

## Kutatási Zárójelentés

### OTKA K-101775

#### „A tromboxán receptorok jelátviteli folyamatai érsimaizomban”

##### **A tromboxán receptorok aktiválódása által kiváltott vazokonstriktió és hipertenzió jelátviteli folyamatai élettani körülmények között és NO-hiányos állapotban<sup>1</sup>**

Kutatási projektünk egyik célja a tromboxán receptorok (TP) által közvetített rendkívül erős és tartós vazokonstriktió jelátviteli folyamatainak a feltérképezése volt. Kísérleteink első részében vad típusú kontroll és különböző transzgenikus egerekből izolált thoracalis aorta szegmenteknek a TP receptor agonista U-46619-re adott válaszreakcióit vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy kontroll erekben az 1 nM – 10  $\mu$ M koncentráció-tartományban alkalmazott U-46619 dózis-függő módon fokozta az értónust. A maximális válasz meghaladta a 124 mM  $K^+$  alkalmazásával kiváltott referencia-kontrakció kétszeresét, és meglepő módon rezisztens volt a potens vazodilatátor Na-nitroprussziddal (SNP, 10  $\mu$ M) szemben. Kísérleteinket megismételtük a simaizomban a  $G_{\alpha_q}$  és  $G_{\alpha_{11}}$  fehérjékre deficiens ( $G_{\alpha_{q/11}}$ -KO) állatokból származó ereken, és azt tapasztaltuk, hogy az U-46619 konstriktor hatása a teljes vizsgált koncentráció-tartományban lecsökkent, de a maximális válasz még így is magasabb maradt, mint a 124 mM  $K^+$  által kiváltott referencia-kontrakció (1. ábra).

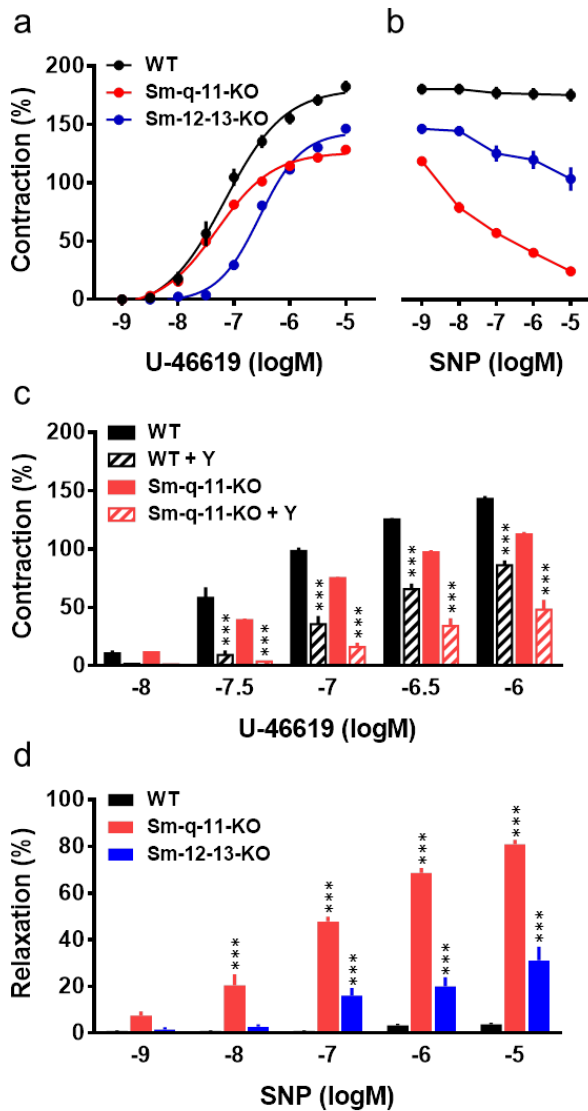
Méréseinket megismételtük a simaizomban  $G_{\alpha_{12}}$  és  $G_{\alpha_{13}}$  fehérjékre deficiens ( $G_{\alpha_{12/13}}$ -KO) egerek erein is, amelyek 30 nM-os U-46619 koncentrációig egyáltalán nem reagáltak, és magasabb agonista-dózisok mellett is szignifikánsan gyengébb válaszokat mutattak, azonban a maximális vazokonstriktió még így is erősebb volt, mint a 124 mM  $K^+$  hatására kialakuló referencia-kontrakció. A  $G_{12/13}$ -jelátviteli út jelentőségére utal az a megfigyelésünk is, hogy míg 10 nM U-46619 jelenlétében a szerotonin és az  $\alpha$ -adrenoreceptor agonista fenilefrin vazokonstriktor hatása mintegy másfélszeresére fokozódott kontroll egerek ereiben, addig ez a hatás nem volt megfigyelhető  $G_{\alpha_{12/13}}$ -KO ereken. Végül említést érdemel az a megfigyelésünk is, hogy a kontroll erekkel ellentétben mind a  $G_{\alpha_{q/11}}$ -KO, mind pedig a  $G_{\alpha_{12/13}}$ -KO ereken képes volt 10  $\mu$ M SNP relaxálni a 10 $\mu$ M U-46619 által kiváltott vazokonstriktiót (1. ábra).

Eredményeink szerint a TP-receptorok gyenge aktiválódásakor kialakuló értónus-fokozódást és a más konstriktorokkal szembeni fokozott érzékenységet a  $G_{12/13}$  jelátviteli út közvetíti. Magasabb agonista-koncentrációk mellett azonban a  $G_{q/11}$  és  $G_{12/13}$  fehérjék által közvetített szignáltranszdukciós mechanizmusok egyaránt aktiválódnak, és ezzel lehet összefüggésben a

---

<sup>1</sup>Ezen alfejezet megfigyeléseit még csak konferencia absztraktok formájában publikáltuk, ezért a közlésre előkészített kézirat ábraanyagával mutatjuk be az eredményeket. A további alfejezetek eredményei már publikálásra kerültek, így az eredményeket bemutató ábrák a közleményekben megtalálhatók.

rendkívül erős és vazodilatátorokkal szemben rezisztens vazokonstrikció ill. vazospazmus kialakulása.

