

A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe az agyi véráramlás szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Horváth Béla András

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Benyó Zoltán egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Urbanics Rudolf, tudományos igazgató,
az orvostudományok kandidátusa
Dr. Várbíró Szabolcs, tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Juhász-Nagy Sándor egyetemi tanár,
az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Horváth Ildikó, tudományos főmunkatárs,
az MTA doktora
Dr. Karlinger Kinga, tudományos főmunkatárs,
az orvostudományok kandidátusa

Budapest
2008

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
I. BEVEZETÉS	6
I./1. ÚT A MÉREGTŐL AZ ENDOGÉN SZABÁLYOZÓ MOLEKULÁIG	6
I./2. AZ ENDOGÉN SZÉNMONOXID FORRÁSAI ÉS AZOK SZABÁLYOZÁSA	7
I./3. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID ÉS AZ L-ARGININ – NITROGÉN MONOXID SZINTÁZ – NITROGÉN MONOXID RENDSZEREK KÖZÖTTI HASONLÓSÁGOK ÉS KÖLCSÖNHATÁSOK	10
I./4. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER EGYÉB FELTÉTELEZETT BIOLÓGIAI HATÁSMECHANIZMUSAI	13
I./5. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER KRÓNIKUS VÉRNYOMÁSHATÁSAI 15	
I./6. A KÖZPONTI IDEGRENSZER SZEREPE A HEM-OXIGENÁZ KARDIOVASZKULÁRIS HATÁSAIBAN	17
I./7. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER SZEREPE AZ ÉRTÓNUS SZABÁLYOZÁSÁBAN.....	19
II. KÉRDÉSFELTEVÉS	23
III. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK	25
III./1. IN VIVO PATKÁNYKÍSÉRLETEK ELŐKÉSZÍTÉSE.....	25
III./2. LOKÁLIS SZÖVETI VÉRÁRAMLÁS MEGHATÁROZÁSA A HYPOTHALAMUSBAN H ₂ -GÁZ CLEARANCE MÓDSZERREL.....	25
III./3. AGYSZÖVETI VÉRÁRAMLÁSMÉRÉS LÉZER-DOPPLER MÓDSZERREL	27
III./4. PATKÁNYOKBÓL IZOLÁLT ARTERIA CEREBRI MEDIA SZEGMENTEK IZOMETRIÁS TENZIÓJÁNAK MÉRÉSE	27
III./5. CGMP SZINT MÉRÉSE A LIQUORBAN	28
III./6. A NITROGÉN MONOXID SZINTÁZ AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE A HYPOTHALAMUSBAN	28
III./7. ENDOGÉN SZÉNMONOXID SZINTÉZIS MÉRÉSE AGYSZÖVETBEN	29
III./8. PROSZTANOID SZINTEK MÉRÉSE A LIQUORBAN	30
III./9. KÍSÉRLETI ANYAGOK	30
III./10. STATISZTIKAI MÓDSZEREK.....	31
IV. EREDMÉNYEK	32
IV./1. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER SZEREPE A HYPOTHALAMUS NYUGALMI VÉRÁRAMLÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN	32
IV./2. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER KÖLCSÖNHATÁSA A NITROGÉN MONOXID SZINTÁZZAL A HYPOTHALAMUS VÉRÁRAMLÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN	37
IV./3. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER KÖLCSÖNHATÁSA A CIKLOOXIGENÁZ-PROSZTANOID RENDSZERREL A HYPOTHALAMUS VÉRÁRAMLÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN.....	42
IV./4. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER SZEREPE AZ AGYKÉREG VÉRÁRAMLÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN	46

V. MEGBESZÉLÉS.....	50
V./1. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER SZEREPE ÉS KÖLCSÖNHATÁSA A NITROGÉN MONOXID SZINTÁZZAL A HYPOTHALAMUS ÉS AZ AGYKÉREG NYUGALMI VÉRÁRAMLÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN.....	50
V./2. A HEM – HEM-OXIGENÁZ – SZÉNMONOXID RENDSZER KÖLCSÖNHATÁSA A CIKLOOXIGENÁZ-PROSZTANOID RENDSZERREL A HYPOTHALAMIKUS VÉRÁRAMLÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN.....	53
VI. KÖVETKEZTETÉSEK.....	57
VII. SUMMARY.....	58
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	60
IX. IRODALOMJEGYZÉK	62
X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	77
X./1. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN ÍRT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK.....	77
X./2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK	78
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	80

Rövidítések jegyzéke

Ach	acetilkolin
ACTH	adrenokortikotrop hormon
ANOVA	analysis of variance – variancianálízis
AP-1	aktivátor protein-1
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CBF	parietális agykérgi véráramlás
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CO	szénmonoxid
COX	ciklooxigenáz
CRE	cAMP responsive element
cyt	citokróm
CSF	liquor cerebrospinalis
Dahl-S	Dahl só-szenzitív
dALA	δ -aminolevulinsav
DOCA	deoxikortikoszteron acetát
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
GABA	γ -aminovajsav
GC-MS-MS	gázkromatográfia/triple-quadrupole tömegspektográfia
HBF	hypothalamikus véráramlás
HO	hem-oxigenáz
HS	magas sótartalmú (diéta)
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintáz
LD	lézer doppler
L-NAME	N^G -nitro-L-arginin metil észter
LS	alacsony sótartalmú (diéta)
MCA	arteria cerebri media
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintáz
NTS	nucleus tractus solitarius

PG	prostaglandin
SEM	standard error of mean – átlag szórása
sGC	szolubilis guanil cikláz
SHR	spontaneously hypertensive rats – spontán hipertenzív patkányok
SNP	nátrium-nitroprusszid
ZnDPBG	cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol
ZnPPIX	cink protoporfirin IX

I. Bevezetés

I./1. Út a méregtől az endogén szabályozó molekuláig

A szénmonoxid (CO) alattomos méregként él a köztudatban: színtelen, szagtalan, íztelen gáz, így jelenlétét nehéz felismerni. Ha mégis felismerjük, akkor sincs sok időnk cselekedni, mert észrevétlenül elálmósít, és cselekvésképtelenné tesz. A szénmonoxid-mérgezés gyakran társul akut füstbelégzéshez. A szöveti oxigenizációt jelentősen károsítja, mivel igen nagy hemoglobin affinitása (210-szer nagyobb az oxigénénél) csökkenti a vér oxigénszállító kapacitását, emellett balra tolja az oxigén disszociációs görbét, ami gátolja az oxigén leadását a szövetekbe. Ezenkívül erős vazodepressziót okoz, ami igen gyakran halálos kimenetelű. Kevésbé ismert, hogy hosszabb ideig tartó, alacsony szénmonoxid expozíció idegi elváltozásokat okozhat, és módosítja a kardiovaszkuláris funkciókat (Penney DG, 1988).

A legtöbb emlős fajban egy állandó 0,5-1 %-os carboxyhemoglobin-szintet találunk. Kezdetben ezt az egyre nagyobb méreteket öltő környezetszennyezés számlájára írták, de ma már tudjuk, hogy a szervezetben felszabaduló szénmonoxidnak tulajdonítható. Ez az endogén szénmonoxid elsősorban a hem metabolizmusának terméke. A legutóbbi időkig egyszerű "hulladéknak" gondolták, de ma már egyre növekvő figyelem övezi az endogén szénmonoxid biológiai hatásait.

I./2. Az endogén szénmonoxid forrásai és azok szabályozása

Az endogén szénmonoxid elsősorban a monomer szabad hemből szabadul fel a hem-oxigenáz (HO) által katalizált reakcióban. Ebben a reakcióban a hem equimoláris mennyiségű vasra, biliverdinre és szénmonoxidra bomlik (Tenhunen R és mtsai, 1969). A vas elsősorban az új hem szintézisében használandó fel, a biliverdin pedig igen gyorsan bilirubinná alakul a nagy feleslegben jelenlévő bilirubin-reduktáz által (Kutty RK és Maines MD, 1984a). A szénmonoxid végső soron a keringő hemoglobinhoz kötődik és carboxyhemoglobinként szállítódik, amíg a légzéssel el nem távozik a szervezetből.

Eddig három izoformáját azonosították a hem-oxigenáznak (Tenhunen R és mtsai, 1969; McCoubrey Jr WK és mtsai, 1997). A HO-1, vagy más néven hő-sokk fehérje 32, nehézfémek hatására és minden olyan stimulusra és ágensre indukálódik, amik oxidatív stresszt és egyéb patológias állapotokat okoznak, mint például a hő-sokk, iszkémia, glutation-depléció, sugárzás, hipoxia, hiperoxia, és sejtranszformációs állapotokban is fokozódik az expressziója. Tény, hogy jelenleg nincs még egy enzim, ami ilyen sok, különböző típusú behatásra tudna reagálni, mint a HO-1 (Maines MD, 1984). Megemelkedett aktivitásának kimutatása hasznos lehet bizonyos klinikai diagnózisok felállításában, illetve gyulladós betegségek aktivitásának követésében is (Horváth I és mtsai, 1998a; Horváth I és mtsai, 1998b). A HO-2 nem indukálható ezekkel a faktorokkal, a mai napig csak egyetlen kémiai induktorát ismerjük, a mellékvese eredetű glükokortikoidokat. Nagyon keveset tudunk a nemrég felfedezett hem-oxigenáz-3-ról (McCoubrey Jr WK és mtsai, 1997), újabb eredmények alapján úgy tűnik, hogy nincs is funkcionális HO-3 gén, a felfedezett gének csak intron nélküli pszeudogénjei a HO-2-nek (Hayashi S és mtsai, 2004).

A hem-oxigenáz expresszió szabályozása nagyon összetett, de az világos, hogy a hem-oxigenáz néhány szövetben lehetővé teszi a szénmonoxid helyi termelését. A hem-oxigenáz megnövekedett expressziója azonban nem az egyetlen eszköz a szénmonoxid és egyéb hem-oxigenáz termékek keletkezésének stimulációjára. A hem intraperitoneális adagolása igen gyorsan megnöveli a plazma bilirubin szintjét (Johnson RA és mtsai, 1996), olyan modellben ahol az enzim-indukciót kizárták. A hem-elérhetőség tehát sebesség-meghatározó lépése az endogén szénmonoxid-termelésnek.

A fiziológias, nyugalmi, szabad hem koncentráció körülbelül 0,5-1 mikromól/liter. Különösnek találták, hogy 50-szeres feleslegben adott hem a plazma bilirubin szintet és a

szénmonoxid termelést csak a 2-3-szorosára növelte (Johnson RA és mtsai, 1996). A különbség oka a hem fizikai tulajdonságaiban rejlik. Vizes fázisban, fiziológiai pH-n a szabad hem 2 mikromól/liter koncentrációig található monomer formában. E koncentráció felett dimer struktúrákat illetve polimer láncokat alkot. Ezek a formák egy potenciális "hem-raktár"-at jelentenek, és valószínűleg nem szubsztrátjai a hem-oxigenáz enzimnek (Tenhunen R és mtsai, 1969; Tenhunen R, 1972). Tehát hem adagolásával maximum 2-3-szoros szabad, monomer hem-koncentrációt tudunk elérni. Ez a hem-oxigenáz szubsztrát növekedés párhuzamos a bilirubin illetve a szénmonoxid keletkezésének növekedésével (Johnson RA, 1996).

Az endogén szénmonoxid azonban nem csak a hem lebontásából keletkezik. A hem-oxigenáz működésének kompetitív gátlása metalloporphyrinekkal a legjobb esetben is csak 30-50 %-kal csökkenti a szénmonoxid termelést (Vreman HJ és mtsai, 1991). Amíg normális esetben a hem-lebontás a szénmonoxid keletkezésének elsődleges útja, addig a hem-oxigenáz gátlásakor más, alternatív anyagcsereutak kerülnek előtérbe (Vreman HJ és mtsai, 1991). Itt elsődlegesen a zsír-anyagcsere mechanizmusaira gondolhatunk, de hangsúlyoznunk kell hogy ezek az összefüggések még alig ismertek.

A különböző szervek HO expressziója jelentősen különbözik, a legmagasabb HO aktivitást a lépben, a herékben és az agyban találták (Maines MD, 1988). A lép az egyetlen olyan szerv, ahol nyugalmi körülmények között a HO-1 az uralkodó izoforma (Braggins PE és mtsai, 1986). A felnőtt patkányok agyában a HO-2 sokkal gyakoribb izoforma, mind fehérje, mind transzkripció szintjén (Ewing JF és Maines MD, 1992; Sun Y és mtsai, 1990; Trakshel GM és mtsai, 1988; Verma A és mtsai, 1993). HO-2-t expresszálnak az előagy, a hippocampus, a középagy, a bazális ganglionok, a thalamus, a kisagy és az agytörzs neuronjai. Az mRNS- és fehérje-expresszió ezeken a területeken elég jó átfedést mutat (Ewing JF és Maines MD, 1992).

Kezdetben, amikor a HO expresszióját vizsgálták az agyban, nem sikerült sem kromatográffal, sem Western-blottal HO-1 expressziót kimutatni (Trakshel GM és mtsai, 1988); azonban a HO-1 expressziója jelentősen megnőtt a glia sejtekben és astrocytákban oxidatív stressz esetén (Dwyer BE és mtsai, 1995; Ewing JF és Maines MD, 1991; Ewing JF és Maines MD, 1992; Ewing JF és Maines MD, 1993; Ewing JF és mtsai, 1992; Maines MD és mtsai, 1993b; Matz P és mtsai, 1991; Premkumar DRD és mtsai, 1995). Patkány agyban két HO-2 mRNS (~1.3 kb és ~1.9 kb) volt megtalálható a fejlődés minden vizsgált

stádiumában (1. prenatális naptól a felnőtt állatig), és ezek szintje fokozatosan és párhuzamosan növekedett az állat fejlődésével (Maines MD és mtsai, 1996a; Sun Y és mtsai, 1990). A HO-1 ~1.8 kb mRNS-e azonban nagyon alacsony expressziót mutatott az agyfejlődés minden stádiumában (Sun Y és mtsai, 1990). A HO-2 mRNS szintek kiugró emelkedést mutatnak az agyban az élet második hetében, ami a mellékvese eredetű szteroidok megemelkedett keringő vérszintjével esik egybe. Amikor a glükokortikoidok indukálják a HO-2-t, a megnövekedett expresszió kizárólag a neuronokra korlátozódik és a glia nem érintett (Maines MD és mtsai, 1996a; Weber CM és mtsai, 1994).

A hypothalamusban kiemelkedően magas a HO expresszió, a ventromediális magvakban mind a HO-1, mind a HO-2 expressziója kiemelkedő, a paraventriculáris magvakban a HO-1, míg a supraopticus magvakban a HO-2 expressziója dominál (Ewing JF és mtsai, 1992; Weber CM és mtsai, 1994; Ewing JF és Maines MD, 1992). Az agykéregben a HO-2 a predomináns forma, azonban HO-1 expressziót is sikerült kimutatni RT-PCR segítségével, ez utóbbi az astrocytákban mutatott magasabb expressziót (Scapagnini G és mtsai, 2002).

A HO-1 és HO-2 expresszióját kiterjedten vizsgálták a vesében, a szívben és az érhálózatban élettani körülmények között és vizsgálták az oxidatív stresszre bekövetkező változásokat is. A kardiovaszkuláris rendszerben a HO-2 a predomináns forma nyugalmi körülmények között (Maines MD és mtsai, 1993b; Ewing JF és mtsai, 1994; Raju VS és mtsai, 1996). A HO-2 fehérje mind az endotélben, mind az erek simaizomrétegében konstitutíven expresszálódik (Ewing JF és mtsai, 1994; Zakhary R és mtsai, 1996), megtalálható a carotis kemoreceptorokban és az erek adventitiájában elhelyezkedő neuronokban is (Zakhary R és mtsai, 1996). Stresszhelyzetek esetén azonban egy jelentős növekedést figyelhetünk meg a szív, a vese és az érhálózat HO-1 mRNS expressziójában (Maines MD és mtsai, 1993; Ewing JF és mtsai, 1994; Raju VS és mtsai, 1996). HO-2 expressziót azonban nemcsak az érfal elemeiben (artériás és vénás endotél, simaizom), hanem a kötőszövetben (fibrocita, fibroblaszt, fibroblaszt-szerű sejtek), a zsigeri simaizomsejtekben (légúti simaizom, myometrium és a vékonybél muscularis mucosája), valamint a serosus membránok mesotél sejtjeiben és bizonyos epitélsejtekben is ki lehet mutatni (Grozdanovic Z és Grossrau R, 1996).

I./3. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid és az L-arginin – nitrogén monoxid szintáz – nitrogén monoxid rendszerek közötti hasonlóságok és kölcsönhatások

A szénmonoxid (CO) aktiválja a tisztított szolubilis guanil-cikláz (sGC), aktivitását megkétszerezi, meghatszorozza in vitro (Brune B és Ullrich V, 1987; Burstyn JN és mtsai, 1995; Friebe A és mtsai, 1996; Makino R és mtsai, 1999; Stone JR és Marletta MA, 1994; Vogel KM és mtsai, 1999). Ez relatív szerény aktivitás-fokozódás, ha összehasonlítjuk a nitrogén monoxid (NO) százszor nagyobb hatásával, azonban ez nem zárja ki lehetséges élettani szerepét (Marks GS és mtsai, 1991; és Schmidt HH, 1992). Elképzelhető, hogy a szénmonoxid nem direkt módon aktiválja a szolubilis guanil-cikláz, ugyanis felfedezték, hogy a szénmonoxid hatását drámaian megnöveli egy xenobiotikum a 3-(5'-hidroximetil-2'-furyl)-1-benzilindazol (YC-1) (Friebe A és mtsai, 1996; Stone JR és Marletta MA, 1998). A YC-1 és a szénmonoxid együttesen megközelítőleg olyan mértékben aktiválják a szolubilis guanil-cikláz, mint a nitrogén monoxid. Lehetséges tehát, hogy létezik egy endogén anyag, ami felerősíti a szénmonoxid szolubilis guanil-cikláz aktiváló hatását.

