemző fokozott tónus hátterében álló mechanizmusok nem ismertek, azok tisztázása segíthet a 2-DM-os egerekben megfigyelt fokozott vaszkuláris rezisztencia és emelkedett szisztémás vérnyomás kialakulásának megértésében. Az arteriolák bazális tónusának szabályozásában számos dilatátor és konstriktor faktor játszik szerepet. Korábbi vizsgálatokban felvetették, hogy diabetesben a konstriktor proszttaglandinok érfali termelése fokozódik.¹²⁴ Az egyik legismertebb konstriktor proszttaglandin a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$, amely számos patológiás kórállapotban hozzájárul a mikroerek fokozott kontraktilitásához.^{87, 117}

Jelen kísérleteinkben azt találtuk, hogy a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ receptor blokkoló szignifikáns mértékben csökkentette a db/db egerek izolált mikroereinek miogén tónusát, míg a kontroll ereken nem változtatta meg a miogén tónus mértékét. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a db/db egerek izolált arterioláiban fokozódik az endogén konstriktor proszttaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ szintézise. Ismert, hogy a proszttaglandinok arachidonsavból képződnek, termelésükért a ciklooxygenáz enzim felelős. Az enzimnek két izoformája ismert az emlős sejtekben. A COX-1 izoenzim konstitutívan expresszálódik számos sejtben, így az érfali endothelsejtekben is, és a celluláris homeosztázis fenntartásában játszik fontos szerepet.⁹⁰ A COX-2 izoenzim fiziológiás körülmények között csak alacsony szinten expresszálódik, azonban gyulladásos, mitogén és különböző fizikai stimulusok hatására expressziója gyorsan fokozódik.⁹¹ Az alacsony szintű lokális érfali gyulladás szerepét az utóbbi időben számos betegség, így az atherosclerosis, valamint a diabeteses érszövődmények kialakulásában is felvetették.⁸⁶ Mesangialis sejtenyészetben leírták, hogy magas glükózt tartalmazó tápoldatban a sejtekben fokozódik a COX-2 expressziója,¹²⁵ valamint humán endotheliális sejtekben is, ahol a konstriktor proszttaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ szintézise is fokozódik.¹²⁶ Ezért következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az COX izoenzimek specifikus farmakológiai gátlószerei jelenlétében hogyan változik az izolált vázizom mikroerek bazális tónusa. A COX-1 szelektív

gátlása sem a kontroll, sem a db/db erekben nem befolyásolta a miogén tónus mértékét. Azonban a COX-2 szelektív gátlása a db/db erekben szignifikáns mértékben csökkentette az arteriolás tónust, míg a kontroll erek nyomás-indukálta érválaszait nem befolyásolta. Funkcionális kísérleteinkkel párhuzamosan a db/db egerek aortájában Western blot segítségével fokozott mértékű COX-2 expressziót sikerült kimutatni, míg az erek COX-1 expressziója nem különbözött a 2 csoportban. Tehát kísérleti eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a simaizomsejtekben fokozódik a COX-2-eredetű konstriktor prosztaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ szintézise, amely fokozott arteriolás tónus kialakulásához vezethet a db/db egerek vázizom arterioláiban.

Következőekben arra kerestünk választ, hogy mi vezethet el az érfalban fokozottan termelődő COX-2-eredetű konstriktor prosztaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ termelődéshez. Ahogy azt az előbbieken tárgyaltuk, a 2-DM magas zsírtartalmú diétával indukált modelljében fokozódik az érfali szuperoxid anion produkció, aminek fontos szerepet tulajdonítunk a 2-DM-os állatokban megfigyelt endothel diszfunkció kialakulásában. Korábban munkacsoportunk azt találta, hogy db/db egerekben fokozódik az érfali szuperoxid termelés, ami szintén szerepet játszik a mikroerek károsodott endothel működésének kialakításában.¹²⁷ Érdekes megfigyelés hogy tenyésztett humán endothel sejtekben a magas glükóz koncentráció jelenlétében fokozódik az oxigén szabadgyök termelés, aminek következtében COX-2 enzim up-regulációja és fokozott TXA_2 szintézis alakul ki.¹²⁵ Jól ismert, hogy kardiovaszkuláris megbetegedésben az érfali oxidatív stressz hatással lehet számos celluláris szabályozó mechanizmusra, melyeknek szerepe van a makro- és mikrovaskuláris szövődmények kialakításában.^{46, 52} Az is ismert, hogy szuperoxid anion ugyan nagyon reaktív molekula, de rendkívül instabil. A szuperoxid-diszmutáz enzim igen gyorsan ($\sim 10^{-9}$ másodperc alatt) a szintén szabadgyök tulajdonsággal bíró, de jóval stabilabb H_2O_2 -dá alakítja át.¹²⁸ Bár a H_2O_2 kevésbé erős oxidáló tulajdonságú, könnyen képes átdiffundálni a plazmamembránokon,⁵³ és