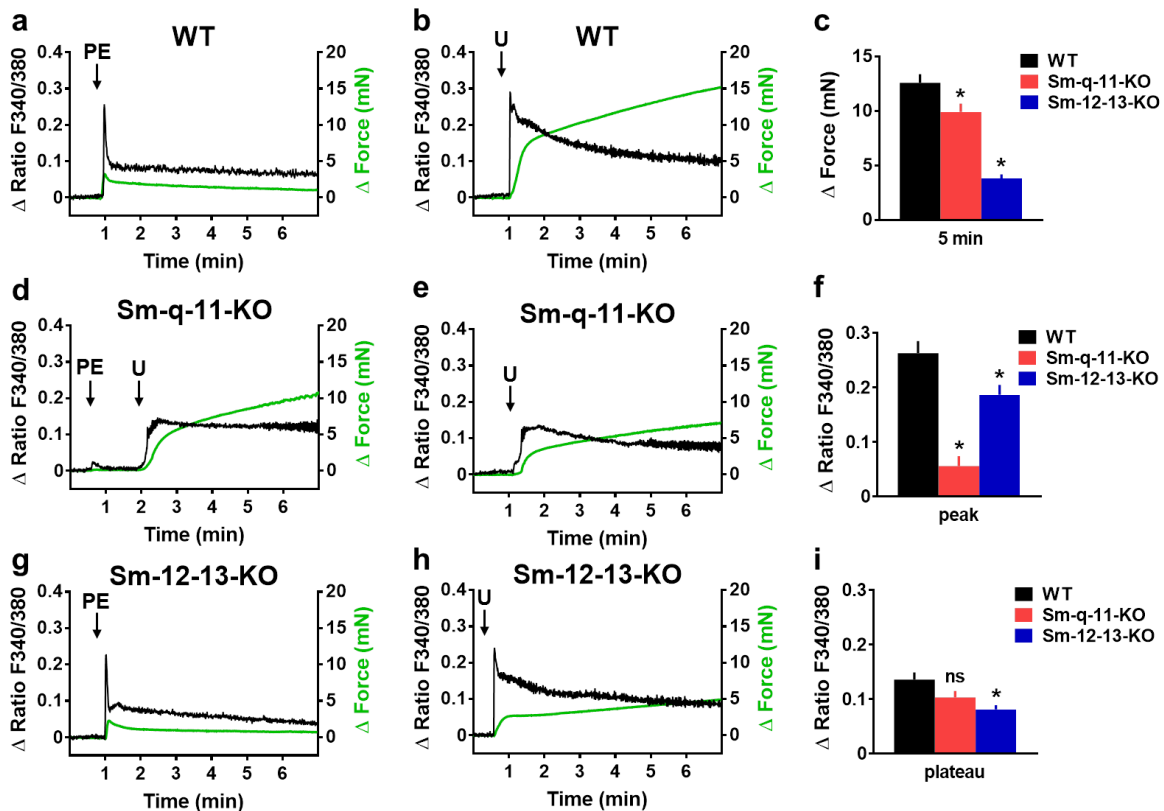


1. ábra U-46619 dóziszfüggő kontrakciót okoz egér aortában. A kontrakció mind  $G\alpha_{q/11}$ -KO, mind  $G\alpha_{12/13}$ -KO aortákban elmarad a vad típusú erekhez képest (a, c), és érzékeny a Rho-kináz útvonal Y-27632-vel történő gátlására (c). Az erős kontrakció kontroll erekben nem, míg mindkét KO törzsben relaxálható volt az NO donor SNP-vel (b, d).

A TP-receptorok jelátviteli útjainak további vizsgálatához szükséges volt egy olyan műszer-együttes beszerzése, mellyel szimultán vizsgálható az értónus és az érsimaizom intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációja  $[Ca^{2+}]_i$ . E fejlesztés jelentős részben az OTKA-támogatásból volt megvalósítható, és segítségével az alábbi megfigyeléseket tettük.

Kontroll erekben 1  $\mu$ M U-46619 egy gyorsan kialakuló  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést okoz, melyet egy fenntartott  $Ca^{2+}$ -szignál követ, miközben az értónus folyamatosan fokozódik. Ezzel szemben fenilefrin hatására a kezdeti kifejezett  $[Ca^{2+}]_i$ -csúcsot követően a  $[Ca^{2+}]_i$  egy alacsonyabb, de a nyugalmihoz képest emelkedett szinten stabilizálódik, és az értónus változása a  $Ca^{2+}$ -szignál mintázatát követi. A  $G\alpha_{q/11}$ -KO egerekből izolált erekben az  $\alpha_1$ -adrenoreceptor agonista fenilefrin hatástalan volt a  $[Ca^{2+}]_i$ -re és az értónusra egyaránt, míg az U-46619 csökkent  $Ca^{2+}$ -szignált és vazokonstrikciót váltott ki. Mivel a  $G\alpha_{12/13}$  jelátviteli út gátlása szintén

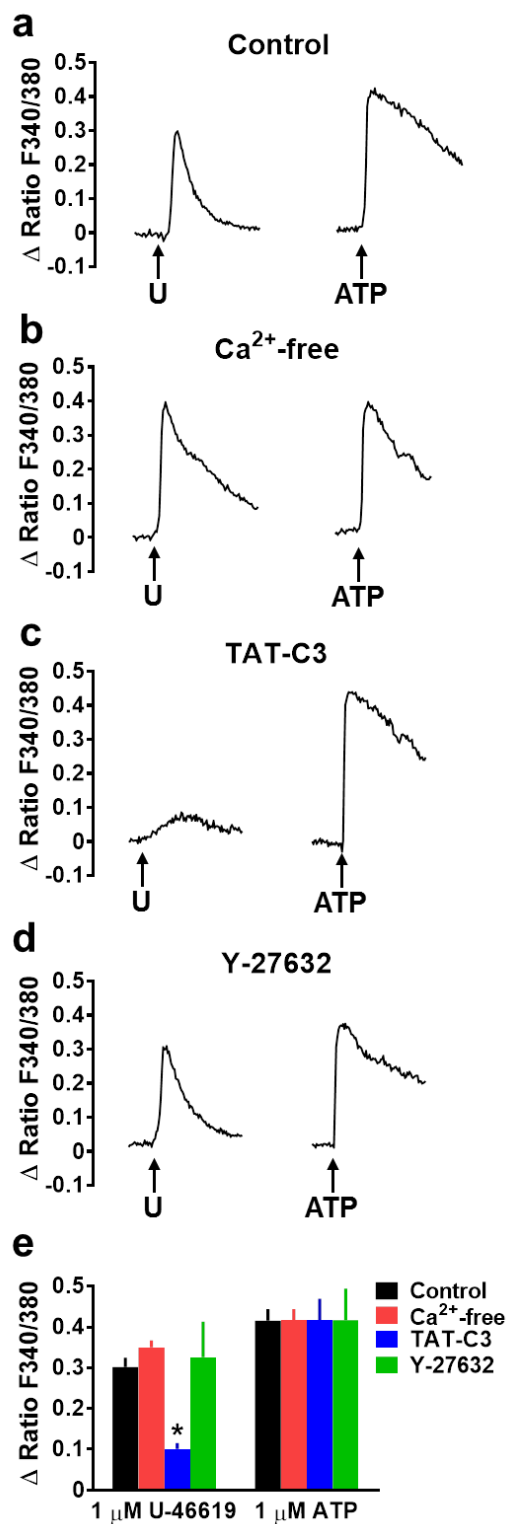
csökkentette a kontrakciós választ, kézenfekvő volt annak feltételezése, hogy ez játszik szerepet az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedésében is a TP-receptorok aktivációjakor. Kimutattuk, hogy a  $G\alpha_{12/13}$ -fehérjék hiányában jelentősen csökken a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál, különösen annak késői fázisa. Ezzel beigazolódott a  $G\alpha_{12/13}$  jelátviteli út szerepe a TP-receptorok aktiválódásának hatására kialakuló  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés kiváltásában. Mivel a  $G\alpha_{12/13}$ -fehérjék által közvetített  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált korábban nem írták le az érsimaizomban, megfigyeléseink alapján feltételeztük, hogy ennek szerepe lehet a tromboxán  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) különösen erős és tartós vazokonstriktor hatásának kialakulásában élettani és kórélettani körülmények között (2. ábra).