Sokan úgy vélték a szénmonoxid élettani hatásai megegyeznek a nitrogén monoxidéval. Valóban sok a hasonlóság közöttük: mindkét vegyület alacsony molekulatömegű gáz, aktiválják a szolubilis guanil-cikláz, és a katalitikus formájuk NADPH-dependens (Tenhunen R és mtsai, 1969; Moncada S és Higgs EA, 1995). Azonban a nitrogén monoxidot és szénmonoxidot termelő rendszerek sok különbséget is mutatnak. Míg a nitrogén monoxid nagyon labilis, a biológiai féléletideje másodpercekben mérhető (Moncada S és Higgs EA, 1995), addig a szénmonoxid egy szokatlanul stabil, nehezen átalakítható molekula (Penney DG, 1988). Ahogy korábban említettem a nitrogén monoxid egy igen erős aktivátora a szolubilis guanil-cikláz, míg a szénmonoxid hatása sokkal gyengébb. A hem-oxigenáz konstitutív izoformája szintén jelen van az agyszövetben és az endotélben (Moncada S és Higgs EA, 1995), azonban szemben a nitrogén monoxid-szintáz (NOS)- gazdagon jelen van a simaizomban is (Cristodoulides N és mtsai, 1995).

Jelentős kölcsönhatásokat tudtak kimutatni a két rendszer között. A HO-1 indukciója számos módon befolyásolja a nitrogén monoxid keletkezését.

1. Mivel a NOS egy hemoprotein (White KA és Marletta MA, 1992), a megnövekedett HO aktivitás meggyorsítja az újonnan keletkezett hem degradációját, befolyásolva így a NOS de novo szintézisét; a NOS aktív helye ugyanis két hem molekulát tartalmaz (Xie Q-W és mtsai, 1996).

2. Mivel a NOS egy citokrómP450 (cytP450) típusú hemoprotein, és a citokrómP450 hemoproteinek intakt és denaturált formája is szubsztrátja mind a HO-1, mind a HO-2-nek (Kutty RK és Maines MD, 1984b), a megnövekedett HO aktivitás felgyorsíthatja a NOS turnoverét. A cytP450 koncentráció és a hem-oxigenáz aktivitás fordított arányosságban állnak; minden stimulus ami növeli a HO-aktivitását, magával vonja a cytP450 szint következményes csökkenését (Maines MD, 1984).
3. A hem-oxigenáz termelte szénmonoxid kötődhet a jelenlévő NOS-hoz és inaktíválhatja azt; mind a neuronális, mind a makrofágokban megtalálható indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) forma mutatja ezt a kölcsönhatást (McMillan K és mtsai, 1992; White KA és Marletta MA, 1992).
4. A hem lebontása során felszabaduló vas gátolhatja a NOS keletkezését, a magban folyó transzkripció gátlásán keresztül (Weiss G és mtsai, 1994).
5. Mind a HO-rendszer, mind a NOS izoenzimek NADPH kofaktort használnak. Ha a HO-izoenzimek szintje jóval magasabb a NOS szintjénél, akkor ez a faktor inkább az oxigenáz-rendszert választja. Mivel a biliverdin redukciója bilirubinná a biliverdin-reduktáz katalizálta reakcióban is NADPH-dependens (Kutty RK és Maines MD, 1981; Maines MD és mtsai, 1996b), és ennek az enzimnek nagyon gyors a reakció-kinetikája, ezért az elektronok még inkább a hem-bontó rendszert favorizálják.

A kölcsönhatás ellentétes irányban is működik, azaz az NO is befolyásolja a CO képződés. Az endotoxinok és a gyulladásozó citokinek például nem közvetlenül indukálják a HO-1-et, hanem nitrogén monoxid keletkezésén keresztül, ugyanis hatásuk gátolható volt NOS-inhibitorokkal, például N-monometil-L-argininnel (Billiar TR és mtsai, 1992). Más kísérletekben a HO-1 aktiválását és mRNS expresszióját indukálni tudták NO-donorokkal, úgy mint nátrium-nitroprusszid (SNP) (Takahashi K és mtsai, 1996), S-nitroso-N-acetilpenicillinamin (Motterlini R és mtsai, 1996a), vagy 3-morpholinosydnonimin (Motterlini R és mtsai, 1996b) aorta endotélsejtekben (Motterlini R és mtsai, 1996a), simaizomsejtekben (Durante W és mtsai, 1997), és patkány hepatocytákban (Kim YM és mtsai, 1995).

Patkány hepatocytákban tanulmányozták behatóan a NO-CO kölcsönhatás részleteit (Immenschuh S és mtsai, 1998). Úgy találták, hogy mind az NO-donor SNP, mind a 8-Br-

cGMP indukálni tudják a HO-1-et. A HO-indukció kivédhető volt a specifikus protein kináz G inhibitor KT 5823-mal. A cGMP-dependens HO-1 indukció dózisfüggő, és transzkripció szintjén szabályozott volt. A cGMP okozta növekedést megakadályozta a cAMP (ciklikus adenzin-monofoszfát) response elem / aktivátor protein-1 (CRE/AP-1) (-665/-654) hely mutációja vagy delécioja. Tehát a cGMP mediált HO-1 indukció valószínűleg protein kináz G-n keresztül történik, ami főleg a CRE/AP-1 elemen keresztül közvetítődik a patkány HO-1 promoterén.

A nitrogén monoxid - szénmonoxid kölcsönhatást vizsgálták kisagyi granuláris sejt-tenyészetben is (Ingi T és mtsai, 1996). Hem-oxigenáz gátlóval (cink protoporfirin IX (ZnPPIX)) a szénmonoxid termelést csökkenteni tudták, míg az N^G-nitro-L-arginin metil észternek (L-NAME) nem volt szignifikáns hatása. A nitrogén monoxid-szintáz működésének szabályozását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a hem-oxigenáz inhibitorok közül a ZnPPIX gyengén csökkentette az enzimaktivitást, azonban sem cink deuteroporfirin IX 2,4-bisz glikol (ZnDPBG), sem szénmonoxid adagolása nem befolyásolta aktivitását. A ciklikus GMP felszabadulást a ZnPPIX illetve ZnDPBG emelte, míg L-NAME illetve L-NAME és ZnPPIX együttesen csökkentette szintjét. Exogén szénmonoxid adása a második napon növelte a cGMP szintet. A hetedik napon azonban dózisfüggő hatást mutatott, azaz a 1,5-5 mikromólos tartományban csökkentette, a 150-500 mikromólos tartományban növelte a cGMP szintet. Ezt a sejtek érésével növekvő NOS aktivitásnak tulajdonították. Ezt bizonyítandó NO-donort, nátrium-nitroprusszidot adagoltak. Ebben az esetben hasonló dózisfüggő görbét kaptak. Tehát azt találták, hogy fiziológiás tartományban a szénmonoxid feltehetően gátolja a NOS aktivitást, és csökkenti a cGMP szintet. Azonban a magas koncentrációkban talált cGMP-növelő hatás megkérdőjelezi az egyszerű kompetitív antagonistá modellt létjogosultságát. Lehetséges, hogy a szénmonoxid egy konformációs változást indukál a guanil-ciklázon, esetleg allostérikus hatása van.

A fenti kísérletben azt láttuk, hogy a L-NAME nem csökkentette a szénmonoxid termelést. Ennek némileg ellentmondani látszik az a kísérlet, melyben hem-oxigenáz indukciót vizsgáltak NO-donorok adagolásával (Takahashi és mtsai, 1996). Azt találták, hogy a nátrium-nitroprusszid indukálja a HO-1 mRNS-ének termelését. Azonban ennek és az ehhez hasonló kísérleteknek az értékeléséhez tudnunk kell, hogy a hem-oxigenáz igen könnyen indukálódik, így ezekkel az eredményekkel óvatosan kell bánjunk.

I./4. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer egyéb feltételezett biológiai hatásmechanizmusai

A szénmonoxid, a nitrogén monoxiddal együtt részt vesz a fizikális-emocionális stresszre adott *adrenokortikotrop hormon (ACTH)* válaszban is (Turnbull AV és mtsai, 1998). L-NAME hatására a jelentős vérnyomás válasz mellett az ACTH válasz jelentős csökkenését találták. A hem-oxigenáz inhibitorok közül az ólom mezoporfirin enyhe vérnyomás válasz mellett majdnem hasonló nagyságú ACTH felszabadulás csökkenést okozott, míg ólom protoporfirin a vérnyomás-válasz elmaradása mellett hasonló ACTH szupresszor hatást indukált.

A hem tartalmú fehérjék megkötik a szénmonoxidot (White KA és Marletta MA, 1992). Ezek a fehérjék gyakran rendelkeznek enzimatiságokkal és a szénmonoxid kötés megváltoztathatja aktivitásukat (Raff H és Jankowski B, 1994; Schmidt HH, 1992; Wada A és mtsai, 1985; White KA és Marletta MA, 1992). Ebből következően a hem-proteinek potenciális hírvivő molekulái a szénmonoxidnak.

A citokróm P450 család egy másik csoportját képviseli azon enzimeknek, melyek potenciális mediátorai a szénmonoxid hatásának (White KA és Marletta MA, 1992). Ezen enzimek szénmonoxid kötése emelkedik megnövekedett metabolikus szükséglet esetén és csökkent oxigéntenziós környezetben. A mitokondrium membrán ezen, az elektrontranszportban, és az ATP előállításában résztvevő citokrómjai vezethetnek egy összetett hatáshoz a kinázok működésében és más ATP-függő folyamatokban.

A prosztaglandin G/H (PGH) szintáz is szerepet játszhat a szénmonoxid élettani és kórélettani hatásában (Gaspard S és mtsai, 1996). A hem-oxigenáz egyik szubsztrátját, hemint adagolva mérték a hypothalamus PGE₂ felszabadulást (Mancuso C és mtsai, 1997). A szubsztrát hatására nőtt a PGE₂ termelés, ami hem-oxigenáz inhibitorokkal (ZnPPIX és SnMPIX) kivédhetőnek bizonyult, sőt a hem-oxigenáz inhibitor a PGE₂ nyugalmi termelését is gátolta. A ZnPPIX azonban nem inhibitora a PGH szintáznak, hiszen nem befolyásolta a TXB₂-felszabadulást. Tehát megállapíthatjuk, hogy a ZnPPIX-nek a HO-on hatva másodlagos hatása van a PGE₂ felszabadulásra a hypothalamusban, s ilyen módon a szénmonoxid alapvető szerepet játszhat a hypothalamus PGE₂ termelésében, és ezáltal részt vehet a testhőmérséklet, az étvágy és az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásában is.

Újszülött malacokon végeztek kísérleteket a szénmonoxid piális értónusban játszott szerepének feltérképezésére (Leffler CW és mtsai, 1999). A szénmonoxid dilatáló funkciójáért *a kalcium-függő K⁺-csatornákat* tartották felelősnek, és érdekes módon a CSF-ben *cAMP* növekedést találtak, míg a cGMP szint nem változott. Ez a kísérlet két új potenciális hírvivő mechanizmussal gazdagította a szénmonoxidról kialakított képünket.

A kataláz (Hu S és Kincaid JR, 1992) és *a nátrium csatornák* (Wang R és mtsai, 1997) is lehetséges célpontjai a szénmonoxidnak. Ráadásul a *ciklooxygenáz-2-nek* is felismerték hem-kötő szerepét (Percival MD és mtsai, 1994), ami szintén közvetítheti a szénmonoxid biológiai hatásait. Mindezek jelentősége a szénmonoxid élettani és kórélettani hatásaiban még nem tisztázott.

I./5. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer krónikus vérnyomáshatásai

Krónikusan hem-adagolással indukálható a hem-oxigenáz, és lelassítható a hipertenzió kialakulása spontán hipertenzív patkányokban (spontaneously hypertensive rats, SHR) (Sacerdoti D és mtsai, 1989). Krónikus hipertenzív és normotenzív állatokon akután is vizsgálták a szénmonoxid vérnyomáshatását. Hem-preparátumokat alkalmaztak (hem L-lisínát), amelyek hem-oxigenáz által közvetített szénmonoxid termelést eredményeztek és csökkentették a vérnyomást SHR és deoxikortikoszteron acetát-sóval (DOCA-só) kezelt hipertóniás patkánymodellekben, valamint olyan patkányokban, akiket akután hipertenzívvé tettek fenilefrin infúzióval (Johnson RA és mtsai, 1996). Ezek a hem-indukált vérnyomáscsökkenések kivédhetőek voltak hem-oxigenáz inhibitorok előzetes adásával. E megfigyelések alapján a hem vazodepresszív hatása egy hem-oxigenáz termék keletkezéséhez kapcsolódna.

A hem-oxigenáz mediált hem degradációnak három terméke van: a vas, a biliverdin, és a szénmonoxid (Tenhunen R és mtsai, 1969). Vas kelátképzők nem védték ki a hem-indukált vazodepressziót SHR-ekben (Johnson RA és mtsai, 1996), és a biliverdin sem mutatott akut vazodepresszor hatást sem normotenzív, sem hipertenzív modelleken (Johnson RA és mtsai, 1995; Johnson RA és mtsai, 1996), intraperitoneálisan alkalmazott szénmonoxid injekció azonban meggyőzően csökkentette hipertóniát (Johnson RA és mtsai, 1996). Tehát nagyon valószínű, hogy a hem-indukált vazodepresszió a felszabaduló szénmonoxid hatása. Az a tény pedig, hogy a szénmonoxid az akut hipertenziót is képes mérsékelni, azt mutatja, hogy hatásához nem szükséges a krónikus hipertenzió háttere.

Egyes tanulmányok krónikus modellekben (Levere RD és mtsai, 1990; Martasek P és mtsai, 1991) a vérnyomáscsökkenést a megfigyelt cytP450 enzimek depléciójának tulajdonították. Azonban az, hogy akut kísérletekben 30 percen belül is csökkent a vérnyomás, azt valószínűsíti, hogy önmagában a szénmonoxid is vérnyomáscsökkentő hatású hipertenzióban. Úgy tűnik, hogy hipertenzív kísérleti állatok megváltozott érzékenységet mutatnak a hem vazodepressziós hatására. Plazma bilirubin-szintjükben nem különböznek a normotenzív állattól, továbbá a hipertenzióban hatásos adag hem hatására mindkét modellben azonos, 2-3-szoros bilirubin-szint emelkedést figyelhetünk meg. A hipertenzív modellek mind akután, mind krónikusan érzékenyebbek az exogén alkalmazott szénmonoxid vazodepresszor hatásaira, mint normotenzív társaik. Továbbá az eredmények arra mutatnak,

hogy ezek a normotenzív és hipertenzív kísérleti modellek nem mutatnak különbséget a hem-oxigenáz termékek előállításában, ideértve a szénmonoxidot is, inkább úgy tűnik, hogy az SHR és valószínűleg más hipertenzív állatok is, sokkal érzékenyebbek lehetnek a szénmonoxid vazodepresszív hatásaira.

A hem-oxigenáz hipertenzióban játszott szerepét megerősítették Dahl só-szenzitív patkány modellben is (Dahl salt-sensitive, Dahl-S). Azonban ebben a modellben, az előzőekkel ellentétben, emelkedett HO-1 fehérje tartalmat találtak az abdominális aortában és emelkedett szénmonoxid termelést a magas sótartalmú diétával kezelt (HS), hipertenzív állatokban az alacsony sótartalmú diétával kezelt (LS) nem hipertenzív állatokhoz képest (Johnson FK és mtsai, 2003). A HS állatokból izolált erek csökkent választ mutattak L-NAME és acetilkolin (Ach) adagolására az LS állatokhoz képest, és ezt a különbséget az endogén szénmonoxid gátlásával meg lehetett szüntetni. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a megnövekedett endogén szénmonoxid szint hozzájárul a Dahl-S patkányok só-indukálta hipertenziójához az artériás NO termelés termelés diszfunkciójával. Felismerték továbbá, hogy a HO-1 indukciója nem pusztán a hipertenzió eredménye, hiszen amíg DOCA-sóval hipertenzívvé tett állatokban megemelkedett a HO-1 expresszió és az endogén szénmonoxid termelés, addig SHR patkányokban nem, és csak a DOCA-sóval kezelt csoportban volt endoteliális diszfunkció, ami az endogén szénmonoxid termelés gátlásával visszafordíthatónak bizonyult (Johnson FK és mtsai, 2004). Továbbá, a korábbi megállapításokkal összhangban, az áramlás indukálta vazodilatáció megszűnt a HS diétán tartott Dahl-S állatokban, ami azonban visszaállítható volt a HO gátlószerével. Exogén szénmonoxid adagolása megakadályozta a HO gátlás ezen hatását, továbbá a HO gátlás csökkentette a HS diétán elő állatok vérnyomását, de nem befolyásolta a LS diétán élőkét (Teran FJ és mtsai, 2005). Összefoglalva elmondható, hogy a HO termelte CO felelős az endoteliális diszfunkcióért és hozzájárul a Dahl-S patkányok hipertenziójához.

Az utóbbi időben fedezték fel, hogy patkány diabétesz modellben (Zucker patkányok) is megnövekedett CO termelés figyelhető meg, és ezt felelősnek találták a vérnyomás emelkedésért és a diabéteszben fellépő endoteliális diszfunkcióért (Johnson FK és mtsai, 2006).