újabbban számos kórállapotban felmerült vazomotor diszfunkcióban betöltött kóroki szerepe. Normál körülmények között a H_2O_2 vazodilatátor hatással bír humán pitvari⁵⁷, és sertés piális ereken,¹²⁹ míg bizonyos érterületeken, mint például patkány mesenterialis⁵⁵ és vázizom ereken vazokonstrikciót okoz.⁵⁴

Korábbi saját kísérletes eredményeink és irodalmi adatok alapján alapján⁵⁷ feltételeztük, hogy a 2-DM állatmodelljében fokozódik az érfali H_2O_2 mennyisége, aminek szerepe lehet az általunk megfigyelt megváltozott vazomotor működés kialakításában. Elsőként a db/db egerek carotis ereiben fluoreszcens módszerrel (DCHF fluoreszcencia) mértük az érfali H_2O_2 szintjét. Azt találtuk, hogy a detektálható kataláz-szenzitív H_2O_2 mennyisége szignifikánsan magasabb volt a db/db egerek izolált ereiben a kontroll erekhez viszonyítva. Következően arra kerestünk választ, hogy milyen közvetlen vazoaktív hatással rendelkezik a H_2O_2 . A kontroll állatokból izolált vázizom arteriolákban a H_2O_2 dózis-függően vazodilatációt okozott, azonban a db/db állatokból izolált erekben meglepő módon vazokonstrikciót figyeltünk meg. A H_2O_2 hatására kialakuló kontroll és db/db erekben megfigyelt érválaszok nem változtak az endothel eltávolítása után jelezve, hogy a H_2O_2 közvetlenül a simaizom sejtekre hatva fejti ki vazoaktív hatását. Irodalmi adatok alapján a kontroll erekben megfigyelt vazodilatátor hatás hátterében dilatátor proszttaglandinok szintézise,¹³⁰ vagy a K^+ csatornák direkt aktivációja állhat.^{54, 57} Korábbi megfigyelések szerint a magasvérnyomás állatkísérletes modelljében, a spontán hipertóniás pakányok aortájában Gao és mtsai azt találták, hogy a H_2O_2 TP receptor mediált vazokonstrikciót okozott.⁵⁵ Jelen kísérletünkben azt találtuk, hogy a TP receptor gátlása után a db/db erekben a H_2O_2 növekvő dózisa hatására vazokonstrikció helyett vazodilatáció alakult ki, míg a kontroll érválaszokat a TP receptor gátlása nem befolyásolta. Ugyanakkor a TP receptor agonista U-46619 mind a kontroll, mind a db/db egerekből izolált vázizom mikroerekben hasonló mértékű vazokonstrikciót okozott, melyet a TP receptor gátlás teljesen megszüntetett. Ebből arra

következtettünk, hogy a TP receptor érzékenység nem különbözik a két csoportban, viszont a db/db erekben a fokozottan jelenlévő H_2O_2 elősegíti a konstriktor prosztaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ szintézisét, amely a kontroll erekben megfigyelt vazodilatációs mechanizmusokon felülkerekedve vazokonstrikcióhoz vezet. Az endogénen termelődő H_2O_2 szint hozzájárulását a db/db állatokból izolált erek fokozott tónusának kialakításához végül azon kísérleteink igazolták, melyekben azt találtuk, hogy H_2O_2 szintet csökkentő kataláz jelenlétében a miogén tónus a kontroll értékekhez hasonló szintre csökkent.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a db/db egerek vázizom arterioláiban fokozódik H_2O_2 érfali szintje, amely elősegíti simaizomsejtekben a feltehetőleg COX-2-eredetű konstriktor prosztaglandin, a $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$ szintézisét, ezáltal fokozva a mikroerek nyugalmi tónusát.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az érfali oxidatív stressz kulcsszerepet játszik a 2-DM betegség korai és előrehaladottabb stádiumában kialakuló vazomotor diszfunkció kialakításában. Azt gondoljuk, hogy az érfali oxidatív stressz már a 2-DM korai szakaszában károsítja az endothel dilatátor működését, míg a simaizom által az értónus szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok megtartottak maradhatnak. A 2-DM előrehaladottabb stádiumában az érfali oxidatív stressz egyaránt károsítja az endothel normál dilatátor működését és párhuzamosan bizonyos, a simaizomsejtek által közvetített, a nyugalmi értónus kialakításában szerepet játszó átmérő-szabályozó mechanizmusokat, melyek végső soron a rezisztencia erek dilatátor kapacitásának beszűküléséhez és az arteriolás tónus fokozódásához vezet. A rezisztencia erek szintjén a db/db egerekben megfigyelt elváltozásoknak szerepe lehet a perifériás rezisztencia fokozódás és következményes szisztémás vérnyomásemelkedés kialakulásában, mely mechanizmus fontosságát további in vivo vizsgálatoknak kell tisztázni.