2. ábra. Szimultán regisztrált intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál (fekete görbe) és értónus (zöld görbe) változások PE és U46619 hatására vad típusú (a-b),  $G\alpha_{q11}$ -KO (d-e), és  $G\alpha_{12/13}$ -KO (g-h) aortákban. Az értónus változása 5 perccel az U46619 adása után szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét vizsgált KO-ban (c). A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szignál maximuma mindkét KO-ban alacsonyabb volt (f), míg a fenntartott fázis csak a  $G\alpha_{12/13}$ -KO-ban (i).

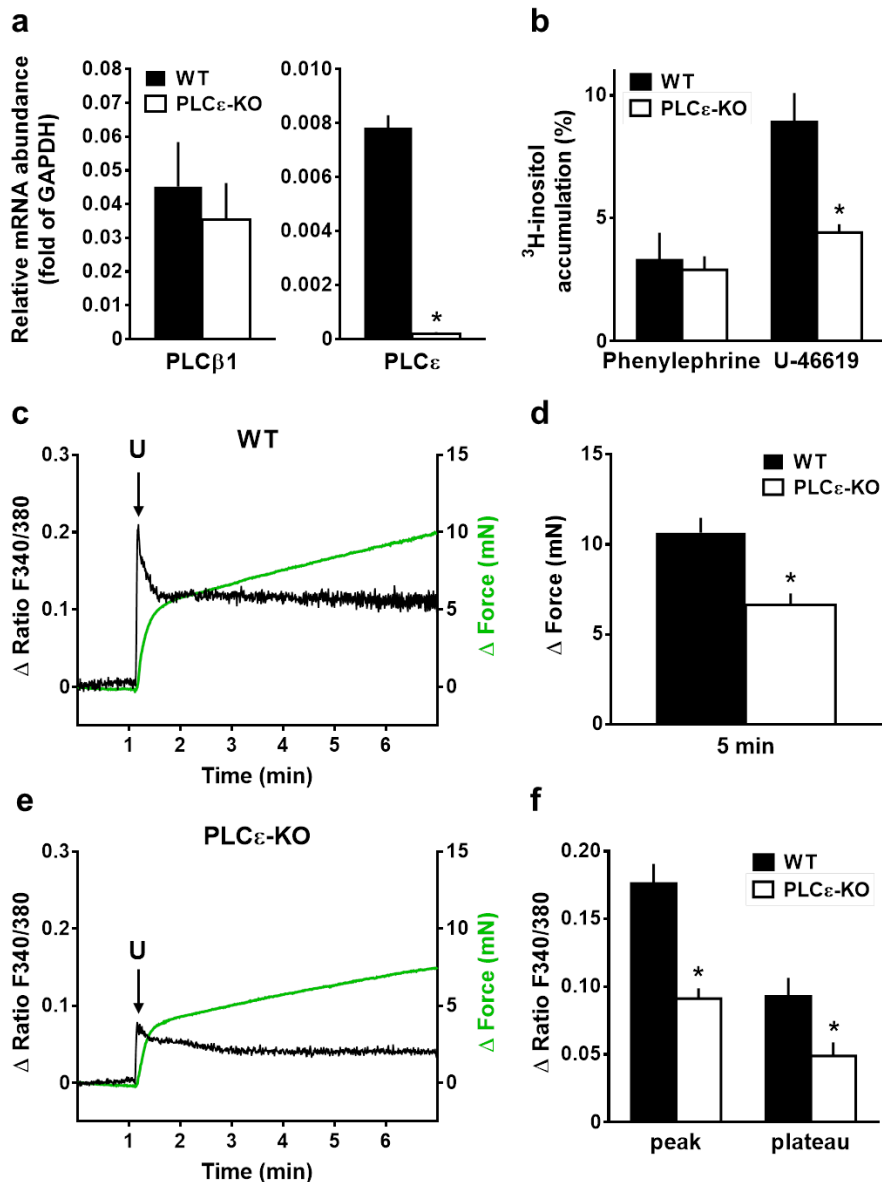
A projekt következő szakaszában e jelátviteli út pontos feltérképezését tűztük ki célul. Eredményeink szerint azonban a  $G\alpha_{q11}$  jelátviteli út is szerepet játszik a TP-receptorok aktiválásának hatására kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál kiváltásában. Ennek kiiktatására kísérleteinket  $G\alpha_{q11}$ -deficiens egerek aortájából izolált simaizomsejteken végeztük, így specifikusan tudtuk vizsgálni a másik,  $G\alpha_{12/13}$  által közvetített jelátviteli út szerepét. Azt tapasztaltuk, hogy az U-46619 hatására kialakuló  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés nem változott extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában, így beigazolódott, hogy az intracelluláris raktárakból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás áll a folyamat háttérében. Ezt követően a  $G\alpha_{12/13}$  jelátviteli út klasszikus intracelluláris komponenseinek a kis G-fehérje RhoA és az általa szabályozott Rho-kináz (ROCK) szerepét vizsgáltuk. A

ROCK gátlása Y-27632-vel nem változtatta meg az U-46619 által kiváltott  $Ca^{2+}$ -szignált, azonban a RhoA-inhibitor TAT-C3 gyakorlatilag teljesen eltüntette azt. Ezzel beigazolódott, hogy a  $G_{\alpha_{12/13}}$  jelátviteli út a RhoA aktiválásával, de a ROCK-tól független módon okozza a  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedését a TP-receptorok aktivációjakor (3. ábra).