I./6. A központi idegrendszer szerepe a hem-oxigenáz kardiovaszkuláris hatásaiban

A hem-oxigenázt és ennek aktivitását kimutatták az agyban (Johnson RA és mtsai, 1995; Verma A és mtsai, 1993; Zakhary R és mtsai, 1996), de eloszlása nem egyenletes (Verma A és mtsai, 1993). Amíg néhány metalloporfirin, úgy mint a ZnDPBG átjut a vér-agy gáton (Johnson RA és mtsai, 1995; Vreman HJ és mtsai, 1991) és képes gátolni a hem-oxigenáz működését az agyban, addig a hem nem jut át a vér-agy gáton (Lindén IB és mtsai, 1987). Azonban a δ -aminolevulinsav-szintáz (dALA-szintáz), az új hem keletkezésében sebesség-meghatározó enzim, és a többi hem-szintézisben szereplő enzim kimutatható volt az agyszövetben. Az a felfedezés, hogy az agy elhatárolt a keringő hem hatásától, de lokálisan rendelkezik a hem szintéziséhez szükséges metabolikus utakkal, arra utal, hogy a központi idegrendszer egy önálló hem-oxigenáz funkcionális egység.

A ZnDPBG intraperitoneális alkalmazása képes gátolni a hem-oxigenáz aktivitást mind a periférián, mind az agyban (Vreman HJ és mtsai, 1991), és vérnyomás-emelkedést okoz éber patkány modellben, párhuzamosan a teljes perifériás érellenállás növekedésével (Johnson RA és mtsai, 1995). Ez a presszor válasz kivédhető α_1 -adrenerg receptor blokkolókkal, vagy a ganglionfunkció farmakológiai blokádjával, de kétoldali sinus aorticus blokáddal nem. Ezek a tények arra utalnak, hogy a ZnDPBG-indukált vérnyomás-emelkedés magában foglal egy hem-oxigenázhoz kapcsolt reakciót az agyban (Johnson RA és mtsai, 1995; Johnson RA és mtsai, 1997).

A nucleus tractus solitarius (NTS) a kardiovaszkuláris, és respiratorikus afferens rostok végállomása a nyúltvelőben, kulcsfontosságú struktúrája a glutamaterg kardiovaszkuláris afferentációnak és integráló régiója a baroreceptor és a kemoreceptor válasznak (Colombari E és mtsai, 1994). A hem-oxigenáz szisztémás gátlása gyengíti a nyomás-bradycardia kapcsolatot, amely az NTS-en keresztül modulálódik (Johnson RA és mtsai, 1997). Hem-oxigenáz inhibitorok képesek glutamaterg depolarizációt létrehozni izolált NTS preparátumon (Glaum SR és Miller RJ, 1993). Mindezekből úgy tűnik, hogy az NTS szerepet játszik a ZnDPBG által indukált presszor válaszban.

Ezt a feltételezést támogatja az a megfigyelés, hogy ZnDPBG mikroinjekciója az NTS-be képes növelni a vérnyomást és ez a hatás szénmonoxid mikroinjekcióval megfordítható (Johnson RA és mtsai, 1997). Ugyancsak NTS-be adott szénmonoxid

mikroinjekcióval a szisztémásan adagolt ZnDPBG vérnyomásemelő hatása visszafordíthatónak bizonyult (Johnson RA és mtsai, 1997). Úgy látszik tehát, hogy az a hem-oxigenáz termék, ami az NTS-ben keletkezik, vazodepresszor hatást gyakorol, és minden valószínűség szerint ez a termék a szénmonoxid.

Az L-glutamát, mint neurotranszmitter szerepet játszik az baroreflexben. A hem-oxigenáz inhibitorok NTS mikroinjekciója csökkenti az L-glutamát mikroinjekcióra adott presszor választ (Colombari E és mtsai, 1998), és csökkenti a szívfrekvencia változásának mértékét is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy jelentős kölcsönhatás létezik az NTS-ben a hem metabolizmus és a glutamáterg transzmisszió között. Az még azonban nem világos, hogy ezek a glutamáterg hatások kizárólag csak a szénmonoxid termelésén keresztül érvényesülnek-e.

Amíg ezek a tények támogatják a hem-oxigenáz által termelt szénmonoxid neuromodulátor szerepét, addig igen körültekintően kell eljárunk, amikor a metalloporfirinek központi idegrendszeri hatásait vizsgáljuk. A porfirin szintézisben a dALA keletkezése enzimatikusan szabályozott és a hem szintézisének sebesség-meghatározó lépése. A szabad hem koncentráció negatív feed-backként működik a dALA-szintáz enzimen. Ez a mechanizmus tartja fenn a szöveti hem szintet. A dALA, szerkezetileg rokon a gamma-aminovajsavval (GABA). Ezen kívül a hem önmagában is affinitást mutat a benzodiazepin receptorok iránt (Woods MJ és Williams DC, 1996). Elfogadott tény, hogy a GABA és a benzodiazepin receptorok együttműködve fontos szerepet játszanak a vérnyomás központi szabályozásában. Amíg a dALA hatása a GABA receptorokon, és a hem hatása a benzodiazepin receptorokon nem teljesen tisztázott, addig minden beavatkozásnál, ami növeli a hem elérhetőségét, számolnunk kell a benzodiazepin- és GABA-függő funkciók megváltozásával a központi idegrendszerben.

Azon akut állatkísérleteket, ahol szisztémásan alkalmazzuk a hemet, kevésbé komplikálják a központi idegrendszeri reakciók, mert a hem nem jut át a vér-agy gáton (Lindén IB és mtsai, 1987). Ugyanakkor bizonyos hem-oxigenáz inhibitorok (Johnson RA és mtsai, 1995) és a szénmonoxid átjut a vér-agy gáton (Penney DG, 1988) és potenciálisan kifejthetik vérnyomás-hatásukat az NTS-en vagy más központi struktúrán.

I./7. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe az értónus szabályozásában

A legkiterjedtebben a szénmonoxid értónusra való hatását vizsgálták. Azt találták, hogy a szénmonoxid képes relaxálni a simaizom-preparátumokat (Graser T és mtsai, 1990), ugyanakkor megfigyelték, hogy a szénmonoxid kötődni tud a nitrogén monoxid-szintázhoz és gátolja a nitrogén monoxid termelését (Klatt P és mtsai, 1992; Matsuoka A és mtsai, 1994; McMillan K és Masters BSS, 1995; Pufahl RA és Marletta MA, 1993; White KA és Marletta MA, 1992), így vazokonstriktiót is okozhat.

Stratégiai kérdés elkülöníteni az endogén szénmonoxid endotél-függő szerepeit az endotél-független hatásoktól. Perfundált patkány gracilis arteriolákon az endotél eltávolítása után a hem vazodilatációt váltott ki, ami hem-oxigenáz inhibitorokkal visszafordíthatónak bizonyult (Kozma F és mtsai, 1998). A megfigyelésekből az a következtetés vonható le, hogy egy hem-oxigenáz termék, vélhetőleg a szénmonoxid, endotél-független vazodilatációt képes előidézni ezekben a rezisztencia erekben, tehát vazodilatátor hatása független az endotél-eredetű relaxáló faktoroktól. Mivel feltételezhető volt, hogy a szénmonoxid endotél-függő vazokonstriktor hatását a gracilis arteriolákon a nitrogén monoxid-szintáz aktivitás gátlása okozta, tovább vizsgálták ezt a kölcsönhatást.

Intakt endotéliumú erekben N^G -nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME) maximálisan gátolták a nitrogén monoxid szintézist, és azt találták, hogy a hem vazodilatációt okoz, ami visszafordítható volt hem-oxigenáz gátlókkal (Kozma F és mtsai, 1997; Kozma F és mtsai 1998; White KA és Marletta MA, 1992). A hem-oxigenáz gátlók önmagukban vazokonstriktiót okoztak (Kozma F és mtsai, 1998). Tehát a nitrogén monoxid-szintáz blokádnak előtérbe hozta a szénmonoxid vazodilatátor hatását, még endotél jelenlétében is. Eszerint a simaizomban termelődő szénmonoxid lokális hatása vazodilatáció. Ezt a dilatátor hatást ellensúlyozza az endotélium-függő nitrogén monoxid által közvetített vazodilatáció gátlása.

Ezt az elképzelést újabb tanulmányok is megerősítették. Exogén szénmonoxid vagy a hem prekursor δ -aminolevulinsav (dALA) az izolált arteriolák konstriktóját váltotta ki intakt endothelium jelenlétében, az endotél eltávolítása azonban megszüntette ezt a hatást (Johnson FK és Johnson RA, 2003). Ha az endotéliumot megtartották, és az ereket előkezelték a NOS gátló L-NAME-mel, vagy az NO donor SNP-vel, vagy a két szer kombinációjával, a szénmonoxid illetve a dALA által kiváltott vazokonstriktor válasz vazodilatációvá módosult. A szénmonoxid-indukálta vazokonstriktio szintén megelőzhető volt a NOS szubsztrát, L-arginin adagolásával (Johnson FK és Johnson RA, 2003).

Az NO és a szénmonoxid, mint egy adott szervben egymás mellett működő és egymást kiegészítő rendszer modelljét igazolták hepaticus ereken végzett kísérletekkel (Pannen BH és Bauer M, 1998). Azt találták, hogy az arteria hepaticában L-NAME-mel a nyugalmi vazodilatátor tónus gátolható volt, míg a hem-oxigenáz inhibitorok teljesen hatástalanok voltak. Ezzel szemben a vena hepaticában az L-NAME volt hatástalan, és a hem-oxigenáz inhibitorok vazokonstriktiót okoztak. Tehát a nyugalmi áramlás fenntartásában az a. hepaticában a nitrogén monoxid játszik szerepet, míg a v. hepaticában a szénmonoxid. Ez annak a ténynek is köszönhető, hogy a májból kiáramló szénmonoxid koncentráció a NO-énak a húszszorosa. Az endogén szénmonoxid fő termelői a májban a sinusoid körüli parenchymasejtek. Tehát a szénmonoxid csökkenti a portális vénák nyomását, ilyen módon csökkenti a máj vérraktárát (pool), és oedema-védőfaktoroként is jelentős szerepet játszhat.

Az endotoxin sokk életveszélyes szövődménye néhány Gram-negatív infekciónak, jellegzetes simaizomsejt-relaxációval, és súlyos hipotenzióval. Az iNOS jelentős szerepet játszik ebben a kórképben (MacMicking JD és mtsai, 1995; Wei XQ és mtsai, 1995). A hem-oxigenáz szerepét is kimutatták az endotoxin sokk patomechanizmusában (Yet SF és mtsai, 1997). A HO-1 mRNS szint drámaian megnőtt az endotoxinnal kezelt patkányokból izolált aorta simaizomsejt tenyészetében, és ez a megnövekedett érfali HO-1 válasz majdnem kilencszeres HO aktivitással járt együtt in vivo. Mind a nagy (aorta), mind a

kisebb (arteriola) erek simaizomzatában jelen volt ez a megnövekedett HO-aktivitás, továbbá a HO-blokád kivédte az endotoxinra adott hipotenziós választ. Simaizomsejtekben az emelkedett HO-1 mRNS mennyiség a gén-transzkripció szintjén szabályozott, és az indukció független az NO termeléstől. Összefoglalva ezek a tanulmányok azt mutatják, hogy a HO-1 indukciónak és a következményes szénmonoxid termelésnek jelentős szerepe van a csökkent értónusban endotoxin sokk alatt. Az endogén szénmonoxid azonban más kardiovaszkuláris kórképek mechanizmusában is jelentős szerepet játszhat, mivel csökkenti az áramlás-indukálta vazodilatációt és hozzájárulhat a traumás állapotokban kialakuló érdiszfunkcióhoz is (Johnson RA és Johnson FK, 2007).

A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer érhatásait az 1. táblázat foglalja össze.

Szénmonoxid forrása	Állatfaj	Szövet	Érhatás	Irodalom
Exogén	Bárány	Ductus arteriosus	↓	Coceani R és mtsai, 1984
Exogén	Egér	MCA	↓	Andersen JJ és mtsai, 2006
Exogén	Kutya	Basiláris artéria és MCA	↔	Brian JE Jr és mtsai, 1994
Exogén	Kutya	Carotis, Koronária, Femorális artéria	↓	Vedernikov YP és mtsai, 1989
Exogén	Nyúl	Aorta	↓	Furchgott RF és mtsai, 1991
Exogén	Nyúl	Basiláris artéria és MCA	↔	Brian JE Jr és mtsai, 1994
Exogén	Nyúl	Pulmonális artéria	↓	Steinhorn RH és mtsai, 1994
Exogén	Malac	Mesenterialis artéria	↓	Villamor E és mtsai., 2000
Exogén	Malac	Pulmonális artéria és véna	↓	Villamor E és mtsai., 2001
Exogén	Patkány	Aorta	↓	Longo M és mtsai, 1999
Exogén	Patkány	Farok artéria	↓	Wang R és mtsai, 1997
Exogén	Patkány	Koronária artéria	↓	McGrath JJ és Smith DL, 1984
Exogén	Patkány	Piális arteriola	↓	Holt DC és mtsai, 2007
Exogén	Patkány	Renális artéria	↓	Thorup C és mtsai, 1999
Exogén	Sertés	Húgyhólyag artéria	↔	Werkstrom V és mtsai, 1997
Exogén	Sertés	Koronária artéria és véna	↓	Graser T és mtsai, 1990
Endogén	Bárány	Ductus arteriosus	↔	Coceani R és mtsai, 1997
Endogén	Patkány	Hepaticus artéria	↔	Pannen BH és mtsai, 1998
Endogén	Patkány	Hepaticus véna	↓	Pannen BH és mtsai, 1998
Exogén és Endogén	Tengerimalac	Koronária artéria	↓	Gagov H és mtsai, 2003
Exogén és Endogén	Malac	Piális arteriolák	↓	Leffler CW és mtsai, 1999
Exogén és Endogén	Patkány	Gracilis izom arteriolák	↑	Johnson FK és Johnson RA, 2003

1. Táblázat. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer érhatásai az érrendszer különböző területein illetve különböző fajokban.

(↓ relaxáció, ↔ nincs hatás, ↑ konstriktó)

II. Kérdésfeltevés

Az endogén szénmonoxid hatásait kiterjedten vizsgálták a vérkeringés különböző területein és a vérnyomás szabályozásában, de a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepéről az agyi vérkeringés szabályozásában nagyon kevés információ állt rendelkezésre.

Izolált nyúl illetve kutya agyi artériák in vitro vizsgálata során azt találták, hogy a szénmonoxid nem befolyásolja az erek feszülését (Brian JE Jr és mtsai, 1994). Ezután a negatív eredmény után sokáig nem foglalkoztak az endogén szénmonoxid hatásaival az agyi vérkeringésben, majd újszülött malacok piális erein végeztek méréseket és azt találták, hogy az exogénen adagolt szénmonoxid dózis-függő dilatációt okozott (Leffler CW és mtsai, 1999). Mivel az agyi erek válaszkészsége jelentősen változik az egyed fejlődése során (Armstead WM és mtsai, 1994; Zuckerman SL és mtsai, 1996), továbbá a hem-oxigenáz expresszióját is jelentősen befolyásolja az állat kora (Maines MD és mtsai, 1996a; Sun Y és mtsai, 1990), ezért mi felnőtt hím Wistar patkányokon kívántuk tisztázni a következőképpen:

- 1., Mi a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe a nyugalmi hypothalamikus véráramlás fenntartásában?
- 2., Milyen kölcsönhatásban van a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer a nitrogén monoxid szintázzal a hypothalamus véráramlásának szabályozásában?
- 3., Milyen kölcsönhatás van a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer és a vazoaktív prosztanoid vegyületek között a hypothalamikus véráramlás szabályozásában?
- 4., Mi a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe a nyugalmi agykérgi véráramlás fenntartásában, és kimutatható-e kölcsönhatás a nitrogén monoxid szintáz aktivitásával?

5., Megfigyelhetőek-e izolált agyi artériákon is a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer in vivo tapasztalt hatásai?

III. Kísérleti módszerek

III./1. In vivo patkánykísérletek előkészítése

Kísérleteinket felnőtt (300-400 g testtömegű) hím Wistar patkányokon végeztük. Az állatokat 1,3 g/kg intraperitoneálisan adott urethánnal altattuk, és spontán lélegeztek tracheakanülön keresztül. Kétoldalon megkanuláltuk az arteria femoralist, a kísérlet során ezen keresztül folyamatosan regisztráltuk a vérnyomást, illetve mintákat vettünk az artériás sav-bázis paraméterek és vérgáz-tenziók analiziséhez. A bal vena femoralist megkanuláltuk intravénás anyagbeadás céljából.

Valamennyi kísérletünk során rektális hőmérővel folyamatosan mértük az állatok testhőmérsékletét, a hőmérőt automatikus hőmérséklet-szabályzóhoz csatlakoztattuk, melyet úgy állítottunk be, hogy egy infra-lámpa segítségével 36.5-37°C között tartsa az állatok maghőmérsékletét.