A levosimendan és az OR-1896 vazoaktív hatásai

A mikrocirkuláció és a következményesen létrejövő szisztémás hemodinamikai és keringésélettani paraméterek 2-DM-ban megváltoznak, melyek jelentősen hozzájárulnak a szívérrendszeri morbiditás és mortalitás fokozódásához. Ezért kiemelkedően fontos az olyan terápiás megoldások kifejlesztése, amelyek a diabeteses mellitusban kialakuló, a mikroereket érintő vazomotor működészavar helyreállítását tűzik ki célul. A fentiekben részleteiben bemutattuk hogy a 2-DM állatkísérletes modelljeiben az erek dilatációs készségének beszűkülésével, valamint fokozott arteriolás tónus kialakulásával jellemzett vazomotor működészavar alakul ki. Tudományos kísérleteim utolsó részében ezért célul tűztem ki, hogy vizsgáljam olyan potenciálisan vazoaktív hatású vegyületek, mint például a levosimendan és metabolitja, az OR-1896 vázizom mikroér vazomotor működésre gyakorolt hatását, és annak pontos mechanizmusát. Ezen vegyületeknek szerepe lehet esetlegesen a jövőben a 2-DM-ban megfigyelt károsodott mikroérműködés helyreállítását célzó terápiájában.

Irodalmi megfigyelések és saját kísérletes eredményeink is támogatják azt az elképzelést, miszerint számos kórállapotban a mikroerek simaizom sejtjeinek hiperpolarizációjában és következményes vazodilatáció kialakításában szerepet játszó, bizonyos kálium csatornák által közvetített folyamatok sokáig fenntartottak maradhatnak többek között azért, mert a kálium csatornák működése kevésbé érzékeny az oxidatív stresszre.^{131, 132}

Jelenleg egy a szívelégtelenség kezelésében használatos szer, a levosimendan és annak hosszú élettartamú metabolitja, az OR-1896 vazodilatátor hatással bír. Korábban igazolták, hogy nagy konduktancia ereken a levosimendan bizonyos K^+ csatornák aktivációjával membrán hiperpolarizációt vált ki és következményes vazodilatációt okoz.¹⁰³⁻¹⁰⁸

A fentebb említett kísérletekben a levosimendan vazoaktív hatását csak farmakonokkal ún. prekontrahált, előfeszített izolált érgyűrűkön vizsgálták, és hosszú féléletidejű

metabolitjának, az OR-1896-nak, amely valószínűleg levosimendan hosszú távú kedvező hemodinamikai hatásaiért felelőssé tehető, egyáltalán nem voltak ismertek vazoaktív tulajdonságai. Jelen kísérletsorozatban spontán miogén tónussal rendelkező mikroereken tanulmányoztuk az anyavegyület, a levosimendan, valamint az OR-1896 mikroérműködésre gyakorolt hatását.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a patkány izolált gracilis arteriolákban mind a levosimendan, mind az OR-1896 dózis-függően és hasonló mértékben vazodilatációt okozott. Pataricza és mtsai azt találták, hogy sertés coronaria erekben a levosimendan vazodilatátor hatásáért az ATP-függő K^+ csatornák aktivációja tehető felelőssé.¹⁰⁴ A levosimendan patkány izolált simaizomsejteken, valamint izolált kamrai cardiomiocitákon is az ATP-függő kálium csatornák aktivációját eredményezi.¹⁰³ Később más kálium csatornák szerepe is felvetődött a levosimendan vazodilatátor hatásának kialakításában. Hohn és mtsai azt találták, hogy az ATP-függő kálium csatornák aktivációja mellett a nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált kálium csatornák is részt vesznek a levosimendan vazodilatátor hatásának kialakításában.¹⁰⁵ Ezért következő lépésként megvizsgáltuk, hogy mely kálium csatornák aktivációja tehető felelőssé a hosszú féléletidejű metabolit, az OR-1896 vazodilatátor hatásának kialakításában az általunk vizsgált patkány gracilis mikroerekben. A nem szelektív kálium csatorna inhibitor, a TEA közel 50%-kal csökkentette az OR-1896 kiváltotta vazodilatáció mértékét jelezve, hogy az OR-1896 által kiváltott dilatáció részben kálium csatornák által mediált. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy az ATP-függő kálium csatornák szelektív nyitószere, a pinacidil növekvő koncentrációi hatására vazodilatáció alakult ki a gracilis erekben, melyet a csatorna szelektív gátlószere, a glibenclamid szignifikáns mértékben gátolt. Azaz az általunk vizsgált érterületen az ATP-függő kálium csatorna funkcionálisan expresszálódik, és a csatorna működése 5×10^{-6} mol/L glibenclamiddal effektíven gátolható. Ezen glibenclamid koncentráció jelenlétében az OR-1896 kiváltotta vazodilatáció szignifikáns mértékben csökkent, igazolva az ATP-függő