3. ábra. TP-receptorok aktiválásának hatására kialakuló  $Ca^{2+}$ -szignál  $G_{\alpha_{q/11}}$ -deficiens egerek aortájából izolált simaizomsejteken kontrol körülmények között (a), extracelluláris  $Ca^{2+}$  hiányában (b), RhoA-inhibitor TAT-C3 (c) és ROCK gátló Y-27632 jelenlétében (d). A  $[Ca^{2+}]_i$ -szignál maximuma TAT-C3 jelenlétében jelentősen lecsökkent (e).

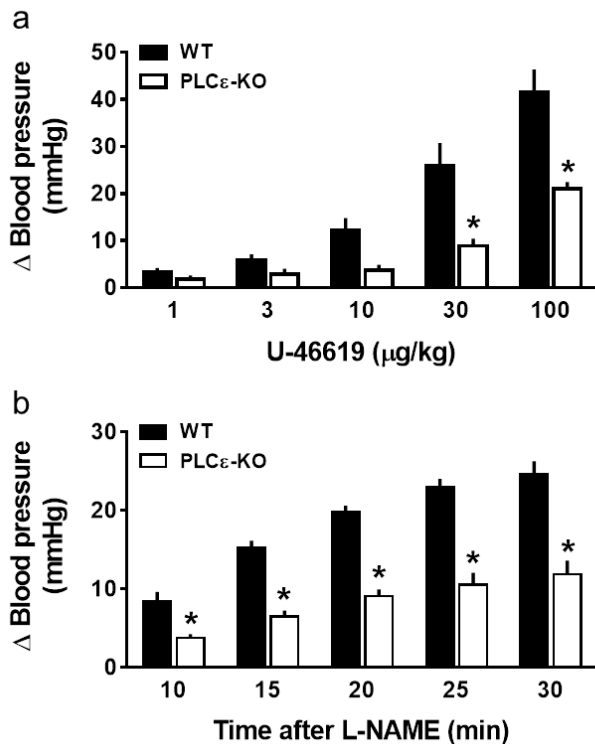
A következő kérdés annak kiderítése volt, hogy miként vezet a  $G\alpha_{12/13}$ -Rho aktiváció intracelluláris  $Ca^{2+}$ -felszabaduláshoz. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a RhoA képes aktiválni a foszfolipáz C $\epsilon$  (PLC $\epsilon$ ) enzimet, mely inozitol-triszfoszfát (IP $_3$ ) képződésen keresztül indukálhat  $Ca^{2+}$ -felszabadulást a szarkoplazmás retikulumból. Ennek a lehetőségnek a tisztázására megvizsgáltuk az érválaszokat PLC $\epsilon$  knock out (PLC $\epsilon$ -KO) egerekből származó ereken. Azt tapasztaltuk, hogy PLC $\epsilon$ -KO egerek aortáiban az U-46619 hatására kialakuló kontrakciós erő és  $Ca^{2+}$ -szignál egyaránt szignifikánsan lecsökkent. Megfigyeltük továbbá, hogy míg az  $\alpha_1$ -adrenoreceptor agonista fenilefrin hatására felszabaduló IP $_3$  mennyisége nem változik a PLC $\epsilon$ -KO állatokból származó ereken, addig a TP-receptor agonista U-46619 okozta IP $_3$ -felszabadulás jelentősen csökken (4. ábra).



4. ábra. PLC $\epsilon$  mRNS jelenlétének, ill. hiányának igazolása WT, ill. PLC $\epsilon$ -KO egerek aortáiban RT-PCR-rel (a). U-46619 okozta IP $_3$ -felszabadulás jelentősen csökken PLC $\epsilon$ -KO ereken (b). PLC $\epsilon$ -KO egerek aortáiban az U-46619 hatására kialakuló kontrakciós erő (zöld görbe) és  $Ca^{2+}$ -szignál (fekete görbe) lecsökken a vad típusú erekhez képest (c-f).

Kísérleteink tehát igazolják egy korábban ismeretlen jelátviteli út ( $G\alpha_{12/13}$ –RhoA–PLC $\epsilon$ ) szerepét a TP-receptorok által közvetített  $Ca^{2+}$ -szignál és vazokonstriktió kialakulásában. Úgy gondoljuk, hogy e jelátviteli út lehet a magyarázata a TXA<sub>2</sub>-okozta vazokonstriktió erősségének és tartósságának.

Mivel a szöveti véráramlás, illetve a szisztémás vérnyomás szabályozásában a kis átmérőjű artériák és arteriolák játsszák a döntő szerepet, megfigyeléseink élettani és esetleges kórélettani jelentőségének megítéléséhez szükségesnek láttuk annak vizsgálatát, hogy az újonnan leírt jelátviteli út ezekben a rezisztencia-erekben is szignifikáns mértékben járul-e hozzá a TP receptorok aktiválódását követő változásokhoz. E célból izofluránnal altatott felnőtt hím egerekben vizsgáltuk az U-46619 vérnyomásra kifejtett hatásait. A vérnyomást az arteria femoralisba vezetett kanülön keresztül mértük. Az U-46619 vad típusú C57Bl6 egerekben dózis-függő mértékű vérnyomás-emelkedést okozott, mely hatás hiányzott a TP receptorokra knock-out (TP-KO) állatokban, jelezve, hogy az U-46619 hatását kizárólag e receptorok közvetítik. Az U-46619 vérnyomást emelő hatása szignifikánsan csökkent a PLC $\epsilon$ -KO állatokban, igazolva, hogy a PLC $\epsilon$  a rezisztencia-erekben is szerepet játszik a TP receptorok aktiválása által kiváltott vazokonstriktió jelátviteli folyamataiban (5. ábra).

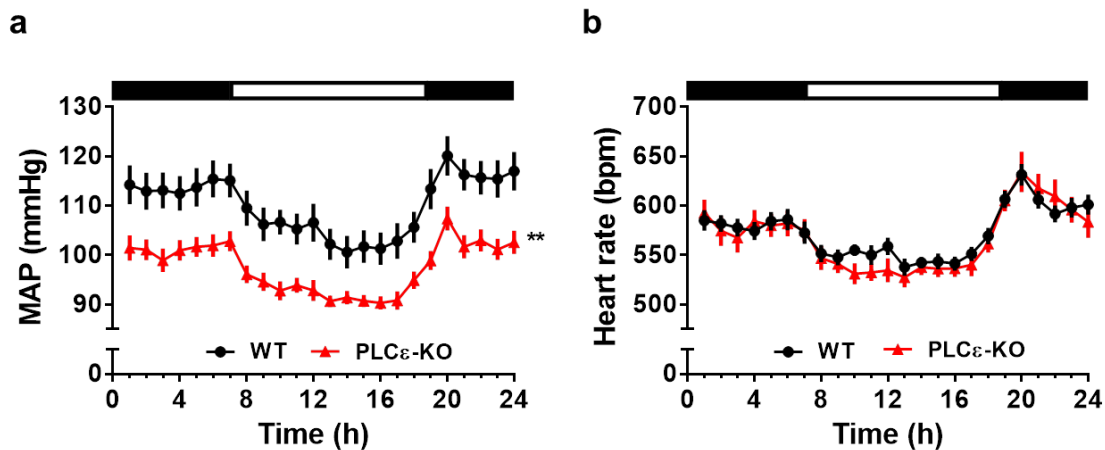


5. ábra. Izofluránnal altatott felnőtt hím egerek vérnyomásának változása. Az U-46619 (a) és az L-NAME kezelés (b) hatására kialakuló vérnyomásnövekedés is lecsökken PLC $\epsilon$ -KO egerekben.