III./2. Lokális szöveti véráramlás meghatározása a hypothalamusban H₂-gáz clearance módszerrel

A H₂-gáz clearance módszer a szövetekbe juttatott és ott felhalmozódott H₂-gáz deszaturációs (kimosási) görbét használja fel a szöveti véráramlás meghatározására (Auckland K és mtsai, 1964; Mersich T és mtsai, 2007; Sándor P és mtsai, 1991; Szelke E és mtsai, 2005). A hidrogén detektálását a szövetekbe helyezett platina elektród teszi lehetővé. A szövetbe, ill. a szövetből a gázt a vér szállítja. A levegővel belélegzett hidrogén a tüdő alveoláris teréből a tüdő kapillárisokba, onnan pedig - a szisztémás keringésén keresztül - a szöveti kapillárisokhoz jut, amelyeknek endotéliumán keresztül a szövetek irányába diffundál. Ez a szaturáció folyamata, amelynek ideje alatt a nyomásgradiens, tehát a diffúzió a tüdőben az alveolusoktól a vér felé, a szövetekben a vérből a kapillárisokat körülvevő szövetrészek felé irányul. Ez a folyamat addig tart, míg a hidrogén parciális

nyomása az artériás vérben nagyobb a szövetekben felhalmozott H_2 parciális nyomásánál. Kiegyenlített állapotban dinamikus egyensúly alakul ki a szövetek és a vér között, a H_2 nyomásgrádiense 0.

A deszaturációs fázist úgy indítjuk meg, hogy a diffúziós egyensúlyi állapot elérése után a hidrogén gáz belélegeztetését megszüntetjük. Ekkor az artériás vér koncentrációja csökken, mert a tüdő kapillárisok vérgáz-tenziója nagyobb lesz, mint az alveolusokban levő vérgáz-tenzió. Ez a megfordult irányú nyomásgradiens diffúziós áramlást hoz létre a vérből az alveolusok felé. Az artériás vér H_2 -gáztól való "megtisztulása" tenziókülönbséget hoz létre a szövet és a szövetet ellátó kapillárisok vére között. Az így kialakuló diffúziós áramlás iránya a szövetből a vér felé mutat és addig tart, míg a szöveti H_2 parciális nyomása el nem éri az artériás vérét. Ez utóbbi a H_2 belélegeztetésének pillanatszerű megszüntetése ellenére nem egységugrás-szerűen változik, hanem exponenciális görbe formájában tér vissza nullára, mert a tüdő alveolusaiban a belégzés megszüntetése után még néhány másodpercig magasabb H_2 tenzió uralkodik, mint a tüdő kapillárisok vérében.

A vizsgálni kívánt szövetbe vezetett polarizált Pt elektróda segítségével a szövetekben lévő hidrogén parciális nyomásának pillanatnyi értékei mérhetők, mert megfelelő körülmények között a szöveti elektróda árama arányos a hidrogén parciális nyomásával. Megfelelő körülményeken itt azt értjük, hogy megfelelő polarizációs áramkört hozunk létre, amelyben a referenciaelektrodként használt telített kalomel elektródhoz képest +250 mV feszültséggel polarizáljuk a Pt elektródot. Így annak szigetetlen hegyén a H_2 molekulák ionizálódnak és ezt az ionizációs áramot mérjük. Lényegében tehát a polarizált Pt mérőelektrod segítségével azon H_2 molekulák mennyisége követhető, amely az elektród hegyén lejátszódó ionizáció számára a szövetben rendelkezésre áll, ennek időbeli változása pedig arányos a szövet véráramlásával.

Kísérleteink során a H_2 -gázt inhalációs módszerrel, a tracheában helyezett kanülön keresztül juttattuk az állatok szervezetébe. A szaturációs fázis általában 0,5-1 percig, a deszaturációs fázis pedig 5-15 percig tartott. A mérés helyéül a hypothalamust választottuk, mert irodalmi adatok szerint (Maines MD, 2000) itt igen magas a hem-oxigenáz aktivitás.

Szikével megnyitottuk a fejbőrt, majd a bregmától hátra 2 mm-re, és lateral felé 1 mm-re fűrtük át a koponyát. Mérőelektrodként 100 µm átmérőjű, teflonnal szigetelt Pt elektródot vezettünk sztereotaxiás módszerrel a hypothalamusba, referencia elektródként Ag/AgCl elektródot használtunk, amelyet az állatok nyakán rögzítettünk a bőr alatt. A szöveti véráramlás mérésére szolgáló Pt elektródok +250 mV feszültséggel történő polarizálására házilag gyártott polarizáló egységet használtunk. Az elektród helyét utólagos szekcióval igazoltuk.

III./3. Agyszöveti véráramlásmérés lézer-Doppler módszerrel

Az állatok koponyáját egy sztereotaxikus fejtartóban rögzítettük. A parietális régióban megnyitottuk a fejbőrt, majd a csontot egy fűróval elvékonyítottuk a fali lebeny felett, úgy hogy a koponya lamina internáját intaktan hagytuk. Az elvékonyított koponyacsontra a függőlegeshez képest 12°-os dőlésszögben két lézer-Doppler (LD) szondát helyeztünk a két félteke fölé (4 mm-re caudalisan a bregmától, és 5 mm-re lateralisán a középvonaltól). A véráramlást kétcsatornás LD áramlásmérővel (Moor Instruments, UK) mértük és rögzítettük folyamatosan a kísérlet folyamán. Az LD szondákat minden kísérlet előtt kalibráltuk egy latex emulzió segítségével. A lézerfény az infravörös tartományban (780 nm) volt, és körülbelül 1 mm mélységig hatolt be az agyba, egy megközelítőleg 7 mm²-es területét fedve le a parietális agykéregnek.

III./4. Patkányokból izolált arteria cerebri media szegmentek izometriás tenziójának mérése

Mély éter altatásban gyorsan elvéreztetett hím Wistar patkányokból kipreparáltuk és szobahőmérsékletű Krebs oldatba helyeztük az arteria cerebri media-t (MCA). Sebészeti mikroszkóp alatt megtisztítottuk a kötőszövettől, és ~1,5 mm hosszúságú érgyűrűket preparáltunk. A preparálás alatt az endotélium megőrzésére különös gondot fordítottunk. Az izometriás tenzió mérésére egy hagyományos miográfot (610-M, Danish Myo

Technology A/S, Aarhus, Dánia) használtunk. Az érgyűrűket két L-alakú 50 µm-es wolfram tűre helyeztük. Az egyik tű egy erőmérőhöz csatlakozott, amelynek segítségével, erősítés után, az izometriás tenzióban bekövetkező változásokat regisztráltuk. Az ér az értartókkal egy 8 ml térfogatú kádban, 37 °C-on tartott hőmérsékletű, 95 % O₂ és 5 % CO₂ keverékével átbuborékolgatott Krebs oldatban helyezkedett el. A standard Krebs oldat összetétele a következő: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂*2H₂O, 20 mM NaHCO₃, 1,17 mM MgCl₂*7 H₂O, 1,18 mM KH₂PO₄, 0,027 mM EDTA, 11 mM glükóz. Az ereket 60 percig inkubáltuk 1,5-2 mN előfeszítéssel miközben az inkubáló oldatot 20 percenként cseréltük, felmelegítettük a szervfürdőt szobahőmérsékletre 37 °C-ra. A kísérlet kezdetén és végén meghatároztuk a maximális depolarizációra adott kontrakciós választ 124 mM K⁺-ot tartalmazó Krebs oldat segítségével. Az ereket 10 µM PGF₂-val feszítettük elő, majd 10 µM ZnDPBG és 10 µM bradikinin hatását teszteltük

III./5. cGMP szint mérése a liquorban

Az utolsó véráramlásmérés után az állat nyakán felnyitottuk a bőrt, a nyaki izmokat szétválasztottuk, majd letisztítottuk a membrana atlantooccipitalist. A membránon keresztül egy szárnyastű segítségével liquor cerebrospinalist (CSF) nyertünk a cisterna magnából. Az így nyert CSF mintákat gyorsan lefagyasztottuk, és a mérésig -75 °C-on tároltuk. A CSF cGMP szintjét enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg a gyártó cég utasításait követve (Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI, USA).

III./6. A nitrogén monoxid szintáz aktivitásának mérése a hypothalamusban

A CSF minta levétele után a mélyen altatott állatot gyorsan elvéreztettük és szövetmintát vettünk a hypothalamusból a NOS aktivitásának méréséhez. Az így nyert szövetmintákat gyorsan lefagyasztottuk, és -75 °C-on tartottuk.

A hypothalamus minták NOS aktivitásának mérése L-arginin – L-citrullin konverziós eljárással történt. A hypothalamus szövetmintákat a következő összetételű agyhomogenizáló oldattal homogenizáltuk: 50 mmol/L TrisHCl (pH 7,4), 0,3 mmol/L szukróz, 0,1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L dithio-erythritol, 1 mmol/L phenyl-methyl-sulfonylfluorid (a proteáz gátló szer). A homogenizátumokat a következő oldattal kevertük össze: 5 mmol/L HEPES, 1 mmol/L NADPH, 10 μ mol/L tetrahydrobiopterin, 30 μ mol/L calmodulin, 2.5 mmol/L CaCl₂ (pH 7,4), és a reakciót 20 μ mol/L ³H-arginine hozzáadásával indítottuk el. Harminc perces inkubálás után a reakciót leállítottuk és a mintákat 2 cm-es Dowex 50x8-as gyanta oszlopokra helyeztük. A leoldódott mintákat 5 ml dioxán alapú szcintillációs folyadékkal kevertük össze és egy Beckman TriKarb folyadék szcintillációs spektrométerben mértük le. A minta fehérjetartalmát biuret reakcióval határoztuk meg, a NOS aktivitásokat pikomol citrullin / perc / milligramm fehérje egységekben számoltuk.

III./7. Endogén szénmonoxid szintézis mérése agyszövetben

A ZnDPBG esetleges in vivo agyszöveti HO-gátló hatásának vizsgálata céljából patkányok egy csoportját ZnDPBG-vel, a másikat ennek vehikulumával (fiziológiás sóoldat) kezeltük. 30 perccel később az agyi endogén szénmonoxid termelést szilárd fázisú gáz kromatográfiával határoztuk meg (Peak Performer 1 RPC, Peak Laboratories LLC, Mountain View, California, USA).

Az izolált agyi szövetmintákat Krebs pufferben szonikáltuk, majd nyolc aliquotra osztottuk. Az aliquotok egyik felét 2 °C-on tartottuk, míg másik felét 37 °C-on 60 percig inkubáltuk, így minden mintához négy-négy pár mérés tartozott. Az inkubált, illetve hidegen tartott aliquotok CO-termelése közötti különbséget tekintettük a HO aktivitás mértékének.

III./8. Prosztanoid szintek mérése a liquorban

A liquor prosztanoid (PGE_2 , 6-keto-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGD₂) szintjeinek méréséhez az állatok egy csoportját ZnDPBG-vel, a másikat ennek vehikulumával kezeltük, majd mély éter altatásban elvéreztettük. Az állat nyakán felnyitottuk a bőrt, a nyaki izmokat szétválasztottuk, majd letisztítottuk a membrana atlantooccipitalist. A membránon keresztül egy szárnyastű segítségével liquor cerebrospinalist (CSF) nyertünk a cisterna magnából. A mintákat lefagyasztottuk, és -75 °C-on tartottuk. A mérés gáz kromatográfia/triple-quadrupole tömegspektrográfiával (GC-MS-MS) történt. A deuterált belső standardok hozzáadása után, a prosztanoidokat metoxim-származékká alakítottuk, majd etil acetát-hexánnal extraháltuk. A mintákat tovább alakítottuk pentafluorobenzil-észterekké, majd vékony-réteg kromatográfiaival tisztítottuk. A prosztanoid származékokat trimetilsilyl-észterekké alakítottuk, majd a termékeket GC-MS-MS-sel kvantifikáltuk.

III./9. Kísérleti anyagok

A szervezetben termelődő vazoaktív anyagok szerepének tanulmányozásához a termelő enzimek farmakológiai gátlószereit alkalmaztuk.

A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid reakcióút tanulmányozásához cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikolt (ZnDPBG, Frontier Scientific Europe Ltd, Carnforth, Lancashire, UK) alkalmaztunk 45 $\mu\text{mol/kg}$ dózisban, a szert intraperitoneális adagoltuk. Oldószerként fiziológiás sóoldatot használtunk. A ZnDPBG-t azért választottuk más gátlószerek helyett, mert irodalmi adatok szerint az általunk használt dózis intraperitoneálisan az állatba juttatva, átjut a vér-agy gáton és jelentősen gátolja az agyi hem-oxigenáz aktivitást (Johnson RA és mtsai, 1997).

Az L-arginin-nitrogén monoxid reakcióutat a nitrogén monoxid szintáz (NOS) specifikus gátlószereivel, 50 mg/kg N^G-nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME, Sigma) gátoltuk, amely átjut a vér-agy gáton, és jelentősen csökkenti az enzim aktivitását (Ayers

NA és mtsai, 1997). Az L-NAME-t fiziológiás sóoldatban oldottuk és intravénásan adagoltuk.

A ciklooxygenáz (COX) enzimet 10 mg/kg diklofenákkal (Sigma) gátoltuk, melyet fiziológiás sóoldatban oldottunk, és intravénásan adagoltunk. Az általunk használt dózis jelentősen csökkenti az agy prosztanoid termelését patkányban (Abdel-Halim MS és mtsai, 1978). A diklofenákot azért részesítettük előnyben az indomethacinnal szemben, mert az indomethacinnak számos, nem-specifikus hatását mutatták ki, így például blokkolhatja az agyi erek prosztaciklin receptorát is (Parfenova H és mtsai, 1995).

III./10. Statisztikai módszerek

A szövegben, táblázatokban és az ábrákon a kísérletek átlaga \pm SEM (standard error of mean – átlag szórása) került feltüntetésre. A dokumentációs anyagban az n a kísérletek számát jelöli. A statisztikai értékelést variancia analízissel (repeated measurement vagy one way analysis of variance (ANOVA)) végeztük, majd Fisher-féle LSD, Dunett-féle vagy Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. Két csoport összehasonlításához páratlan Student t-tesztet használtunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikáns eltérésnek, és ezt a táblázatokban illetve az ábrákon csillaggal jeleztük.

IV. Eredmények

IV./1. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe a hypothalamus nyugalmi véráramlásának szabályozásában

Kísérleteink első részében a hem – hem-oxigenáz rendszer szerepét vizsgáltuk a hypothalamus nyugalmi véráramlásának fenntartásában. Az állatok egy csoportja (n=6) vehikulum-kezelt kontrollként szolgált, és intraperitonálisan fiziológiás sóoldatot kapott. Az állatok második csoportjában (n=8) intraperitonális cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikolt (ZnDPBG, 45µmol/kg) alkalmaztunk az endogén szénmonoxid szintézis gátlására. A hypothalamikus véráramlást (HBF) a gátlószer adagolása előtt, és után a 15., 30., illetve 45. percben határoztuk meg.

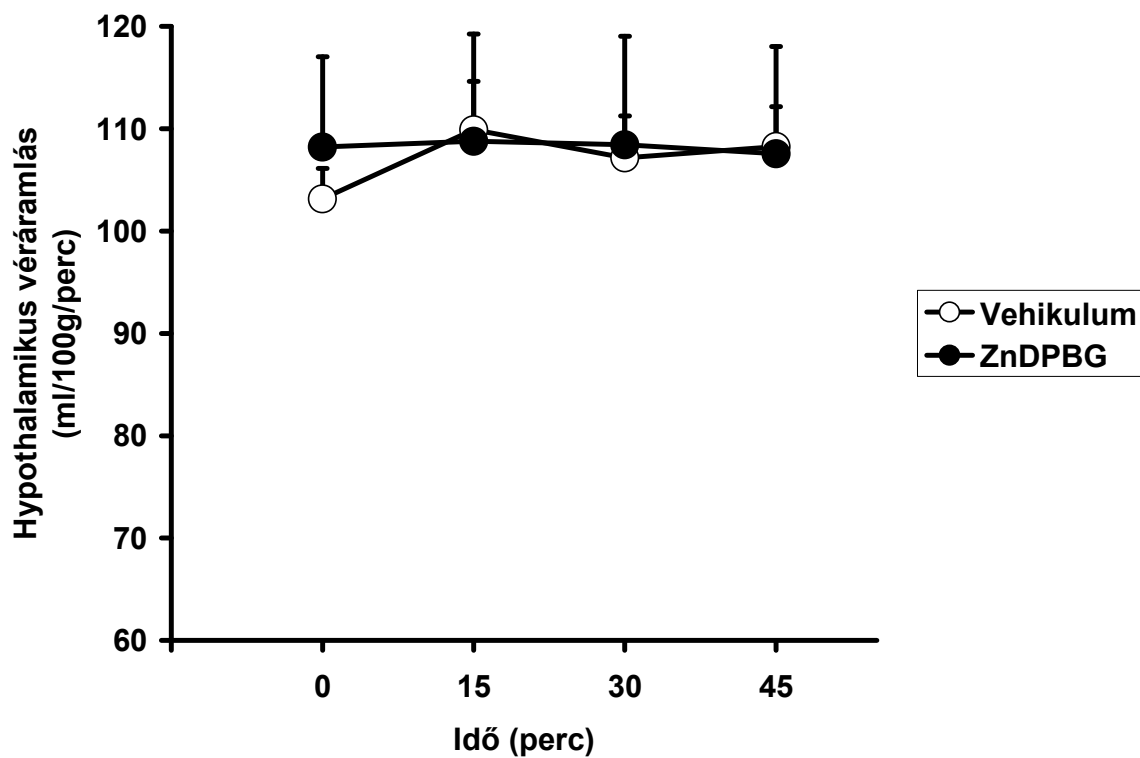
A kísérleti csoportokban a kardiovaszkuláris, légzési és sav-bázis paraméterek a normál tartományban voltak (2. táblázat), nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán és nem volt különbség a kísérleti csoportok között a vizsgált időtartamban.