kálium csatorna OR-1896 általi aktivációjának szerepét. Ezután a nagy konduktanciájú kalcium-aktivált kálium csatornák, és a feszültségfüggő kálium csatornák szerepét tanulmányoztuk a csatornák szelektív inhibitorainak segítségével. Ezen kísérletsorozatban fény derült arra, hogy a nagy konduktanciájú kalcium-aktivált kálium csatornák nem, míg a 4-aminopiridin szenzitív kálium csatornák aktivációja ugyan kis, de szignifikáns mértékben hozzájárul az OR-1896 vázizom arteriolákon megfigyelt vazodilatátor hatásának kialakításához.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy patkány vázizom ereken mind a levosimendan, mind metabolitja, az OR-1896 vazodilatátor hatással rendelkezik. Az OR-1896 vazodilatátor hatásáért elsősorban az ATP-függő kálium csatornák, és kisebb mértékben a feszültség-függő kálium csatornák aktivációja tehető felelőssé. Kísérleteink alapján feltétezzük, hogy a levosimendan hosszú távú kedvező hemodinamikai hatásának kialakításához a szervezetben keletkező hosszú féléletidejű metabolitjának, az OR-1896-nak a vazodilatátor hatása is jelentős mértékben hozzájárul. Továbbá úgy gondoljuk, hogy bizonyos a kálium csatornák aktiválásán keresztül ható vegyületeknek, mint például a levosimendannak és OR-1896-nak jótékony hatása lehet egyes vazomotor működészavarral járó kórállapotok kezelésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A 2-típusú diabetes mellitusban (2-DM) a rezisztencia erek vazomotor működése megváltozik, aminek természete és a háttérében álló pontos kórélettani mechanizmusok nem kellően ismertek. Kutatásainkban ezért célul tűztük ki, hogy a 2-DM állatkísérletes modelljeiben vizsgáljuk a rezisztencia erek endothel- és simaizom-függő vazomotor működésének elváltozásait. Továbbá vizsgáltuk az OR-1896 mikroér vazomotor működésre gyakorolt hatását, mely vegyületnek szerepe lehet 2-DM-ban megfigyelt károsodott mikroérműködés helyreállítását célzó terápiában. A kutatásaink során az alábbi új megállapításokat tettük. 1) A 2-DM magas zsírtartalmú diétával indukált állatmodelljében a xantin-oxidáz eredetű érfali szuperoxid termelés fokozódik, ami csökkenti a nitrogén-monoxid által közvetített endothel-függő vazodilatációt izolált vázizom arteriolákban. 2) A 2-DM genetikai modelljében (leptin gén receptor hiányos, ún. db/db egér) a vázizom arteriolákban fokozódik a hidrogén-peroxid érfali szintje, ami elősegíti a ciklooxigenáz-2-eredetű konstriktor prosztaglandinok termelését, ezáltal fokozza az arteriolák nyugalmi tónusát. 3) Továbbá patkány vázizom mikroerekben az OR-1896 vazodilatátor hatással rendelkezik, amiért elsősorban az ATP-függő, és kisebb mértékben a feszültség-függő kálium csatornák aktivációja tehető felelőssé.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az érfali oxidatív stressz kulcsszerepet játszik a 2-DM betegség korai és előrehaladottabb stádiumában kialakuló vazomotor diszfunkció és következményes vaszkuláris ellenállás fokozódás kialakításában. Úgy gondoljuk, hogy az oxidatív stressz-rezisztens mechanizmusokon keresztül ható értágító szereknek, mint például a kálium csatorna aktiváló OR-1896-nak szerepe lehet a mikroerek vazomotor működészavara miatt kialakuló perifériás rezisztencia fokozódás és következményes szisztémás vérnyomás emelkedés terápiájában.

7. IRODALOMJEGYZÉK

AZ ELŐZŐ FEJEZETEK BEN HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK:

- (1) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997 July;20(7):1183-97.
- (2) Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 1990 May;81(5):1586-93.
- (3) Yamamoto H, Bossaller C, Cartwright J, Jr., Henry PD. Videomicroscopic demonstration of defective cholinergic arteriolar vasodilation in atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1988 June;81(6):1752-8.
- (4) Cox DA, Vita JA, Treasure CB et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989 September;80(3):458-65.
- (5) Forstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988 February;62(2):185-90.
- (6) Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD, Armstrong ML, Harrison DG. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 1986 June;58(6):783-9.

- (7) Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1991 November;69(5):1293-300.
- (8) Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001 April;37(4):1053-9.
- (9) Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002 May 15;287(19):2570-81.
- (10) Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005 September 24;366(9491):1059-62.
- (11) Haffner SM, Ruilope L, Dahlof B, Abadie E, Kupfer S, Zannad F. Metabolic syndrome, new onset diabetes, and new end points in cardiovascular trials. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006 March;47(3):469-75.
- (12) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998 July;15(7):539-53.
- (13) Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H. Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet* 1980 June 28;1(8183):1373-6.