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a TP receptorok általi PLC $\epsilon$  aktivációnak szerepe lehet-e a nitrogén-monoxid (NO) hiányos állapotokban kialakuló hipertónia patogenezisében. Hipotézisünk saját munkacsoportunk és mások korábbi megfigyelésein alapult, melyek szerint NO hiányában felerősödik a TP-receptorok által közvetített vazokonstriktió, aminek szerepe lehet a következményes hipertónia kialakulásában. E hipotézis vizsgálatára az NO szintéz

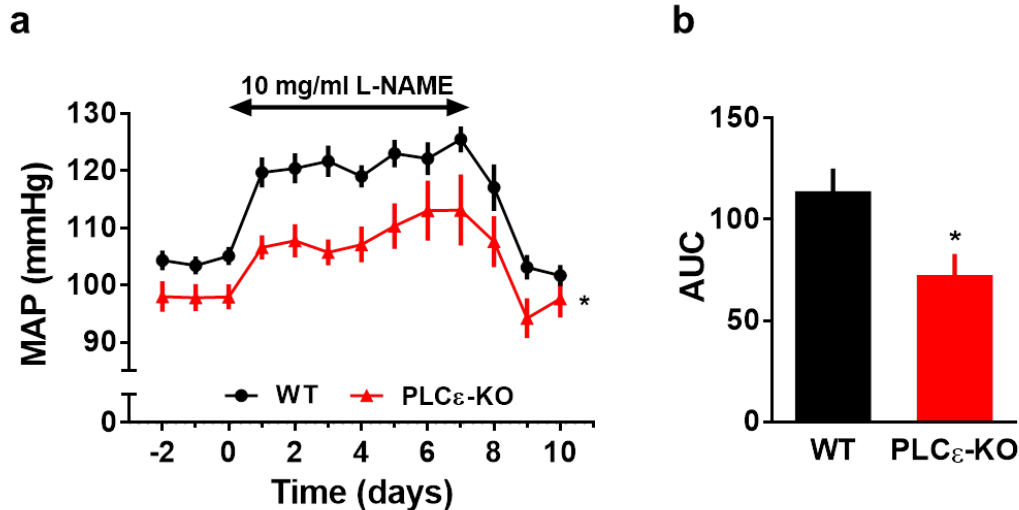
inhibitor nitro-L-arginin metil észter (L-NAME) akut adásának vérnyomásra kifejtett hatásait vizsgáltuk izofluránnal altatott, felnőtt hím vad típusú C57Bl6, valamint azonos genetikai háttérű, de TP-receptorokra vagy PLC $\epsilon$ -ra deficiens TP-KO, ill. PLC $\epsilon$ -KO egerekben. Azt tapasztaltuk, hogy az L-NAME hipertóniát okozó hatása szignifikánsan lecsökkent TP-KO egerekben, jelezve, hogy a NO hiányában kialakuló hipertónia patogenezisében részt vesz a TP-receptorok aktiválódása. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a PLC $\epsilon$ -KO egerekben is csökkent az L-NAME hatására kialakuló hipertónia, ami egyértelműen arra utal, hogy az általunk újonnan leírt jelátviteli útnak szerepe van a kialakulásában (5. ábra).

Kísérleteink következő szakaszában telemetriás módszerrel éber, szabadon mozgó állatokban is megvizsgáltuk az előbbieken leírt jelátviteli út szerepét a nyugalmi vérnyomás szabályozásában, ill. az NO hiányában kialakuló hipertenzió kialakulásában. A PLC $\epsilon$ -KO egerek artériás középnyomása a napszaki ingadozásokat megtartva átlagosan 15 Hgmm-rel alacsonyabb volt a vad típusúakhoz képest, míg szívfrekvenciájuk nem különbözött (6. ábra). Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy a PLC $\epsilon$  enzim fontos szerepet játszik a nyugalmi vérnyomás szabályozásában.



6. ábra. Telemetriás vérnyomásmérés éber, szabadon mozgó állatokban. A PLC $\epsilon$ -KO egerek artériás középnyomása alacsonyabb (a), míg szívfrekvenciájuk (b) nem különbözött a vad típusúakétól, a vérkeringési paraméterek napszaki ingadozásainak változatlansága mellett.

Az NO-szintáz gátló L-NAME kezelés hatására mindkét csoportban megemelkedett, majd a kezelés abbahagyását követően napokon belül normalizálódott az artériás középnyomás. A középnyomás emelkedésének mértéke a nyomásgörbe alatti területet kiértékelve szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PLC $\epsilon$ -KO egerekben jelezve, hogy ennek a jelátviteli mechanizmusnak szerepe van az NO-hiányos állapotban kialakuló vérnyomás-emelkedés fenntartásában (7. ábra).



7. ábra. Telemetriás vérnyomásmérés éber, szabadon mozgó állatokban. NO-szintáz gátló L-NAME kezelés hatására kevésbé növekedett az artériás középnyomás PLC $\epsilon$ -KO egerekben.

### A lizofoszfátidsav értónusra kifejtett hatásait közvetítő jelátviteli folyamatok

Az előzőekben ismertetett eredményeink az első olyan kísérleti adatok, melyek a PLC $\epsilon$  szerepére utalnak az értónus szabályozásában. Más munkacsoportok korábbi megfigyelései igazolták, hogy fibroblasztokban és asztrocitákban a PLC $\epsilon$  fontos szerepet játszik a lizofoszfátidsav (LPA) biológiai hatásainak a közvetítésében. Bár az LPA értónusra kifejtett hatásai kevésbé ismertek, néhány korábbi közleményben leírták, hogy agyi erekben konstriktiót okoz. Miután eredményeink igazolták a PLC $\epsilon$  szerepét a TP-receptorok által közvetített vazokonstriktióban, meg kívántuk vizsgálni, hogy játszik-e hasonló szerepet az LPA érhatásaiban.