Kezelés	Vehikulum			ZnDPBG				
	0	15	30	45	0	15	30	45
Időpont (perc)	91±5	91±7	95±5	95±7	99±5	98±6	101±7	103±6
Vérnyomás (Hgmm)	414±25	417±29	423±30	418±30	434±11	420±16	428±21	439±20
HR (1/min)	120±11	124±8	126±8	110±6	115±7	117±6	110±8	114±6
VR (1/min)	97±1	93±3	95±3	92±4	99±4	100±4	99±3	99±4
apO₂ (Hgmm)	96,7±0,3	96,5±0,2	96,7±0,2	96,5±0,2	97,1±0,3	97,1±0,3	96,8±0,4	96,8±0,4
aO₂ Sat (%)	40±1	40±1	41±1	40±1	39±1	37±1	38±1	37±1
apCO₂ (Hgmm)	7,34±0,02	7,35±0,02	7,35±0,02	7,36±0,02	7,34±0,01	7,34±0,01	7,33±0,1	7,33±0,1
apH								

2. Táblázat. Kardiovaszkuláris, légzési és sav-bázis paraméterek a két kísérleti csoportban az agyi véráramlásmérések időpontjában. A mért élettani paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés.

HR: szívfrekvencia, VR: légzészám, apO₂: artériás oxigéntenzió, aO₂ Sat: artériás oxigénszaturáció, apCO₂: artériás széndioxid tenzió, apH: artériás pH (n=6-8)

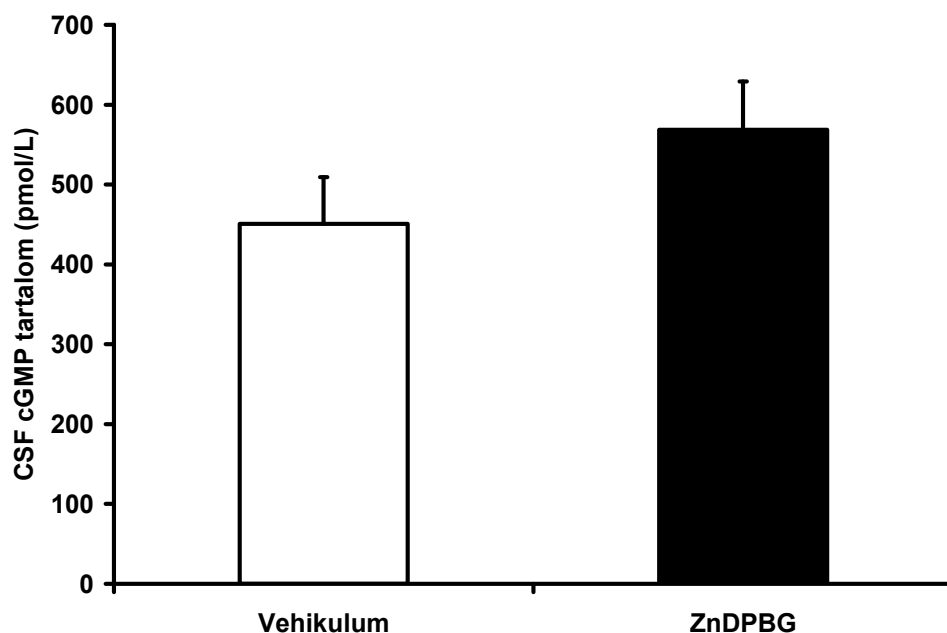
A kiindulási HBF hasonló volt a két kísérleti csoportban (1. ábra), és sem a fiziológiás sóoldat, sem a ZnDPBG nem okozott szignifikáns áramlásváltozást (1. ábra).



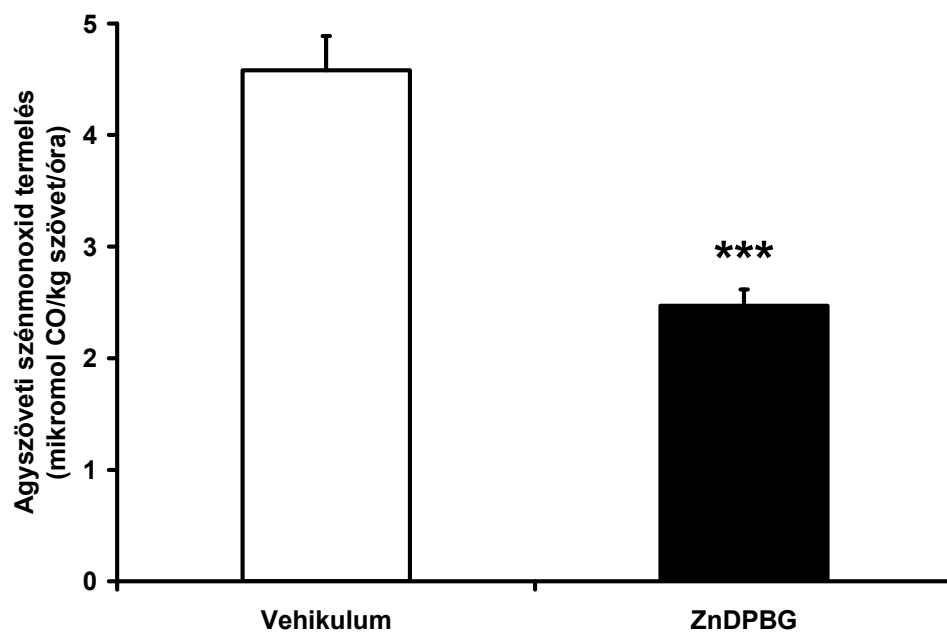
1. Ábra. Hypothalamikus véráramlás a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg, fekete, n=8) illetve vehikuluma (fiziológiás sóoldat, fehér, n=6) intraperitoneális alkalmazása előtt (0. perc) és után 15, 30, és 45 perccel.

Az utolsó véráramlásmérés után vett liquormintában meghatároztuk a cGMP szintet, mivel ismert volt, hogy a hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid reakcióút hatásainak egy részét cGMP-n keresztül fejt ki (Friebe A és mtsai, 1996; Makino R és mtsai, 1999; Vogel KM és mtsai, 1999). Méréseinkben a kísérleti csoportok között nem volt különbség a liquor cGMP szintjében (2. ábra).

Bár a ZnDPBG HO-gátló hatása ismert volt, és kimutatták hogy képes átjutni a vér-agy gáton, eredményeink verifikálása céljából lemértük HO-gátló hatását az általunk használt körülmények között. A ZnDPBG jelentős mértékben csökkentette az agyi HO aktivitást (3. ábra).



2. Ábra. A liquor cerebrospinalis (CSF) cGMP tartalma vehikulum (fiziológiás sóoldat, fehér, n=6) illetve a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg, fekete, n=6) intraperitoneális alkalmazása után.

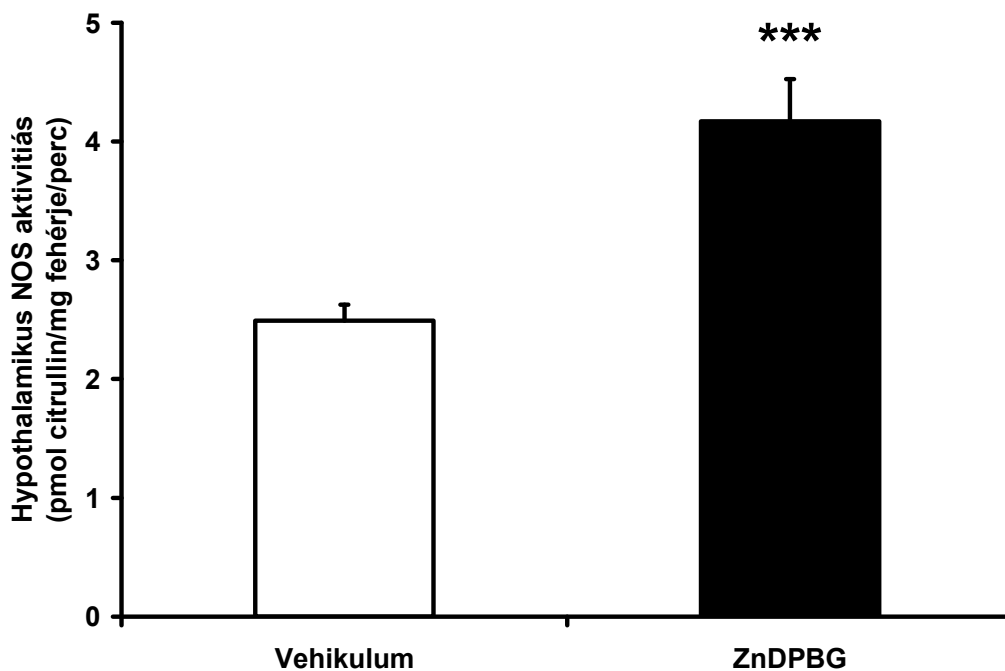


3. Ábra. Az agyszövet szénmonoxid termelése vehikulum (fiziológias sóoldat, fehér, n=6) illetve a HO-gátló zinc deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg, fekete, n=6) intraperitoneális alkalmazása után (***) $p < 0,001$ vs. vehikulum, Student-féle páratlan t-teszt).

IV./2. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer kölcsönhatása a nitrogén monoxid szintázzal a hypothalamikus véráramlás szabályozásában

A következőkben hem – hem-oxigenáz rendszer kölcsönhatását vizsgáltuk a hypothalamus véráramlásának szabályozásában.

Az állatok egy csoportja (n=6) vehikulum-kezelt kontrollként szolgált, és intraperitonálisan fiziológiás sóoldatot kapott. Az állatok második csoportjában (n=8) intraperitonális ZnDPBG-t alkalmaztunk az endogén szénmonoxid szintézis gátlására. A véráramlás-mérések befejezése után kimetszettük a hypothalamust, és meghatároztuk a nitrogén monoxid szintáz aktivitását. A ZnDPBG-vel kezelt kísérleti csoportban szignifikánsan magasabb NOS aktivitást találtunk a hypothalamusban, mint a vehikulummal kezelt csoportban (4. ábra).



4. Ábra. A hypothalamus nitrogén monoxid szintáz (NOS) aktivitása vehikulum (fiziológiás sóoldat, fehér, n=6) illetve a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg, fekete, n=8) intraperitoneális alkalmazása után (***) $p < 0,001$ vs. vehikulum, Student-féle páratlan t-teszt)

Mivel a hypothalamikus véráramlás változatlan maradt a megemelkedett NOS aktivitás ellenére, azt feltételeztük hogy a hem-oxigenáz gátlásának van egy közvetlen agyi véráramlást csökkentő hatása, ami ellensúlyozná a megnövekedett nitrogén monoxid szint agyi véráramlást növelő hatását. A HO-gátlás ezen feltételezett direkt hatását a hypothalamikus vérkeringésre vizsgáltuk további két kísérleti csoportban, amelyekben megismételtük kísérleteinket L-NAME-mel kiváltott NOS-gátlás után.

Ezen csoportokban a kezdeti nyugalmi áramlásmérés után az állatok 50 mg/kg L-NAME-t kaptak intravénásan. Az állatok egy csoportja (n=9) vehikulum-kezelt kontrollként szolgált, és az L-NAME adagolás után 30 perccel intraperitonálisan fiziológiás sóoldatot kapott. Az állatok második csoportjában (n=8) intraperitonális ZnDPBG-t alkalmaztunk az endogén szénmonoxid szintézis gátlására ugyanebben az időpontban. A hypothalamikus véráramlást (HBF) a gátlószer adása előtt, és után a 15., 30., illetve 45. percben határoztuk meg.

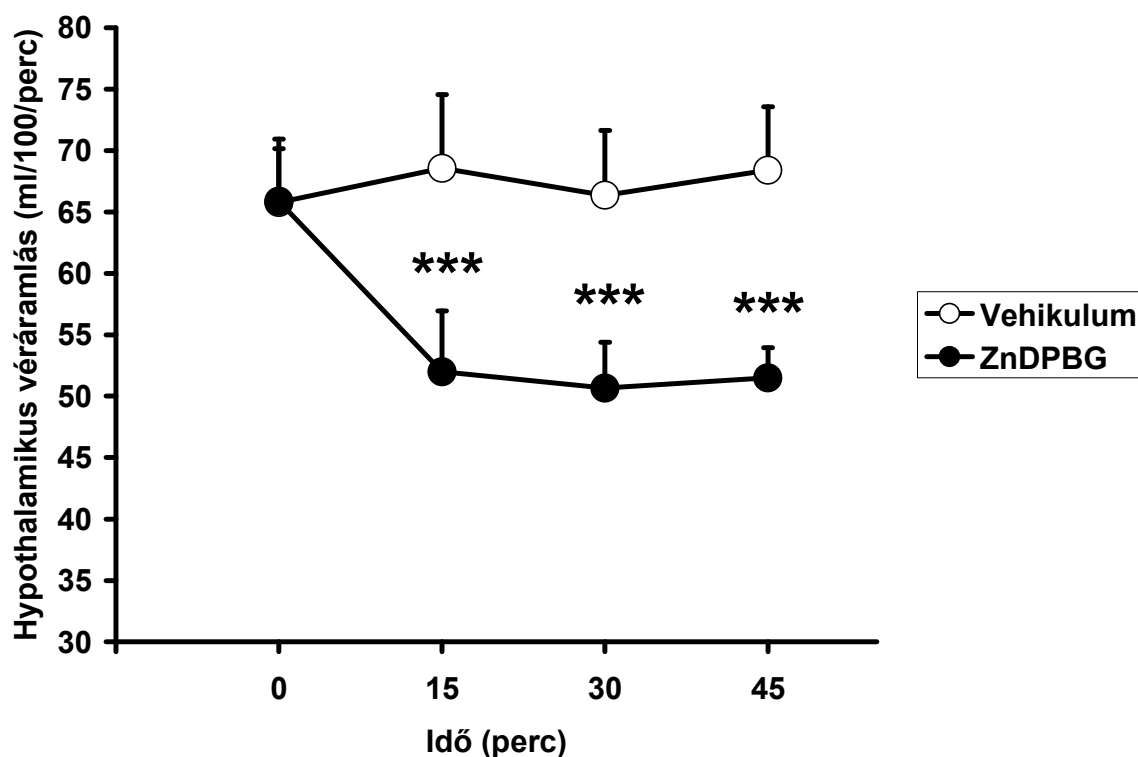
Az állatok légzési és sav-bázis paraméterei a fiziológiás tartományban voltak (3. táblázat), és nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán egyik kísérleti csoportban sem. Az L-NAME előkezelés szignifikánsan megnövelte az artériás középnyomást (MABP) (105 ± 7 vs. 138 ± 6 Hgmm, $p < 0,001$, Student-féle páratlan t-teszt), azonban ez az emelkedett vérnyomás a kísérlet folyamán már nem változott. A megemelkedett vérnyomás ellenére a kezdeti HBF jelentősen alacsonyabb volt, mint az előkezeletlen csoportokban (96 ± 9 vs. 67 ± 5 ml/100g/perc, $p < 0,001$, Student-féle páratlan t-teszt).

Kezelés	Vehikulum				ZnDPBG			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Időpont (perc)								
Vérnyomás (Hgmm)	132±9	129±6	129±7	129±8	143±5	138±4	136±5	136±4
HR (1/min)	400±8	393±11	399±11	407±15	434±11	420±16	428±21	439±20
VR (1/min)	115±4	105±4	108±5	106±5	113±10	111±5	112±3	112±7
apO₂ (Hgmm)	93±5	93±6	96±5	96±5	100±5	100±	100±5	99±5
aO₂ Sat (%)	96,3±0,5	96,3±0,5	96,8±0,4	96,7±0,4	97,2±0,4	97,1±0,3	97,2±0,3	97,2±0,3
apCO₂ (Hgmm)	39±2	35±2	35±2	35±2	35±1	33±1	31±1	30±2
apH	7,36±0,02	7,37±0,02	7,38±0,02	7,38±0,02	7,37±0,02	7,37±0,01	7,38±0,02	7,39±0,02

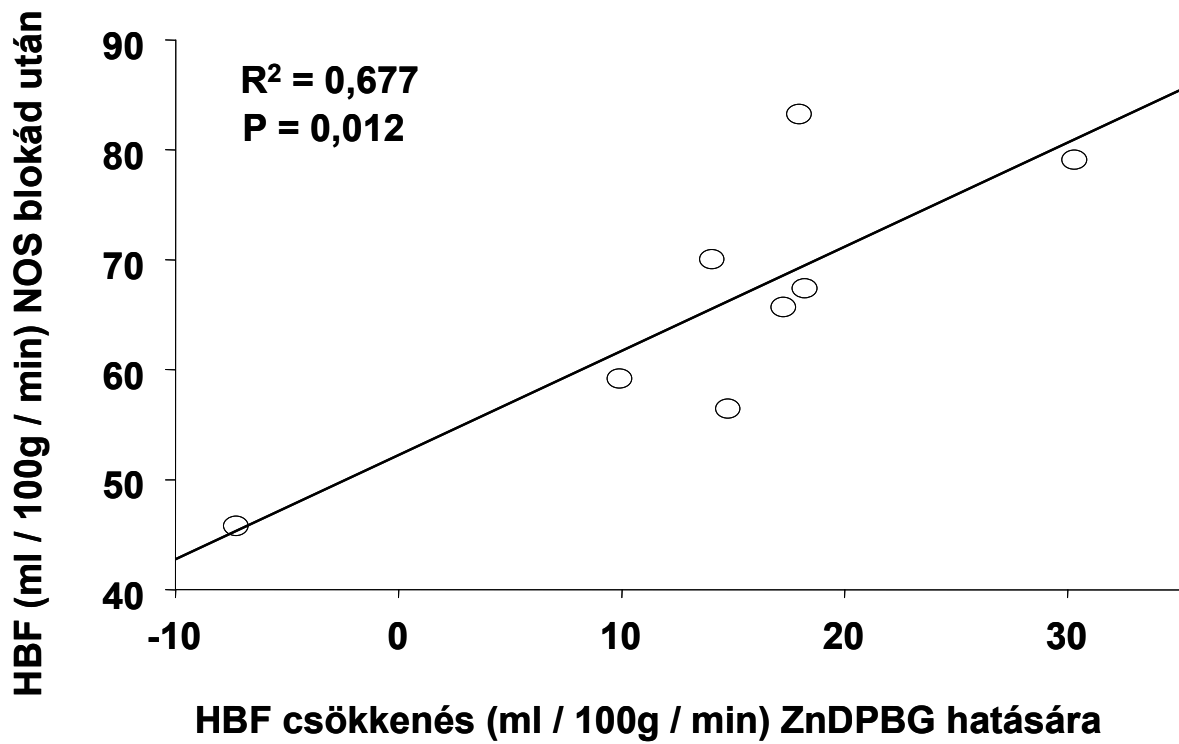
3. Táblázat. Kardiovaszkuláris, légzési és sav-bázis paraméterek a két kísérleti csoportban az agyi véráramlásmérések időpontjában. A mért élettani paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés sem a két kísérleti csoport között, sem pedig egy csoporton belül a különböző mérési időpontokban.