- (14) Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979 May 11;241(19):2035-8.
- (15) Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997 April;34(1):55-68.
- (16) Turner RC, Millns H, Neil HA et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998 March 14;316(7134):823-8.
- (17) Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(176 Pt 1):1-40.
- (18) Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2007 June;4(2):84-8.
- (19) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000 July;130(5):963-74.
- (20) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 November 27;288(5789):373-6.
- (21) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 June 11;327(6122):524-6.

- (22) Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997 November 1;100(9):2146-52.
- (23) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 August 4;95(16):9220-5.
- (24) Cosentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial function. *Eur Heart J* 1998 July;19 Suppl G:G3-G8.
- (25) Klatt P, Heinzel B, Mayer B et al. Stimulation of human nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and selective binding of the cofactor. *FEBS Lett* 1992 June 29;305(2):160-2.
- (26) Perkins WJ. Regulation of soluble guanylyl cyclase: looking beyond NO. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 September;291(3):L334-L336.
- (27) Sausbier M, Schubert R, Voigt V et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 2000 October 27;87(9):825-30.
- (28) Katusic ZS, Shepherd JT. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension* 1991 November;18(5 Suppl):III86-III92.
- (29) Shepherd JT, Katusic ZS. Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation. *Hypertension* 1991 November;18(5 Suppl):III76-III85.

- (30) D'Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore JC. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 2002 September;95(3):221-38.
- (31) Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am* 2004 January;88(1):19-38.
- (32) Re RN. The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. *Curr Opin Cardiol* 2001 November;16(6):317-27.
- (33) Iglarz M, Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003 April;5(2):144-8.
- (34) Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 July;36(7):1187-205.
- (35) Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007 August;262(2):173-83.
- (36) Sun D, Kaley G, Koller A. Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol* 1994 March;266(3 Pt 2):H1177-H1183.
- (37) Hill MA, Meininger GA. Impaired arteriolar myogenic reactivity in early experimental diabetes. *Diabetes* 1993 September;42(9):1226-32.

- (38) Hill MA, Ege EA. Active and passive mechanical properties of isolated arterioles from STZ-induced diabetic rats. Effect of aminoguanidine treatment. *Diabetes* 1994 December;43(12):1450-6.
- (39) Inazu M, Sakai Y, Homma I. Contractile responses and calcium mobilization in renal arteries of diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1991 October 2;203(1):79-84.
- (40) Tam ES, Ferguson DG, Bielefeld DR, Lorenz JN, Cohen RM, Pun RY. Norepinephrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell Calcium* 1997 February;21(2):143-50.
- (41) White RE, Carrier GO. Enhanced vascular alpha-adrenergic neuroeffector system in diabetes: importance of calcium. *Am J Physiol* 1988 November;255(5 Pt 2):H1036-H1042.
- (42) Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999 October 15;85(8):753-66.
- (43) Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002 January;82(1):47-95.
- (44) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
- (45) Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and

- pathology of free radicals. *Life Sci* 1999;65(18-19):1865-74.
- (46) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000 November 10;87(10):840-4.
- (47) Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997 November;20(11 Suppl 2):II-7.
- (48) Hazen SL. Oxidation and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000 June 15;28(12):1683-4.
- (49) Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S et al. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* 1999 April;42(1):206-13.
- (50) Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 April;280(4):C719-C741.
- (51) Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Res Clin Pract* 2001 December;54 Suppl 2:S65-S72.
- (52) Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 June;20(6):1430-42.
- (53) Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M,

- Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998 November;125(6):1329-35.
- (54) Cseko C, Bagi Z, Koller A. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. *J Appl Physiol* 2004 September;97(3):1130-7.
- (55) Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol* 2001 December;134(8):1639-46.
- (56) Leffler CW, Busija DW, Armstead WM, Mirro R. H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am J Physiol* 1990 May;258(5 Pt 2):H1382-H1387.
- (57) Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003 February 7;92(2):e31-e40.
- (58) Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1995 June 1;319(2):491-7.
- (59) Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 1995;61:33-45.

- (60) Aviram M, Rosenblat M, Etzioni A, Levy R. Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 1996 September;45(9):1069-79.
- (61) Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL, Das DK. Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol* 1993 March;264(3 Pt 1):C715-C722.
- (62) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994 June;74(6):1141-8.
- (63) Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 1994 December;267(6 Pt 1):L815-L822.
- (64) Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994 June;266(6 Pt 2):H2568-H2572.
- (65) Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR et al. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999 July 9;274(28):19814-22.
- (66) De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW,

- Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 1998 June 1;82(10):1094-101.
- (67) Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest* 1992 January;89(1):197-202.
- (68) Suzuki H, DeLano FA, Parks DA et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 April 14;95(8):4754-9.
- (69) Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 November 15;88(22):10045-8.
- (70) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993 June;91(6):2546-51.
- (71) Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997 July;30(1 Pt 1):57-63.
- (72) Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y et al. Abnormal biopterin metabolism is a