Kísérleteinket izolált thoracalis aorta szegmentekben végeztük az előző pontban ismertetett metodikával. Nyugalmi értónusra adva 1-oleoyl-LPA-t, illetve az LPA<sub>1-3</sub> receptor agonista VPC31143-at, minimális vazokonstriktiót tapasztaltunk. Amikor azonban prekontrolált ereknek adtuk, mindkét vegyület jelentős vazodilatációt okozott. Amennyiben az endotheliumot mechanikusan károsítottuk, vagy eNOS-KO állatokból származó ereket vizsgáltunk, nemcsak eltűnt az LPA és VPC31143 vazodilatátor hatása, hanem helyette jelentős vazokonstriktió alakult ki. A vazokonstriktió megfigyelhető volt PLC $\epsilon$  egerekből preparált, endothel-irtott erekben is, így kizárhatjuk a PLC $\epsilon$  szerepét az LPA vazokonstriktor hatásának a közvetítésében.

Az előbbieken ismertetett eredményeink voltak az első kísérletes bizonyítékai az LPA endothelium-függő, NO által közvetített vazodilatátor hatásának, ezért fontosnak tartottuk feltérképezni annak mechanizmusát. Először a hatást közvetítő receptor azonosítása céljából megvizsgáltuk, hogy mely LPA-receptorok mRNS-e mutatható ki az egér aorta endotheliumában, és azt találtuk, hogy az LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>4</sub> és LPA<sub>5</sub> expresszálódik. Mivel



mind az LPA<sub>1,3</sub>-antagonista Ki16425 mind pedig az LPA<sub>1</sub>-antagonista AM095 gátolta az LPA-okozta vazodilatációt, ami nem változott LPA<sub>2</sub>-KO, de hiányzott LPA<sub>1</sub>-KO állatokból preparált ereken, egyértelműen beigazolódott az LPA<sub>1</sub> receptorok közvetítő szerepe.

A következő megválaszolendő kérdés az volt, hogy milyen intracelluláris jelátviteli út kapcsolja az LPA<sub>1</sub> receptorok aktivációját az NO felszabaduláshoz. Az eNOS aktivációjának két jól jellemzett jelátviteli mechanizmusa ismert, egyrészt az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése, másrészt az eNOS foszforilációja protein kináz B/Akt által, mely szignáltranszdukciós utat a PI3-kináz aktivál. Ez utóbbi jelátviteli mechanizmus szerepét kizártuk az LPA-okozta vazodilatáció közvetítésében, mivel gátlószerei (wortmannin és MK-2206) nem befolyásolták a hatást. Ezzel szemben az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást közvetítő PLC-enzimek gátlószerei (U73122, illetve edelfosine) megszüntették az LPA vazodilatátor hatását. A vazodilatáció változatlan maradt PLCε-KO egerekből származó ereken, ami ez előző eredményekkel együtt arra utal, hogy egy PLCε-től különböző PLC – valószínűleg PLCβ – közvetíti a hatást.

### **A tromboxán A<sub>2</sub> és a TP receptorok szerepe a lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatásának közvetítésében**

A projekt előző szakaszában leírtuk, hogy a lizofoszfátidsav (LPA) az LPA<sub>1</sub> receptorok közvetítésével endothelium-függő vazodilatációt okoz, ami az endoteliális NO szintáz (eNOS) (valószínűleg PLCβ jelátviteli úton történő) aktiválódása által valósul meg. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy endothelium, ill. eNOS hiányában az LPA vazokonstriktor hatású. E vazokonstriktor hatás mechanizmusát tisztázandó, először aorta simaizomban kvantitatív real-time PCR segítségével megvizsgáltuk az LPA-receptorok expresszióját és azt találtuk, hogy közülük elsősorban az LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>4</sub> és LPA<sub>6</sub> mRNS-e mutatható ki.

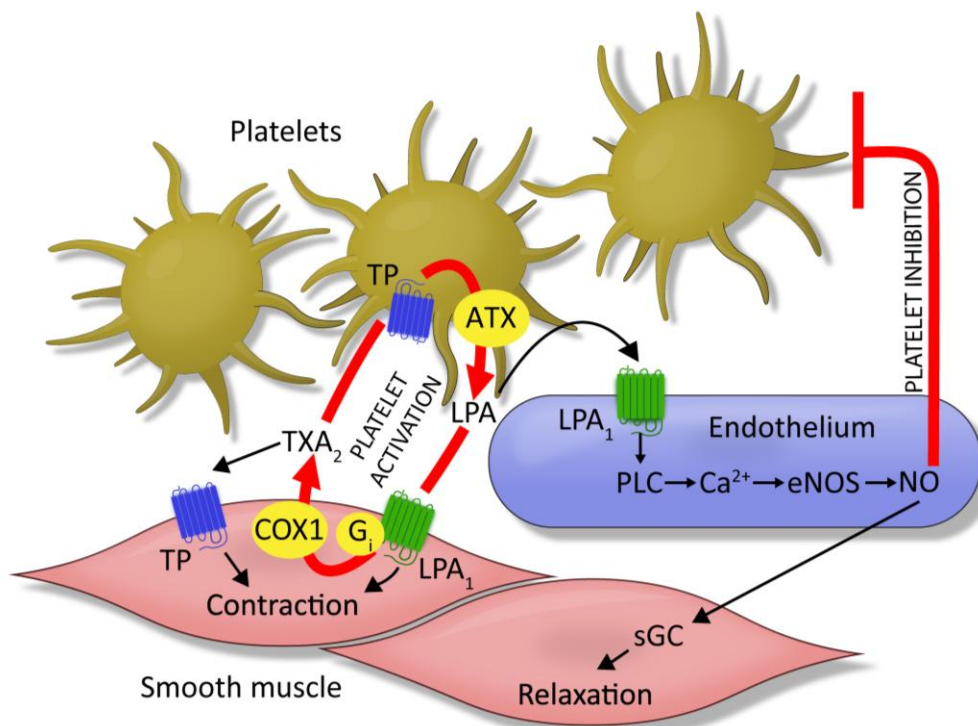
További vizsgálatainkat endothelium-mentes abdominális aorta szegmenteken végeztük. Az értónust izometriás körülmények között regisztráltuk miográfon. Azt tapasztaltuk, hogy az LPA<sub>1-3</sub> receptorokon agonista hatású VPC-31143 szintén vazokonstriktációt okozott, mégpedig az oleoyl-LPA-nál nagyobb mértékűt, ezért további kísérleteinkben e vegyületet használtuk a vazokonstriktáció kiváltására.