HR: szívfrekvencia, VR: légzesszám, apO₂: artériás oxigéntenzió, aO₂ Sat: artériás oxigénszaturáció, apCO₂: artériás széndioxid tenzió, apH: artériás pH

A már jelentősen csökkent HBF tovább csökkent a ZnDPBG kezelés hatására, míg a fizioológias sóoldat alkalmazása nem befolyásolta a HBF-et (5. ábra). Ezen felül szignifikáns lineáris korrelációt találtunk a NOS gátlás utáni HBF értékek és ezek csökkenése között HO-gátlást követően (6. ábra). Ez az összefüggés arra utal, hogy a HBF jobban megtartott maradt azokban az NO-hiányos állatokban akik nagyobb hypothalamikus HO-aktivitással rendelkeznek.



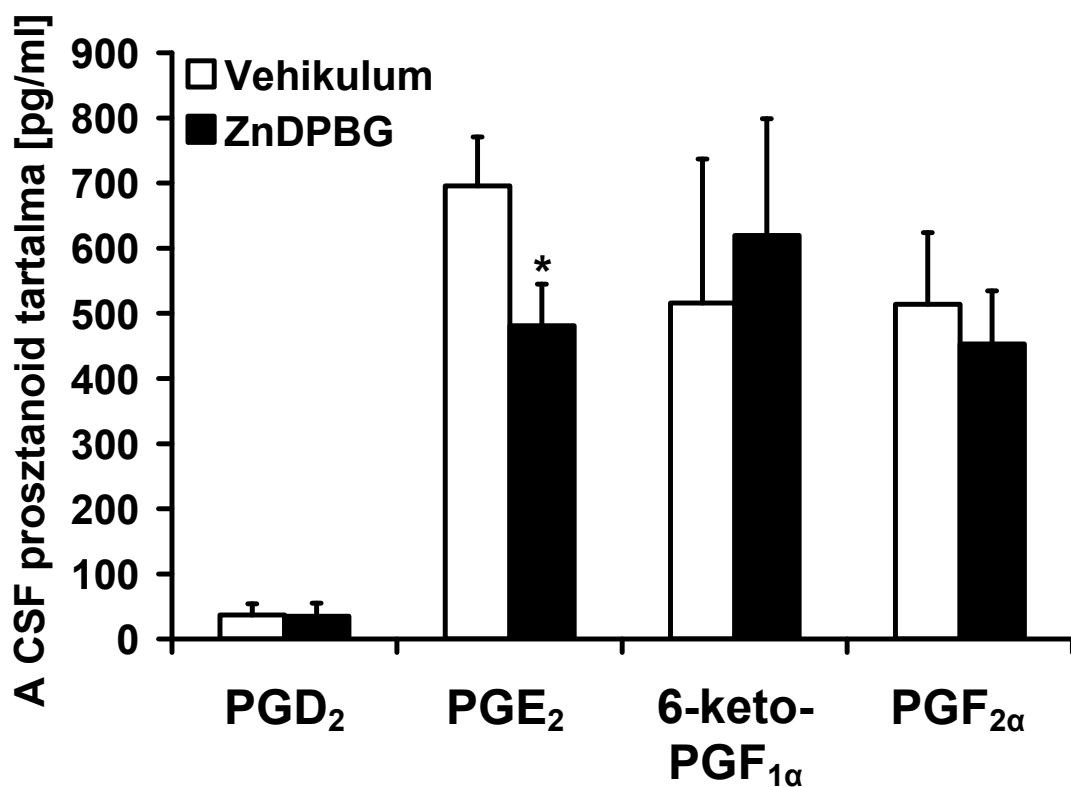
5. Ábra. Hypothalamikus véráramlás a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg, fekete, n=8) illetve vehikulumuma (fizioológias sóoldat, fehér, n=9) intraperitoneális alkalmazása előtt (0. perc) és után 15, 30, 45 perccel N^G-nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME) előkezelt állatokban ***P<0,001 vs 0. perc (repeated measurement ANOVA és Fisher-féle protected LSD post-hoc teszt)



6. Ábra. A NOS gátlás utáni hypothalamikus véráramlás-értékek (HBF) szignifikáns lineáris korrelációt mutatnak értékük csökkenésével HO gátlás után.

IV./3. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer kölcsönhatása a ciklooxygenáz-prosztanoid rendszerrel a hypothalamus véráramlásának szabályozásában

Irodalmi adatok szerint a hem-oxigenáz befolyásolja az agyi prosztanoid-szintézist in vitro agyszeleteken és sejt kultúrákon (Lee HU és mtsai, 2001; Mancuso C és mtsai, 1997; Vairano M és mtsai, 2001). Kísérleteink első szakaszában azt vizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás megfigyelhető-e in vivo is. A HO-blokád jelentősen csökkentette a CSF PGE₂ tartalmát (7. ábra), azonban érdekes módon nem befolyásolta a többi prosztanoid (PGD₂, a PGI₂ metabolit 6-keto-PGF_{1α} és PGF_{2α}) szintjét a CSF-ben (7. ábra).



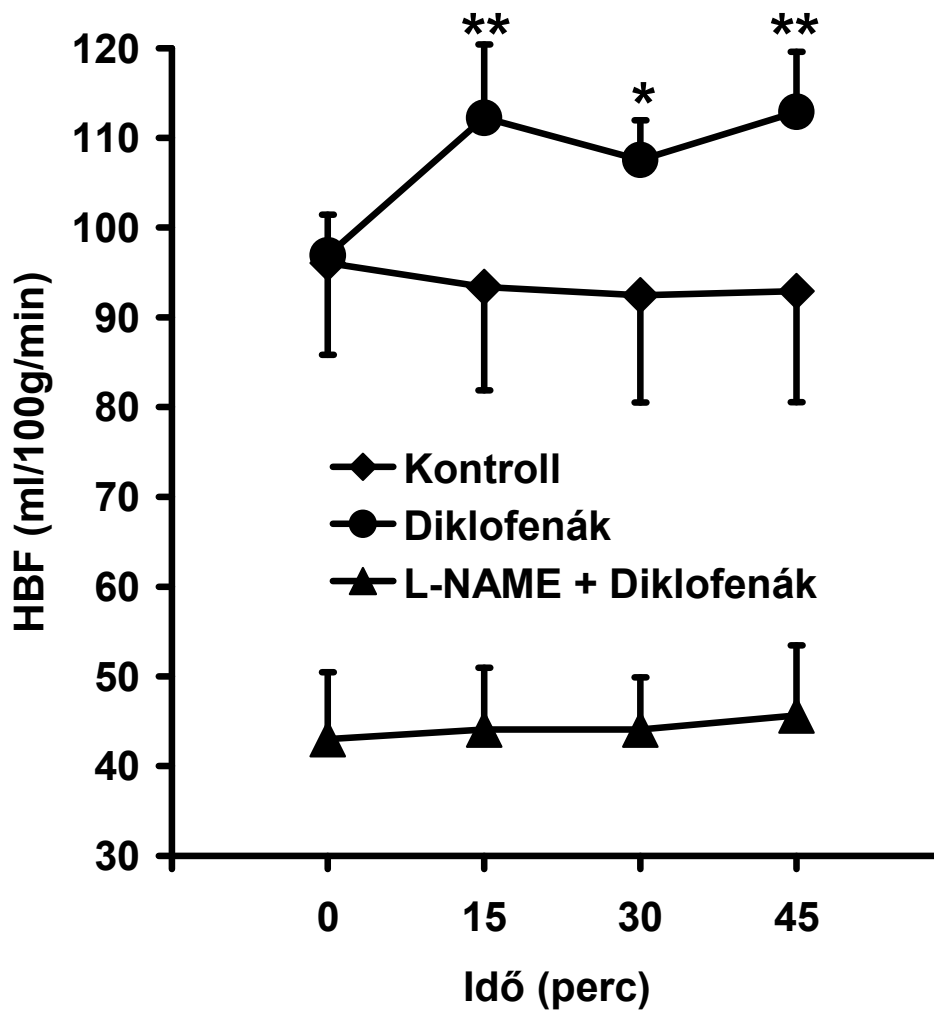
7. Ábra. A liquor cerebrospinalis (CSF) prosztanoid szintjei vehikulum (fiziológias sóoldat, fehér, n=9) illetve a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μmol/kg, fekete, n=8) intraperitoneális alkalmazása után (*p<0,05 vs. vehikulum, Student-féle páratlan t-teszt)

Ezek az eredmények a korábbi in vitro megfigyelésekkel együtt arra utalnak, hogy a hemoxigenáz reakcióút konstitutívan és szelektíven stimulálja a PGE₂ termelését az agyban. Kísérleteink második szakaszában azt kívántuk feltárni, hogy ez a kölcsönhatás milyen szerepet játszik a nyugalmi hypothalamikus véráramlás szabályozásában. A HO-gátlás (45 µmol/kg ZnDPBG ip.) hatását tanulmányoztuk a hypothalamus véráramlására két kísérleti csoportban: normális illetve gátolt (10 mg/kg diklofenák iv.) COX aktivitás mellett. A kísérleti csoportokban a légzési és sav-bázis paraméterek a fiziológiás tartományban voltak (4. táblázat), és nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán.

A ZnDPBG-nek nem volt hatása a kontroll csoportban, azonban szignifikánsan megnövelte a hypothalamikus véráramlást diklofenák előkezelés után (8. ábra) az artériás vérgáz és szisztémás kardiovaszkuláris paraméterek megváltoztatása nélkül. Mivel a korábbi megfigyeléseink alapján a HO-gátlás növelte a hypothalamikus NOS aktivitást, az eredményeinket a következőképpen interpretáltuk. Élettani körülmények között a HO-gátlás két azonos erősségű hatással rendelkezik, egyfelől egy NO által közvetített vazodilatációt okoz, másfelől egy vazokonstriktiót, ami a csökkent PGE₂ termelésnek tulajdonítható. A diklofenák előkezeléssel létrehozott COX-gátlás után azonban csak az NO által közvetített reakcióút tud érvényesülni és ez okozza a megfigyelt HBF növekedést. Hipotézisünk tesztelésére megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a HO gátlása a hypothalamus vérkeringését olyan állatokban, akiket kettős előkezelésben részesítettünk: diklofenákot adtunk a COX reakcióút gátlására, míg a NOS-t L-NAME-mel (50 mg/kg iv.) gátoltuk. A kombinált előkezelés szignifikánsan megemelte az artériás középnyomást a vehikulummal előkezelt csoporthoz képest (4. táblázat), azonban ez az emelkedett vérnyomás a kísérlet folyamán már nem változott. A ZnDPBG-nek nem volt hatása az állatok HBF-jére ebben a kísérleti csoportban (8. ábra).

Előkezelés	I. Vehikulum		II. Diklofenák		III. L-NAME+Diklofenák	
	Vehikulum	ZnDPBG	Vehikulum	ZnDPBG	Vehikulum	ZnDPBG
Vérnyomás (mmHg)	87±11	92±11	87±13	86±13	129±9***	133±14***
HR (1/min)	393±35	426±19	407±48	418±56	367±26	370±36
VR (1/min)	120±31	114±16	117±15	125±12	111±9	125±12
apO ₂ (mmHg)	98±2	96±3	97±10	91±8	91±6	95±12
aO ₂ sat. (%)	96,6±0,8	96,7±0,4	97,1±0,9	96,6±0,9	96,0±1,3	96,8±1,1
apCO ₂	40±3	39±3	41±5	42±4	41±4	40±5
apH	7,33±0,05	7,34±0,02	7,39±0,05	7,38±0,04	7,39±0,05	7,38±0,06

4. Táblázat. Kardiovaszkuláris, légzési és sav-bázis paraméterek az első agyi véráramlásméréskor a 6 kísérleti csoportban. A kombinált előkezelés szignifikánsan megemelte az artériás középnyomást a vehikulummal előkezelt csoporthoz képest, egyéb élettani paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés. ($p < 0,001$ vs. vehikulum, one-way ANOVA, Dunett-féle post-hoc teszt)
HR: szívfrekvencia, VR: légzésszám, apO₂: artériás oxigéntenzió, aO₂ Sat: artériás oxigénszaturáció, apCO₂: artériás széndioxid tenzió, apH: artériás pH, n=5-7.



8. Ábra. Hypothalamikus véráramlás a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg) intraperitoneális alkalmazása előtt (0. perc) és után 15, 30, 45 perccel vehikulummal (fiziológiás sóoldat, négyszög, n=5) diklofenákkal (10 mg/kg, kör, n=5) illetve egyidejűleg adott diklofenák és N^G-nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME, 50 mg/kg) előkezelt (háromszög, n=7) állatokban. *p<0,05 **p<0,01 vs 0. perc (repeated measurement ANOVA és Dunett-féle post-hoc teszt), n=5-7.

IV./4. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe az agykéreg véráramlásának szabályozásában

A hem-oxigenáz illetve NOS aktivitás jelentősen eltér a különböző agyi régiókban (Ewing JF és Maines MD, 1992; Necchi D és mtsai, 2002), ily módon teljesen más szerepet játszhatnak ezen régiók nyugalmi véráramlásának szabályozásában. Az esetleges regionális különbségek feltárására kísérleteinket megismételtük az agykéreg áramlásának folyamatos regisztrálásával.

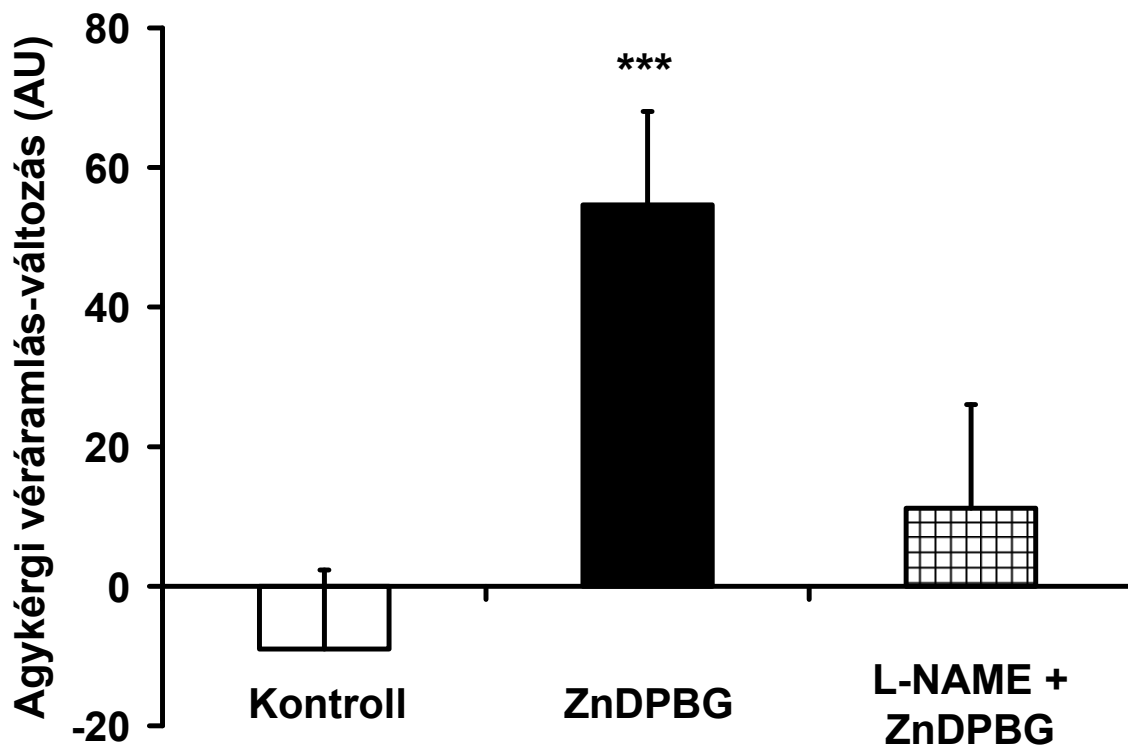
Az állatok egyik csoportja (n=6) vehikulum-kezelt kontrollként szolgált, és intraperitonálisan fiziológiás sóoldatot kapott. Az állatok második csoportjában (n=8) intraperitonális ZnDPBG-t alkalmaztunk az endogén szénmonoxid szintézis gátlására. A harmadik (n=7), és negyedik (n=8) csoportban megismételtük méréseinket a NOS gátlása (50 mg/kg L-NAME) után. A parietális agykéreg véráramlását (CBF) fiziológiás sóoldat illetve ZnDPBG adása előtt, és után a 15., 30., illetve 45. percben határoztuk meg. Az artériás vérgáz és sav-bázis paraméterek a fiziológiás tartományban voltak (5. táblázat), és nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán. Az L-NAME előkezelés megnövelte az artériás középnyomást (MABP) (5.táblázat), azonban ez az emelkedett vérnyomás a kísérlet folyamán már nem változott. A megemelkedett vérnyomás ellenére a kezdeti HBF jelentősen alacsonyabb volt, mint az előkezeletlen csoportokban (348 ± 16 vs. 249 ± 23 AU (Arbitrary Unit, önkényes egység, $p < 0,001$, Student-féle páratlan t-teszt).