- major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂-imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 1999 December;48(12):2437-45.
- (73) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000 July;130(5):963-74.
- (74) Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol* 1996 September;28(3):573-9.
- (75) Vehkavaara S, Seppala-Lindroos A, Westerbacka J, Groop PH, Yki-Jarvinen H. In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 1999 December;22(12):2055-60.
- (76) Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 1999 June;22(6):973-81.
- (77) Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992 August;263(2 Pt 2):H321-H326.
- (78) Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia* 1995 December;38(12):1475-8.
- (79) Koltai MZ, Hadhazy P, Posa I et al. Characteristics of coronary endothelial

- dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 1997 April;34(1):157-63.
- (80) Palmer AM, Gopaul N, Dhir S, Thomas CR, Poston L, Tribe RM. Endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats is not reversed by dietary probucol or simvastatin supplementation. *Diabetologia* 1998 February;41(2):157-64.
- (81) Heygate KM, Lawrence IG, Bennett MA, Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1995 December;116(8):3251-9.
- (82) Lagaud GJ, Masih-Khan E, Kai S, van Breemen C, Dube GP. Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res* 2001 November;38(6):578-89.
- (83) Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired endothelium-mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 June;282(6):H2060-H2065.
- (84) Frisbee JC, Stepp DW. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 September;281(3):H1304-H1311.
- (85) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 December 19;420(6917):868-74.
- (86) Helmersson J, Vessby B, Larsson A, Basu S. Association of type 2 diabetes with

- cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 2004 April 13;109(14):1729-34.
- (87) Koller A, Kaley G. A new role for prostaglandins in the regulation of peripheral resistance. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;21B:595-8.
- (88) Basu S, Larsson A, Vessby J, Vessby B, Berne C. Type 1 diabetes is associated with increased cyclooxygenase- and cytokine-mediated inflammation. *Diabetes Care* 2005 June;28(6):1371-5.
- (89) Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis* 2005 July;181(1):201-7.
- (90) Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001 October 12;89(8):650-60.
- (91) Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol* 2003 January 15;65(2):153-9.
- (92) Kulmacz RJ, Wang LH. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995 October 13;270(41):24019-23.
- (93) Pollesello P, Ovaska M, Kaivola J et al. Binding of a new Ca²⁺ sensitizer,

- levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 1994 November 18;269(46):28584-90.
- (94) Rump AF, Acar D, Rosen R, Klaus W. Functional and antiischaemic effects of the phosphodiesterase inhibitor levosimendan in isolated rabbit hearts. *Pharmacol Toxicol* 1994 April;74(4-5):244-8.
- (95) Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1996 October;119(3):609-15.
- (96) Sandell EP, Hayha M, Antila S et al. Pharmacokinetics of levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 1:S57-S62.
- (97) Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Levijoki J, Linden IB. Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995 May;25(5):794-801.
- (98) Antila S, Kivikko M, Lehtonen L et al. Pharmacokinetics of levosimendan and its circulating metabolites in patients with heart failure after an extended continuous infusion of levosimendan. *Br J Clin Pharmacol* 2004 April;57(4):412-5.
- (99) Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ. Pharmacodynamics and safety of a new calcium sensitizer, levosimendan, and its metabolites during an

- extended infusion in patients with severe heart failure. *J Clin Pharmacol* 2002 January;42(1):43-51.
- (100) Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002 October;40(10):465-71.
- (101) Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J et al. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 2004 February 13;486(1):67-74.
- (102) Takahashi R, Talukder MA, Endoh M. Effects of OR-1896, an active metabolite of levosimendan, on contractile force and aequorin light transients in intact rabbit ventricular myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 July;36(1):118-25.
- (103) Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol* 1997 August 27;333(2-3):249-59.
- (104) Pataricza J, Krassoi I, Hohn J, Kun A, Papp JG. Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003 March;17(2):115-21.
- (105) Hohn J, Pataricza J, Petri A et al. Levosimendan interacts with potassium channel blockers in human saphenous veins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004

June;94(6):271-3.

- (106) Yildiz O, Seyrek M, Yildirim V, Demirkilic U, Nacitarhan C. Potassium channel-related relaxation by levosimendan in the human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 2006 May;81(5):1715-9.
- (107) Yildiz O, Nacitarhan C, Seyrek M. Potassium channels in the vasodilating action of levosimendan on the human umbilical artery. *J Soc Gynecol Investig* 2006 May;13(4):312-5.
- (108) Ozdem SS, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK, Usta C. The role of potassium channels in relaxant effect of levosimendan in rat small mesenteric arteries. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006 April;20(2):123-7.
- (109) Bowman P, Haikala H, Paul RJ. Levosimendan, a calcium sensitizer in cardiac muscle, induces relaxation in coronary smooth muscle through calcium desensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 January;288(1):316-25.
- (110) Haikala H, Linden IB. Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 1:S10-S19.
- (111) Michaels AD, McKeown B, Kostal M et al. Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake. *Circulation* 2005 March 29;111(12):1504-9.
- (112) Lilleberg J, Nieminen MS, Akkila J et al. Effects of a new calcium sensitizer,