A VPC31143 hatását az LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>3</sub> receptorokon antagonistá Ki-16425 gátolta, míg az LPA<sub>3</sub>-szelektív gátlószer DGPP nem. További kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy LPA<sub>2</sub>-KO egerek ereiben a VPC31143 hatása változatlan marad, míg LPA<sub>1</sub>-KO erekben eltűnik. Ezután megvizsgáltuk a T13 vegyületet, ami az irodalmi adatok alapján kis dózisban (10 nM) szelektív és maximális LPA<sub>3</sub> receptor aktivációt okoz, nagyobb dózisban azonban a többi LPA receptorra is hat. A T13 kis dózisa nem okozott vazokonstriktációt, míg nagyobb koncentrációkban dóziszfüggően kontrahálta az ereket, ez a kontrakció azonban LPA<sub>1</sub>-KO erekben eltűnt. Mindezen eredmények egyértelműen igazolták az LPA<sub>1</sub> receptor kizárólagos szerepét a vazokonstriktáció közvetítésében.

Ismeretes, hogy az LPA-nak van COX1-függő hatása, valamint az is, hogy vékonybél simaizomban indomethacin gátolja az LPA konstriktor hatását, így feltételeztük, hogy a TXA<sub>2</sub>-nek szerepe lehet az LPA-mediálta vazokonstrikció kialakulásában. Ennek igazolására miográfós kísérleteinket megismételtük COX1-KO, ill. TP-KO egerektől származó aortákban, és a vazokonstrikció jelentős csökkenését tapasztaltuk. Emellett TXB<sub>2</sub>-assayvel vizsgáltuk az erekből felszabaduló tromboxán mennyiségét, és azt tapasztaltuk, hogy míg vad típusú erekben a VPC31143 hatására 2-3-szorosára fokozódik a tromboxán produkció, addig ez a hatás hiányzik LPA<sub>1</sub>-KO és COX1-KO állatok ereiben, LPA<sub>2</sub>-KO és TP-KO erekben pedig változatlan.

A tromboxán termelés ismert útvonala a pertussis-toxin (PTX) érzékeny G<sub>i</sub> fehérje- és a következményes poszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-aktiváció, ezért további kísérletekben ennek a jelátviteli útnak vizsgáltuk a szerepét. PTX hatására mind a VPC31143 mediálta vazokonstrikció, mind az aorta tromboxán termelése jelentősen lecsökkent.

Eredményeink szerint míg ép endothelium esetén az LPA LPA<sub>1</sub> receptorok aktivációján keresztül az endothelsejtekben NO felszabadulást és következményes vazorelaxációt okoz, addig endoteliális NO-szintézis hiányában az LPA<sub>1</sub> receptorok vazokonstrikciót közvetítenek. A simaizom LPA<sub>1</sub> receptorok aktivációjának eredményeképpen G<sub>i/o</sub> és COX1 függő módon fokozódik a tromboxán termelés, amely autokrin/parakrin módon kontrahálja az érfal simaizomatát (8. ábra).



8. ábra. Az LPA értónust befolyásoló hatásait közvetítő mechanizmusok összefoglalása.

Az OTKA pályázat és a belőle vásárolt műszerek segítségével lezártunk három olyan projektet, amelyek korábbi OTKA támogatásokkal indultak el. Ezek publikált eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze röviden.

### **Dinorfin A szerepe az agyi értónus szabályozásában**

Számos természetes és szintetikus opiát-receptor agonistáról ismert, hogy jelentős hatásuk van az agyi véráramlásra, azonban a dinorfinokat ebből a szempontból alig vizsgálták. Azt találtuk, hogy az agyi artériák adventitiájában kimutatható dinorfin A jelenléte, mégpedig a perivaszkuláris idegek végződéseiben. Az alkalmazott primer antitest specificitását vizsgálva igazoltuk, hogy a dinorfin A természetes fragmensei közül a dinorfin A (1-17)-tel és (1-13)-mal reagál, még az (1-8)-cal nem, mint ahogy a dinorfin B-vel sem.

Ezt követően a különböző dinorfinok értónusra kifejtett hatásait vizsgáltuk patkányokból izolált a. cerebri media (MCA) és a. basilaris (BA) szegmentekben. Mindkét érben a dinorfin A (1-17) és (1-13) rendkívül erős, a 124 mM K<sup>+</sup>-al kiváltott referencia-kontrakciót meghaladó érösszehúzódot eredményezett, még a dinorfin A (1-8) és dinorfin B ilyen hatást nem mutatott. A továbbiakban a dinorfin A (1-13) hatásait közvetítő jelátviteli folyamatokat vizsgáltuk. Mind a  $\kappa$ -opiát receptor antagonistá nor-binaltorphimin, mind pedig a  $\kappa$ -opiát receptorok G<sub>i</sub>-fehérjék általi jelátvitelét gátló pertussis toxin csökkentette a dinorfin A (1-13) kontrakciós hatását, de egyik gátlószer sem volt képes azt teljes mértékben megszüntetni. Ebből arra következtettünk, hogy a dinorfin A vazokonstriktor hatását csak részben közvetítik  $\kappa$ -opiát receptorok. E hipotézis mellett szól az a megfigyelésünk is, hogy a  $\kappa$ -opiát receptorokhoz nem kötődő dinorfin A (2-13) szignifikáns, de a dinorfin A (1-13)-nál gyengébb vazokonstriktort okozott, ami rezisztens volt nor-binaltorphiminre.

Eredményeink alapján a dinorfin A (1-13) és (1-17) rendkívül erős agyi vazokonstriktor hatásaiért kettős mechanizmus felelős: a  $\kappa$ -opiát receptor aktivációja és egy ettől független folyamat, mely valószínűleg a 9-13 aminosavak jelenlétéhez köthető. Megfigyeléseink jelentőségét fokozza az a tény, hogy a dinorfin A (1-13) egyik fő metabolitja a cerebrospinális folyadékban a dinorfin A (2-13), így mind a  $\kappa$ -opiát receptorok által közvetített, mind pedig az attól független vazokonstriktió hatással lehet az agyi vérkeringésre a dinorfin A fokozott felszabadulásával járó kórállapotokban.