A HO-gátlás megnövelte az agykéreg véráramlását, míg a vehikulumként alkalmazott fiziológiás sóoldat nem befolyásolta a CBF-t (9. ábra). A NOS gátlása L-NAME-mel teljes mértékben kivédte a HO-blokád okozta áramlásnövekedést (9. ábra).

Kezelés	Vehikulum	ZnDPBG	L-NAME+ZnDPBG
Vérnyomás (mmHg)	99±5	99±4	139±6***
HR (1/min)	422±16	404±10	366±20
VR (1/min)	128±16	120±8	112±10
aPO₂ (mmHg)	96±3	90±3	96±4
aO₂ sat. (%)	96,6±0,4	95,5±0,4	96,0±0,7
apCO₂	43±2	44±1	45±2
apH	7,36±0,02	7,34±0,01	7,34±0,02

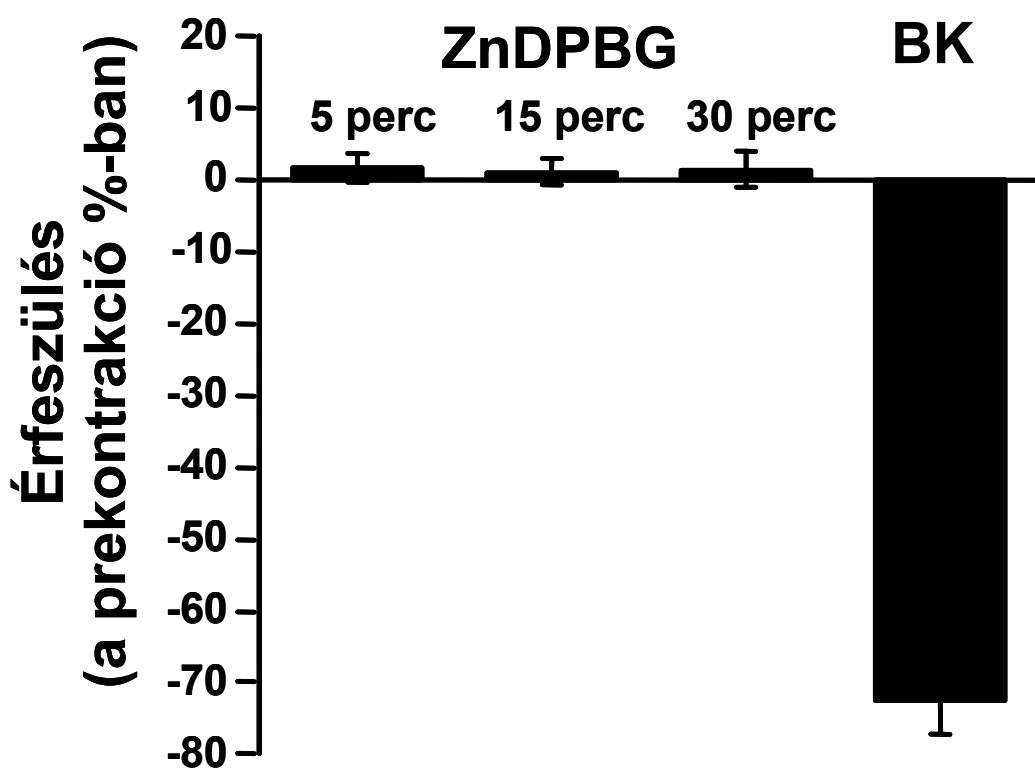
5. Táblázat. Kardiovaszkuláris, légzési és sav-bázis paraméterek az első agyi véráramlásméréskor a 3 kísérleti csoportban. Az N^G-nitro-L-arginin metil észter előkezelés (L-NAME, 50mg/kg) szignifikánsan megemelte az artériás középnyomást a vehikulummal előkezelt csoporthoz képest, egyéb élettani paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés. (p<0,001 vs. vehikulum, one-way ANOVA, Dunett-féle post-hoc teszt)

HR: szívfrekvencia, VR: légzésszám, apO₂: artériás oxigéntenzió, aO₂ Sat: artériás oxigénszaturáció, apCO₂: artériás széndioxid tenzió, apH: artériás pH, n=6-8.



9. Ábra A parietális agykéreg véráramlásának változása vehikulum (fiziológias sóoldat, fehér, n=6), illetve a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 μ mol/kg) intraperitoneális alkalmazásának hatására előkezeletlen (fekete, n=8) illetve N^G-nitro-L-arginin metil észterrel előkezelt (L-NAME, 50 mg/kg, keresztbe csíkozott, n=8) állatokban. ***p<0,001 vs Kontroll (one-way ANOVA és Dunett-féle post-hoc teszt)

In vitro is megvizsgáltuk a parietális kérget ellátó arteria cerebri medián (MCA) a HO-gátlás hatását. A ZnDPBG (10 μ M) nem befolyásolta az izolált MCA szegmentek tónusát (10. ábra), azonban 10 μ M bradikinin szignifikáns vazodilatációt okozott igazolva az endotélium funkcionális épségét (10. ábra).



10. Ábra Arteria cerebri media szegmentek in vitro tenzióváltozása HO-gátlás (10 μ M ZnDPBG) után az 5., 15. és 30 percben, illetve 10 μ M bradikinin hatására.

V. Megbeszélés

V./1. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe és kölcsönhatása a nitrogén monoxid szintázzal a hypothalamus és az agykéreg nyugalmi véráramlásának szabályozásában

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy nyugalmi körülmények között a HO gátlása megnövelte a hypothalamikus NOS aktivitást a hypothalamikus véráramlás megváltoztatása nélkül. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az endogén szénmonoxidnak kettős hatása van a hypothalamus vérkeringésére: egy vazodilatátor hatás, amit kompenzál a NOS gátlása. Tehát úgy tűnik, hogy nyugalmi körülmények között az endogén szénmonoxid vazodilatátor hatású a hypothalamusban, de a szénmonoxid termelés gátlása nem okoz HBF csökkenést az NO termelés egyidejűleg bekövetkező fokozódása miatt. NOS gátlás után azonban a HO gátlása további jelentős csökkenést okozott a HBF-ben, ami arra utal hogy NO hiányában a szénmonoxid lesz felelős az agyi perfúzió fenntartásáért. Ezt a következtetést támasztja alá az is, hogy direkt korrelációt figyelhetünk meg a NOS gátolt állatok hypothalamikus véráramlása és annak csökkenése között HO-blokád után. Másképpen fogalmazva a HO gátlása azon állatokban okozta a legjelentősebb áramláscsökkenést, amelyek relatív magas áramlást mutattak NO hiányában. Tehát úgy tűnik, hogy a NOS gátlása után a hypothalamikus véráramlás viszonylagos megőrzöttsége az endogén szénmonoxid vazodilatátor hatásának köszönhető.

A ZnDPBG adására megnövekedett NOS aktivitás arra utal, hogy a konstitutív szénmonoxid termelés tónusosan csökkenti a hypothalamus NO termelését. Hasonló kölcsönhatást feltételeztek a NO és CO között más kísérleti felállásokban is: Leffler CW és mtsai (1999) leírták, hogy a HO gátlása króm mesoporfirinnel NO-mediált dilatációt okozott újszülött malacok piális arterioláiban. Mayevsky A és mtsai (1995) kísérleteiben az exogén szénmonoxid adagolása agykérgi véráramlásoszcillációkat okozott, amelyek nagyon hasonlítottak a NO szintáz gátlása után kialakuló oszcillációkhoz (Lacza Z és mtsai, 2000; Mayevsky A és mtsai, 1995; Meilin S és mtsai, 1999). Kimutatták továbbá, hogy a

HO gátló cink protoporfirin IX növeli a NOS-III mRNS-ének expresszióját patkány aorta endothelsejteken (Seki T és mtsai, 1997) és növeli az NO termelést nyulak enterális idegrendszeréből izolált neuronjaiban (Chadker S és mtsai, 1996). Ugyanakkor a HO-1 indukciója után megnövekedett HO aktivitás gátolta a NOS aktivitást patkány agyszövetben (Maines MD és mtsai, 1993a).

A mechanizmus, amin keresztül a szénmonoxid gátolja a hypothalamikus NOS aktivitást, még nem tisztázott. A szénmonoxid kötődik a NOS-hoz és gátolja a NO termelését (McMillan K és mtsai, 1992; White KA és Marletta MA, 1992), de az kérdéses hogy ez a kölcsönhatás befolyásolhatta-e a NOS aktivitást az ex-vivo hypothalamusmintákban. Valószínűbb, hogy a kofaktor mennyiségének, illetve a NOS „turnoverének” megváltozása (lásd bevezetés) játszhat szerepet a NOS aktivitás növekedésében HO gátlás után. A HO-blokád után megnövekedett NOS aktivitás megmagyarázhatja, hogy miért nem változott meg a CSF cGMP tartalma annak ellenére, hogy kiesett a szénmonoxid szolúbilis guanil cikláz (sGC) stimuláló hatása. Ezt az elképzelést erősen támogatják azok az eredmények, amelyeket patkányok frontális agykérgének dialízisével nyertek (Laitinen KSM és mtsai, 1997). Ebben a kísérletsorozatban a cGMP termelés lecsökkent 30 perccel a HO-gátlószer cink protoporfirin IX adagolása után, de visszatért a kiindulási szintre a 60. percben, abban az időpontban, amikor mi is vettük a CSF mintánkat. A cGMP termelés átmeneti csökkenése arra utalhat, hogy amíg a szénmonoxid mediálta sGC aktivitás hamar megszűnik HO-blokád után, addig a NO-sGC reakcióút másodlagos aktiválódása egy lassabb folyamat, amelyet talán a NOS „turnover rate”-jének változása okozhat. Maines MD és mtsai (1993a) kimutatták a szénmonoxid kettős hatását az agyi cGMP termelésre, 36%-os kisagyi NOS aktivitás csökkenést találtak miután 65%-kal növelték a HO aktivitást, azonban ez a két hatás a sGC szintjén kiegyenlítette egymást és a cGMP szint nem változott.

Bár úgy tűnik, hogy a HO reakcióútnak nincs jelentős befolyása a nyugalmi HBF-re élettani körülmények között, nem szabad alábecsülni a potenciális jelentőségét olyan kórképekben amelyek az NO szintézis csökkenésével járnak. Figyelemre méltó, hogy a kísérletsorozat második szakaszában (ahol az állatokat NOS gátlóval kezeltük) a már

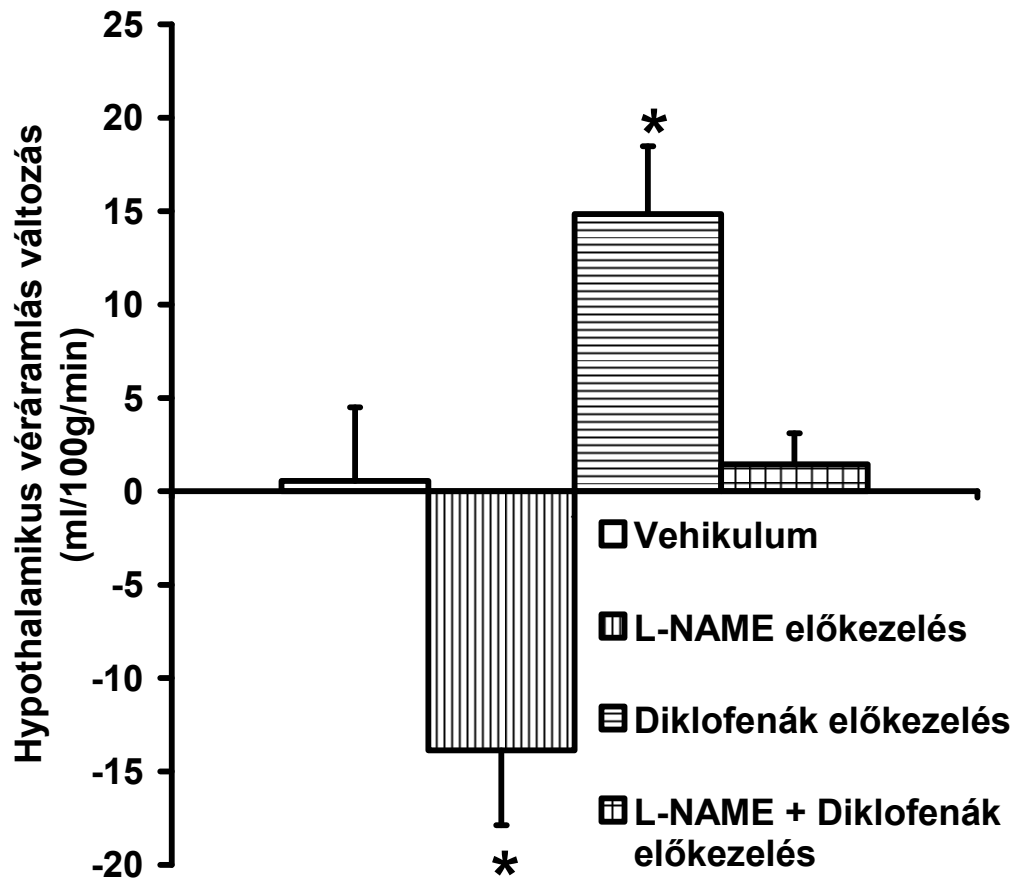
jelentősen lecsökkent HBF tovább csökkent az endogén szénmonoxid termelés gátlása után. Tehát levonhatjuk azt a következtetést, hogy NO hiányában a szénmonoxid „tartalék” vazodilatátorként funkcionál. Annak ellenére, hogy a szénmonoxid önmagában nem képes teljesen fenntartani a véráramlást a hypothalamusban, ez a részleges perfúziójavulás megelőzheti az irreverzibilis neurológiai károsodás kialakulását. A HO reakcióút ezen szerepe egyértelműen fontos lehet keringési sokk illetve globális agyi ischemia esetén, amikor a hypothalamus központi szerepet játszik azon védelmi mechanizmusok koordinálásában amelyek ilyen stresszhelyzetekben aktiválódnak azért, hogy megelőzzék a szisztémás keringés teljes összeomlását. Megfigyeléseink magyarázatot adhatnak a hypothalamikus vérkeringés relatív megőrzöttségére is ischemia/reperfúzió során (Liachenko S és mtsai, 2001).

Tehát úgy tűnik, hogy az endogén szénmonoxid direkt vazodilatátor hatásával növeli a hypothalamikus véráramlást, ugyanakkor gátolja a nitrogén monoxid szintáz aktivitását és így a hypothalamikus véráramlás csökkenését okozza. A szénmonoxid ezen hatásai kiolthatják egymást élettani körülmények között. Az agykéregben azonban az NO-által közvetített reakcióút tűnik dominánsnak, ugyanis a HO-blokád kísérleteinkben agykérgi hiperémiát okozott, más kísérletekben NO-függő piális vazodilatációt (Ishikawa M és mtsai, 2005). Ezek a megfigyelések megerősítik az a nézetet, hogy a HO-reakcióút különböző agyi régiókban eltérően befolyásolja az agyi vérkeringést; azonban ez a válasz nem csak régióként eltérő, hanem úgy tűnik, hogy a HO-reakcióút hatásai jelentősen kor- és fajfüggőek (Holt DC és mtsai, 2007). Az hogy a HO gátlásának in vitro nem volt hatása arra utal, hogy az agykérgi véráramlás csökkenését okozó endogén szénmonoxid nem az érfalból származik, illetve hatásait nem közvetlenül az érfalon fejt ki.

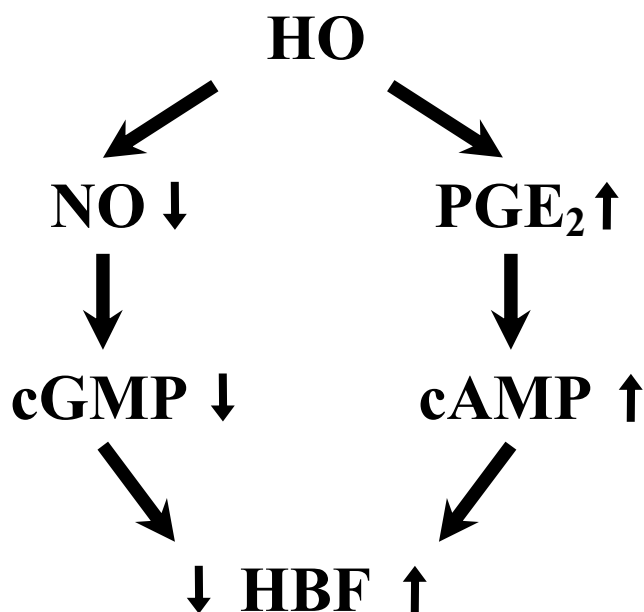
V./2. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer kölcsönhatása a ciklooxigenáz-prosztanoid rendszerrel a hypothalamikus véráramlás szabályozásában

Megfigyeléseink alapján úgy tűnik, hogy a HO-reakcióút vazodilatációs hatását a PGE₂ közvetíti a hypothalamikus érhálózatban. A HO a hemet szénmonoxidra, szabad vasra és biliverdinre bontja, ez utóbbi később bilirubinná alakul a biliverdin reduktáz-által katalizált reakcióban. Ezen metabolitok közül a szénmonoxid és a bilirubin lehet a PGE₂ szintézis aktivátora, mivel kimutatták, hogy ezen metabolitok stimulálják a PGE₂ termelését patkány hypothalamikus sejt kultúrákban in vitro (Lee HU és mtsai, 2001; Mancuso C és mtsai, 1997; Mancuso C és mtsai, 1998). Ezek a megfigyelések és az, hogy a HO reakcióút nem befolyásolja az agyi mikroerek PGE₂ termelését (Kanu A és mtsai, 2006) egyértelműen arra utal, hogy az agyi parenchyma sejtjeinek PGE₂ termelése közvetíti a konstitutív HO aktivitás vazorelaxáns hatását; ebből kifolyólag nem meglepő, hogy exogén szénmonoxid relaxálta a patkány piális artériákat in vivo (Holt DC és mtsai, 2007), azonban in vitro hatástalan volt (Andersen JJ és mtsai, 2006), és kísérleteinkben sem volt hatása a HO gátlásnak in vitro körülmények között.