- levosimendan, on haemodynamics, coronary blood flow and myocardial substrate utilization early after coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J* 1998 April;19(4):660-8.
- (113) Bagi Z, Koller A, Kaley G. Superoxide-NO interaction decreases flow- and agonist-induced dilations of coronary arterioles in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 October;285(4):H1404-H1410.
- (114) Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a New Mutation in the Mouse. *Science* 1966 September 2;153(3740):1127-8.
- (115) Kubota Y, Umegaki K, Kagota S et al. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2006 August;29(8):1756-8.
- (116) Li W, Jue T, Edwards J, Wang X, Hintze TH. Changes in NO bioavailability regulate cardiac O₂ consumption: control by intramitochondrial SOD2 and intracellular myoglobin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 January;286(1):H47-H54.
- (117) Bagi Z, Ungvari Z, Koller A. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species convert flow-induced arteriolar dilation to constriction in hyperhomocysteinemia: possible role of peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 January;22(1):28-33.
- (118) Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to

diabetes and heart disease. *Obes Res* 2003 November;11(11):1278-89.

- (119) Henderson KK, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high-fat, high-cholesterol diet: effect of exercise. *J Appl Physiol* 2004 September;97(3):1159-68.
- (120) Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 2005 January;98(1):203-10.
- (121) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000 March 17;86(5):494-501.
- (122) Jaap AJ, Shore AC, Tooke JE. The influence of hypertension on microvascular blood flow and resistance to flow in the skin of patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabet Med* 1994 November;11(9):883-7.
- (123) Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 December;283(6):H2160-H2168.
- (124) Sterin-Borda L, Franchi AM, Borda ES, Del Castillo E, Gimeno MF, Gimeno AL. Augmented thromboxane generation by mesenteric arteries from pancreatectomized diabetic dogs is coincident with the vascular tone enhancement evoked by Na arachidonate and prostacyclin. *Eur J Pharmacol* 1984 August 17;103(3-4):211-21.

- (125) Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K et al. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003 October;52(10):2570-7.
- (126) Cosentino F, Eto M, De Paolis P et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003 February 25;107(7):1017-23.
- (127) Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 February;286(2):H742-H748.
- (128) Wolin MS. Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. *Klin Wochenschr* 1991 December 15;69(21-23):1046-9.
- (129) Wei EP, Kontos HA. H₂O₂ and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. Implications for the identity of endothelium-derived relaxing factor generated by acetylcholine. *Hypertension* 1990 August;16(2):162-9.
- (130) Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 December;285(6):H2255-H2263.
- (131) Kaw S, Hecker M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, but not nitric oxide or prostacyclin release, is resistant to menadione-induced oxidative stress in the

bovine coronary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999
February;359(2):133-9.

- (132) Wolfle SE, de Wit C. Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res* 2005 November;42(6):475-82.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):696-702.

Erdei N, Toth A, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A, Bagi Z. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2107-15.

Erdei N, Bagi Z, Edes I, Kaley G, Koller A. H₂O₂ increases production of constrictor prostaglandins in smooth muscle leading to enhanced arteriolar tone in Type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(1):H649-56. 2007.

Bagi Z, Erdei N, Toth A, Li W, Hintze TH, Koller A, Kaley G Type 2 diabetic mice have increased arteriolar tone and blood pressure. Enhanced release of COX-2-derived constrictor prostaglandins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(8):1590-5.2005.

Bagi Z, Erdei N, Papp, Z, Edes I, Koller A. Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. *Pharmacol Rep.* 2006. 58 Suppl:52-6.

További *in extenso* közlemények:

Szerafin T*, Erdei N*, Fulop T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, Bagi Z. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res.* 2006;99(5):e12-7.

**társ elsőszerzős közlemény*

Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. Adaptation of Vasomotor Function of Human Coronary Arterioles to the Simultaneous Presence of Obesity and Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 27(11):2348-54.

Idézhető absztraktok:

Erdei N, Bagi Z, Tóth A, Édes I, Kaley G, Koller A A szelektív COX-1 és COX-2 gátlás hatása a mikrovaszkuláris rezisztenciára 2-es típusú diabetes mellitusban. *Cardiologia Hungarica*, 35, A18, 2005.

Lizanecz E, Erdei N, Bagi Z, Édes I, Tóth A A TRPV1 szerepe az értónus szabályozásában. *Cardiologia Hungarica*, 35, A24, 2005.

Bagi Z, Erdei N, Tóth A, Édes I, Kaley G, Koller A Increased level of hydrogen peroxide enhances myogenic tone in arterioles of type 2 diabetic mice. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26(1), 69. 2005.

Erdei N, Tóth A, Kaley G, Bagi Z, Koller A 2-es típusú diabetes mellitusban a vaszkuláris hydrogen peroxide növeli a COX-2 érfali expresszióját és fokozza az arteriolák konstriktor prosztaglandin termelését. *Acta Physiol. Hung.* 2005.

Bagi Z, Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Édes I A levosimendan és metabolitja, az OR-1896 vazodilatációt okoz patkány izolált arteriolákban. *Cardiologia Hungarica*, 36, A13, 2006.