### **Endocannabinoidok és a cannabinoid-1 (CB1) receptorok szerepe az agyi vérkeringés szabályozásában**

Irodalmi adatok szerint az endogén cannabinoid vegyületek – más néven endocannabinoidok – fontos szerepet töltenek be számos élettani folyamat, köztük a vérkeringési rendszer működésének szabályozásában, azonban az agyi vérkeringésre kifejtett hatásaik kevésbé ismertek és a rendelkezésünkre álló adatok több tekintetben ellentmondásosak. Az ellentmondásos megfigyelések egyik lehetséges oka, hogy a korábbi vizsgálatokban exogén úton a szervezetbe juttatott cannabinoidok hatásait vizsgálták, ezért nem zárható ki, hogy az

endogén cannabinoid-szinteknél jelentősen nagyobb dózisokat használva olyan hatásokat is leírtak, amelyek in vivo nem fordulhatnak elő. Kísérleteinkben ezért azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az endogén cannabinoidok és a CB1 receptorok szerepét az agyi vérkeringés szabályozásában nyugalmi körülmények között, valamint hypoxia és hypercapnia (H/H) során. Kísérleteinket altatott patkányokban végeztük, a CB1 receptorok farmakológiai gátlását AM-251 adásával értük el, míg az endocannabinoid rendszer aktiválódását a cannabinoidok sejtbe történő visszavételét gátló AM404 alkalmazásával szimuláltuk. Eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Nyugalmi körülmények között az endocannabinoid-rendszer, legalábbis CB1-receptorok által közvetített mechanizmussal, nem játszik fontos szerepet a szisztémás és az agykérgi vérkeringés állandóságának a fenntartásában.
2. Az endocannabinoidok szintjének emelkedése az eliminációjukért felelős enzimek gátlása révén markáns változásokat okoz a kardiorespiratorikus szervrendszerben.
3. E változások közül a vérnyomás néhány percig eltartó emelkedése alakul ki először, ami független a CB1-receptorok aktivációjától. Az a megfigyelés, hogy a vérnyomás-emelkedést kísérő agykérgi véráramlás-fokozódás csökkent CB1-antagonista jelenlétében felveti annak lehetőségét, hogy a CB1-receptorok endocannabinoidok általi aktivációja rontja az agykérgi autoreguláció hatékonyságát magas vérnyomás mellett.
4. Az endocannabinoid-rendszer aktiválódása CB1-receptorok által közvetített mechanizmussal légzésdepressziót okoz, amit az artériás vérgáz-tenziók és pH megváltozása révén az agykérgi véráramlás következményes emelkedése kísér. E hatásmechanizmust vad típusú és CB1-KO egerek pulzoximetriás vizsgálatával is megerősítettük.
5. Az endocannabinoid-rendszer aktiválódásának legkésőbb kialakuló következménye egy elhúzódó vérnyomáscsökkenés, melyet CB1-receptorok közvetítenek.
6. A CB1-receptorok aktiválódása gátló hatású a H/H során kialakuló agykérgi véráramlás-fokozódásra.

Ez utóbbi a munkánkból leszűrhető legfontosabb felismerés, mivel elsőként írtuk le az endocannabinoid-rendszer és CB1-receptorok szerepét az agyi vérkeringés H/H-hoz való alkalmazkodásának folyamatában. Mivel a CB1-receptor neuronokban és astrocytáknak fejeződik ki legnagyobb mértékben, eredményeink alátámasztani látszanak az agyi vérkeringés neuronális szabályozásának modelljét H/H során. Megfigyeléseink felvetik továbbá annak a lehetőségét, hogy az endocannabinoid-rendszer, legalábbis aktivált állapotában, CB1-receptorok által közvetített módon hatással van az agyi vérkeringés autoregulációjára.

Az agyi vérkeringéssel kapcsolatos eredményeinken túl, leírtuk az endocannabinoid-rendszer aktiválódásának a szisztémás vérkeringésre és a légzésre való hatásait, ezzel megerősítve korábbi, exogén úton alkalmazott cannabinoidokkal tett megfigyeléseket. Igazoltuk, hogy e

hatások közül a légzésdepressziót és a késői vérnyomáscsökkenést CB1-receptorok közvetítik, míg a korai átmeneti hipertenzió más mechanizmussal jön létre.

### **Az agykérgi mikrocirkuláció féloldali a.carotis communis elzáródáshoz való adaptációjának mechanizmusa**

Jól ismert az agyi vérkeringés kiváló alkalmazkodási képessége az agyat ellátó nagy extrakraniális artériák részleges vagy teljes elzáródásához, azonban az adaptáció pontos mechanizmusa még sok tekintetben tisztázatlan.

A jelenség vizsgálatára egy korábbi OTKA projektünk keretében összeállítottunk egy lézerspeckle technikán alapuló mérőrendszert és kidolgoztunk egy optimális kísérleti protokollt egerek agykérgi mikrocirkulációjának követésére. Jelen kísérleteinkben e mérőrendszert használtuk az agyi vérkeringés féloldali a. carotis elzáródáshoz való alkalmazkodási mechanizmusának, és azon belül az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) szerepének vizsgálatára. Kísérleteinket vad típusú (WT) és eNOS deficiens (eNOS-KO) hím egereken végeztük hetamin/xylazin altatásban. Legfontosabb megfigyeléseink a következők voltak:

1. A bal a. carotis communis (CCA) elzárását követően 5-10 másodperccel az azonos oldali féltekében a. cerebri media (MCA) ellátási területéhez tartozó temporális régióban 26%-os, míg az a. cerebri anterior (ACA) ellátási területéhez tartozó frontoparietális régióban 17-19% véráramlás-csökkenés alakult ki. Az ellenoldali agykéreg régiójában sem tapasztaltunk véráramlás-változást, ami azért meglepő, mert egerben mindkét félteke frontoparietális régióját a közös ACA látja el. Ez arra utal, hogy a bal frontoparietális régió véráramlás-csökkenése a piális kollaterális ereken keresztül a súlyosan iszkémiás temporális régió felé történő vérkeringési redisztribúció következménye lehet.
2. Valamennyi érintett agykérgi CCA elzárás okozta iszkémia gyorsan oldódott és a véráramlás kb. 30 másodperc elteltével a beavatkozás előtti szint közelébe állt vissza, ami az adaptációs mechanizmus(ok) hatékonyságára utal.
3. Az eNOS-KO állatokban az akut véráramlás-csökkenés mértéke nem különbözött a WT egerekben tapasztalttól, a véráramlás normalizálódása pedig még fel is gyorsult.

Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonhatók le:

1. A nagy agyalapi artériás anasztomózisok (circulus arteriosus Willisii) megléte önmagában nem elegendő a féloldali CCA elzáródás okozta agykérgi iszkémia megelőzésére, a véráramlás tranziens csökkenést követő normalizálódása cerebrovaszkuláris adaptációs mechanizmusok aktiválódását igényli.
2. Az agykérgi piális anasztomózisok szerepet játszanak a véráramlás redisztribúciójában az MCA és ACA ellátási területei között.

3. Az eNOS – meglepő módon – nem látszik fontos szerepet játszani az agykérgi mikrocirkuláció féloldali CCA elzáródásához való alkalmazkodásban.