Erdei N, Tóth A, Édes I, Koller Á, Bagi Z A xantin-oxidáz eredetű szuperoxid-anion csökkenti az endothel-függő arterioláris vazodilatációt magas zsírtartalmú diétán tartott patkányokban. *Cardiologia Hungarica*, 36, A17, 2006.

Szerafin T, Erdei N, Pásztorné Tóth E, Édes I, Koller Á, Bagi Z Bradikinin fokozott ciklooxygenáz-2-függő prosztaglandin mediálta dilatációt okoz diabéteszes betegek koronária mikroereiben. *Cardiologia Hungarica*, 36, A26, 2006.

Erdei N, Fehér A, Tóth A, Papp Z, Édes I, Koller Á, Bagi Z Az oxidative stressz szerepe az elhízás következtében kialakuló mikrovaskuláris endothel diszfunkció kialakulásában. *Acta Physiol Hung*. 2006.

Bagi Z, Erdei N, Tóth A, Édes I, Koller Á Interaction between hydrogen peroxide and prostaglandin metabolism leads to microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *J. Vasc. Res.* 43 (Suppl 1), 2006.

Erdei N, Tóth A, Pásztorné Tóth E, Papp Z, Édes I, Koller Á, Bagi Z Obesity-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats. Role of xanthine oxidase-derived superoxide. . *J. Vasc. Res.* 43 (Suppl 1), 2006.

Koller A, Erdei N, Tóth A, Édes I, Tóth J, Bagi Z High intraluminal pressure reduces tachyphylaxis to angiotensin II in isolated arterioles. FASEB Journal, 20(4), A 306, 2006.

Szerafin T, Erdei N, Édes I, Bagi Z Role of prostaglandin-mediated agonist-induced dilations of isolated human coronary arterioles obtained from patients with diabetes mellitus. Eur. Surg. 38 (Suppl 207), 2006.

Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Édes I, Bagi Z The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the KATP and BKCa channels in isolated arterioles of the rat. Eur. J. Heart Failure 5 (Suppl 1), 2006.

Erdei N, Fehér A, Beleznaï T, Tóth A, Koller Á, Édes I, Bagi Z A koronária arteriolák megváltozott vasomotor működése a metabolikus szindróma állatkísérletes modelljében. Cardiologia Hungarica, 37, A15, 2007.

Bagi Z, Erdei N, Szerafin T, Edes I, Koller A. Multiple effects of diabetes mellitus on the vasomotor responses of human coronary arterioles. FASEB JOURNAL 21 (6): A1226-A1226 APR 2007

Koller A, Erdei N, Feher A, Edes I, Bagi Z. Increased soluble guanylate cyclase (sGC) activity may compensate for the high fat diet-induced reduction in NO bioavailability of rat

coronary arterioles. FASEB JOURNAL 21 (6): A1226-A1226 APR 2007

Koller A, Erdei N, Edes I, Toth J, Bagi Z. High intraluminal pressure via increased release of hydrogen peroxide maintains arteriolar responsiveness to angiotensin II. FASEB JOURNAL 21 (6): A1248-A1248 APR 2007

Koller A., Erdei N, Feher A, Beleznaï T, Edes I, Bagi Z. High fat diet leads to increased no sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase. MICROCIRCULATION 14: 4-5, 459. 2007

Koller A, Erdei N, Toth J, Bagi Z. High Intraluminal Pressure Reduces AT1 Receptor Internalization and Maintains Arteriolar Constrictions to Angiotensin II. Circulation, Oct 2007; 116: II_14.

Bagi Z, Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Koller A, Edes I. Adaptation of Coronary Arteriolar Dilations to The Simultaneous Presence of Obesity and Hypertension: Role of Increased Nitric Oxide Sensitivity. Circulation, Oct 2007; 116: II_230.

Erdei N, Feher A, Beleznaï T, Edes I, Koller A, Bagi Z. Abstract 244: Oxidative Stress via Activating Soluble Guanylate Cyclase Leads to Increased Nitric Oxide Sensitivity of Coronary Arterioles in High Fat Diet-induced Obesity. Circulation, Oct 2007; 116: II_28.

8. TÁRGYSZAVAK

2-es típusú diabetes mellitus

vazomotor működészavar

endothel

miogén tónus

nitrogén-monoxid

oxidatív stressz

xantin-oxidáz

hidrogén-peroxid

ciklooxygenáz-2

konstriktor prosztaglandin

levosimendan

OR-1896

ATP-függő kálium csatorna

4-aminopiridin-szenzitív kálium csatorna

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet munkatársainak, kiemelten Professzor Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak, hogy a Debreceni Egyetem Doktori Iskola keretében végzett munkámat mindenkor támogatták.

Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológia Tanszék vezetőjének, Dr. Papp Zoltánnak, illetve a Tanszék valamennyi dolgozójának.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Bagi Zsoltnak a munkámhoz nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

10. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények különlenyomatait tartalmazza.