A különböző kísérletsorozataink eredményét összegző 11. ábrán látható, hogy a ZnDPBG-vel kiváltott HO-gátlás nem befolyásolja a hypothalamikus véráramlást nyugalmi körülmények között, azonban csökkenti a HBF-t NOS gátlás után és növeli azt COX-blokád után. Egyidejű NOS és COX gátlás után a ZnDPBG nem befolyásolja a HBF-et. A megfigyeléseink alapján felállítható következtetéseket összegzi a 12. ábra.



11. Ábra Hypothalamikus véráramlás változása a HO-gátló zinc deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 $\mu\text{mol/kg}$) intraperitoneális alkalmazása után vehikulummal (fiziológias sóoldat, fehér, n=8) N^G-nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME, függőlegesen csíkozott, n=8) diklofenákkal (vízszintesen csíkozott, n=5) illetve egyidejűleg adott diklofenákkal és L-NAME-mel (keresztbe csíkozott, n=7) előkezelt állatokban. *P<0,05 vs. vehikulum (one-way ANOVA és Dunnett-féle post-hoc teszt), n=5-8.



12. Ábra A hem-oxigenáz feltételezett jelátviteli mechanizmusai a hypothalamikus vérkeringés szabályozásában. Bővebb kifejtés illetve a rövidítések feloldása a szövegben található.

Úgy tűnik, hogy a HO-reakcióútnak nincsen közvetlen cerebrovaszkuláris hatása felnőtt patkányokban, azonban képes mind növelni (PGE₂-n keresztül), mind csökkenteni (a NOS gátlásával) a hypothalamikus véráramlást. Élettani körülmények között ezen hatások azonos erősségűek és kioltják egymást, kórélettani állapotokban azonban az egyik mechanizmus dominánssá válhat és jelentős hatása lehet a hypothalamus véráramlására. Endoteliális diszfunkció esetén például, amikor az NO termelés jelentősen lecsökken, a PGE₂-mediálta reakcióút dominánssá válhat, és jelentősen hozzájárulhat a hypothalamus véráramlásának fenntartásához. Érdeemes megemlíteni, hogy ez a reakcióút nem függ az endotélium morfológiai és funkcionális integritásától, mivel a szénmonoxidot mind a simaizom (Cristodoulides N és mtsai, 1995), mind pedig az agyi parenchyma sejtszejtjei (Maines MD, 2000) képesek termelni, és úgy tűnik, hogy a másodlagos PGE₂ termelés is

származhat nem-vaszkuláris sejtekből (lásd fent). Így a HO-CO-PGE₂-cAMP reakciót ideális “tartalék” vazodilatátor lehet elégtelen endoteliális NO termelés esetén.

A fent leírt kölcsönhatás a HO és COX reakcióutak között megváltozhat olyan kórélettani állapotokban, ahol jelentősen megnő a HO aktivitása. Mivel a COX enzimek hem fehérjék és a hem prosztetikus csoport elengedhetetlen a katalitikus aktivitásukhoz (Smith WL és Marnett LJ, 1991), a hem-oxigenáz általi hem degradáció negatívan befolyásolhatja a COX aktivitását. Ezzel összhangban, a HO-1 indukció csökkentette a COX expresszióját és aktivitását endotélsejtekben (Haider A és mtsai, 2002; Li Volti G és mtsai, 2003), és a vesében (Botros FT és mtsai, 2002; Quan S és mtsai, 2004). Továbbá a hem-oxigenáz indukciója endotélsejtekben megnöveli a prosztoglandin transzporter expresszióját és így növelte a prosztoglandinok clearance-ét (Pucci ML és mtsai, 2004). Az eredmények alapján a konstitutív HO aktivitás az agyban nem okoz ilyen hatásokat, mivel a PGE₂ szintek csökkentek HO gátlás után, míg más prosztanoidok szintjei nem változtak. Bizonyos kórélettani állapotokban azonban, amelyek a HO-1 indukcióját okozzák az agyban (pl. subarachnoideális vérzés), a PGE₂ csökkent termelése és a PGE₂ illetve PGI₂ megnövekedett clearance-e a NOS aktivitás CO-által közvetített gátlásával együtt egyértelműen negatívan befolyásolhatja az agyi vérkeringést.

VI. Következtetések

A kísérleti eredmények alapján a következőkben foglalhatóak össze röviden az értekezés új eredményei:

Az endogén szénmonoxid növeli a hypothalamikus véráramlást egy PGE₂-függő mechanizmus segítségével, ugyanakkor gátolja a nitrogén monoxid szintáz aktivitást és így a hypothalamikus véráramlás csökkenését okozza. A szénmonoxid ezen hatásai kiolthatják egymást élettani körülmények között. Olyan kórélettani állapotokban azonban, amelyek megváltozott ciklooxygenáz illetve nitrogén monoxid szintáz aktivitással járnak, a hem-oxigenáz reakcióút jelentősen befolyásolhatja a nyugalmi hypothalamikus véráramlást.

A parietális agykéreg területén az endogén szénmonoxid domináns hatása a nitrogén monoxid szintáz gátlása és ezáltal a véráramlás csökkenése. Úgy tűnik, hogy az agykérgi véráramlás csökkenését okozó endogén szénmonoxid nem az érfalból származik, illetve hatásait nem közvetlenül az érfalon fejt ki.

Összefoglalva, a hem-oxigenáz reakcióút régióként eltérő módon szabályozza az agyi vérkeringést, és ezen hatásait a ciklooxygenáz illetve nitrogén monoxid szintáz rendszerekkel együttműködve fejt ki.

VII. Summary

Heme-oxygenase (HO)-mediated heme degradation is the primary cellular mechanism for production of endogenous carbon monoxide (CO). Previously thought to be simply a waste product, endogenously formed CO is now known to serve as a messenger in numerous physiological and pathophysiological processes. The HO-CO pathway has been reported to evoke direct vascular effects and to influence other vasoregulatory mechanisms like the cyclooxygenase (COX) and nitric oxide synthase (NOS) systems. However, the participation of CO in the regulation of the cerebral circulation has received little attention. Therefore, the aims of our studies were fivefold: (1) to investigate the involvement of endogenous CO in the regulation of the resting hypothalamic circulation, (2) to clarify its possible interaction with the L-arginine-NO pathway, and (3) its possible interaction with the COX pathway. Furthermore, (4) we aimed to determine the influence of the HO pathway on the cerebrocortical blood flow in the presence and absence of a functional NOS system, and (5) to test the presence of these interactions in vitro in isolated middle cerebral artery (MCA) segments.

Regional cerebral blood flow changes were determined using the Auckland's H₂-gas clearance method in the hypothalamus, and using laser Doppler flowmetry in the parietal cortex of rats. In vitro tension recording of the rat MCA has been performed using a conventional myograph system. The hypothalamic tissue NOS activity was measured on the basis of the formation of labeled citrulline from labeled L-arginine, and prostanoid levels in the cerebrospinal fluid were determined by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry (GC/MS/MS).

HO blockade by zinc deuteroporphyrin 2,4-bis glycol (ZnDPBG) increased hypothalamic NOS activity without changing hypothalamic blood flow (HBF). Furthermore PGE₂ concentration in the CSF of animals treated with ZnDPBG was found to be significantly lower as compared to saline-treated controls. Interestingly HO-blockade failed to influence the levels of other prostanoids such as PGD₂, the PGI₂ metabolite 6-

keto-PGF_{1α} and PGF_{2α}. After NOS blockade, however, inhibition of HO induced a further significant reduction in the HBF, indicating that in the absence of NO, CO becomes responsible for the maintenance of cerebral blood perfusion. After COX blockade by diclofenac the inhibition of HO increased NOS activity and blood flow in the hypothalamus. In animals subjected to simultaneous inhibition of COX and NOS ZnDPBG failed to alter HBF. In the parietal cortex HO blockade increased blood flow, which effect was abolished by NOS inhibitor pretreatment. Under in vitro conditions, ZnDPBG had no effect on the tension of isolated MCA segments.

Endogenous CO production appears to increase the HBF via a PGE₂-dependent mechanism, but at the same time suppresses NOS activity which leads to the reduction of the HBF. These effects of CO may neutralize each other under physiological conditions. In pathophysiological states, however, which are associated with altered COX and NOS activity, the HO pathway may significantly influence the resting HBF. In the parietal cortex, however, the primary effect of carbon monoxide is the inhibition of the NOS activity, which effect seems to be mediated either by nonvascular carbon monoxide sources, or by the inhibition of nonvascular NO release. In conclusion, the HO-pathway appears to regulate the cerebral circulation of adult rats via interactions with the COX- and NOS-systems in a regionally heterogeneous manner.

VIII. Összefoglalás

A hem-oxigenáz (HO) katalizálta hem lebontás az endogén szénmonoxid (CO) keletkezésének legfontosabb útja. Az endogén szénmonoxidot a legutóbbi időkig egyszerű “hulladéknak” tekintették, de ma már egyre több megfigyelés erősíti meg jelátviteli szerepét számos élettani és kórélettani folyamatban. Kimutatták, hogy a HO-CO reakciót direkt érhatásokkal is rendelkeznek és befolyásolhatja más keringésszabályozó mechanizmusok, például a ciklooxygenáz (COX) és nitrogén monoxid szintáz (NOS) rendszerek működését. Mindezek ellenére az endogén szénmonoxid szerepe az agyi vérkeringés szabályozásában alig ismert.

Célkitűzéseink ezért a következők voltak: (1) feltárni az endogén szénmonoxid szerepét a nyugalmi hypothalamikus véráramlás (HBF) szabályozásában, (2) tisztázni esetleges kölcsönhatását a NOS és (3) COX reakcióúttal. Továbbá (4) meg kívántuk határozni a HO reakciót szerepét az agykérgi véráramlás szabályozásában nyugalmi körülmények között, illetve NO hiányában (5) és feltárni a talált hatások, illetve kölcsönhatások jelenlétét in vitro izolált arteria cerebri media (MCA) szegmenseken.

A regionális agyi véráramlást a hypothalamusban Auckland H₂-gáz clearance módszerével határoztuk meg, míg a parietális agykéreg területén lézer Doppler áramlásmérést használtunk. Az MCA in vitro izometriás tónusának mérését egy hagyományos miográf rendszerrel végeztük. A hypothalamikus NOS aktivitásra a jelölt L-arginin citrullinná való átalakulásának sebességéből következtettünk, míg a liquor (CSF) prosztanoid szintjeit gáz kromatográfia/triple-quadrupol tömegspektográfiával (GC-MS-MS) mértük.

A cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikollal (ZnDPBG) végzett HO-gátlás megnövelte a hypothalamus NOS aktivitását a hypothalamikus véráramlás megváltoztatása nélkül. A CSF PGE₂ koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a hem-oxigenáz gátolt állatokban, mint vehikulummal kezelt társaikban. Érdekes módon a HO gátlása nem befolyásolta a többi mért prosztanoid (PGD₂, a PGI₂ metabolit 6-keto-PGF_{1α} és PGF_{2α}) szintjét. A NOS

gátlása után azonban, a HO gátlása további jelentős HBF csökkenést okozott, azt jelezve, hogy NO hiányában a CO válik felelőssé az agyi véráramlás fenntartásáért. A diklofenákkal végzett COX gátlás után alkalmazott HO-blokád megnövelte mind a NOS aktivitást, mind a véráramlást a hypothalamusban. Egyidejű COX és NOS gátlás után a ZnDPBG nem befolyásolta a HBF-t. A parietális agykéregben a HO gátlása NO-függő véráramlás-fokozódást okozott. In vitro, a ZnDPBG nem befolyásolta az izolált MCA szegmentek tónusát.

Úgy tűnik, hogy az endogén szénmonoxid növeli a hypothalamikus véráramlást egy PGE₂-függő mechanizmus segítségével, ugyanakkor gátolja a NOS aktivitást és így a HBF csökkenését okozza. A szénmonoxid ezen hatásai kiolthatják egymást élettani körülmények között. Olyan kórélettani állapotokban azonban, amelyek megváltozott COX illetve NOS aktivitással járnak, a HO reakcióút jelentősen befolyásolhatja a nyugalmi HBF-t. A parietális agykéreg területén azonban az endogén szénmonoxid domináns hatása a NOS gátlása. Úgy tűnik, hogy az agykérgi véráramlás csökkenését okozó endogén szénmonoxid nem az érfalból származik, illetve hatásait nem közvetlenül az érfalon fejtí ki. Összefoglalva, a HO reakcióút régiónként eltérő módon szabályozza az agyi vérkeringést, és ezen hatásait a COX illetve NOS rendszerekkel együttműködve fejtí ki.

IX. Irodalomjegyzék

Abdel-Halim MS, Sjöquist B, Anggård E. (1978) Inhibition of prostaglandin synthesis in rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 43(4):266-72

Andersen JJ, Shafi NI, Durante W, Bryan RM Jr. (2006) Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessels of rats and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H223-30

Armstead WM, Zuckerman SL, Shibata M, Parfenova H, Leffler CW. (1994) Different pial arteriolar responses to acetylcholine in the newborn and juvenile pig. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(6):1088-95

Aukland K, Bower BF, Berliner RW. (1964) Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res* 14:164-87

Ayers NA, Kapás L, Krueger JM. (1997) The inhibitory effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester on nitric oxide synthase activity vary among brain regions in vivo but not in vitro. *Neurochem Res* 22(1):81-6

Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stadler J, Williams DL, Ochoa JB, Di Silvio M, Simmons RL, Murray SA. (1992) Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes *Am J Physiol* 262:C1077-C1082

Botros FT, Laniado-Schwartzman M, Abraham NG. (2002) Regulation of cyclooxygenase- and cytochrome p450-derived eicosanoids by heme oxygenase in the rat kidney. *Hypertension* 39:639-44

Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. (1986) Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 141:528-33

Brian JE Jr, Heistad DD, Faraci FM. (1994) Effect of carbon monoxide on rabbit cerebral arteries. *Stroke* 25:639-643

Brune B, Ullrich V. (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32:497-504

Burstyn JN, Yu AE, Dierks EA, Hawkins BK, Dawson JH. (1995) Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II)sGC and Fe(II)sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme. *Biochemistry* 34:5869-5903

Chadker S, Rathi S, Ma XL, Rattan S. (1996) Heme oxygenase inhibitor zinc protoporphyrin IX cause an activation of nitric oxide synthase in the rabbit internal anal sphincter. *J Pharm Exp Ther* 277:1376-1382

Coceani F, Hamilton NC, Labuc J, Olley PM. (1984) Cytochrome P 450-linked monooxygenase: involvement in the lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 246:H640-H643

Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E, Marks GS, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Rabinovitch M, Ackerley C. (1997) Carbon monoxide formation in the ductus arteriosus in the lamb: implications for the regulation of muscle tone. *Br J Pharmacol* 120:599-608

Colombari E, Bonagamba LG, Machado BH. (1994) Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *American Journal of Physiology* 266:8730-8738

Colombari E, Silva CCS, Almeida VA, Haibara AS, Johnson RA. (1998) Role of carbon monoxide in L-glutamate-induced cardiovascular responses in nucleus tractus solitarius of conscious rats. *FASEB Journal* 12:61

Cristodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI. (1995) Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 91:2306-2309

Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. (1997) Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 80:557-564

- Dwyer BE, Nishimura RN, Lu SY. (1995) Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress *Mol Brain Res* 30:37-47
- Ewing JF, Haber SN, Maines MD. (1992) Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: Hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J Neurochem* 58:4023-29
- Ewing JF, Maines MD. (1991) Rapid induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: Heme oxygenase-2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5364-58
- Ewing JF, Maines MD. (1992) In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: differential distribution of isozyme 1 and 2. *Mol Cell Neurosci* 3:4559-70
- Ewing JF, Maines MD. (1993) Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein in rat brain. *J Neurochem* 60:1512-19
- Ewing JF, Raju VS, Maines MD. (1994) Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3':5'-Guanosine monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther* 271:408-14
- Friebe A, Schultz G, Koesling D. (1996) Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15:6863-6868
- Furchgott RF, Jothianandan D. (1991) Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28:52-61
- Gagov H, Kadinov B, Hristov K, Boev K, Itzev D, Bolton T, Duridanova D. (2003) Role of constitutively expressed heme oxygenase-2 in the regulation of guinea pig coronary artery tone. *Pflugers Arch* 446:412-421

- Gaspard S, Chottard G, Mahy JP, Mansuy D. (1996) Study of the coordination chemistry of prostaglandin G/H synthase by resonance Raman spectroscopy. *Eur J Biochem* 238(2):529-37
- Glaum SR, Miller RJ. (1993) Zinc protoporphyrin-IX blocks the effects of metabotropic glutamate receptor activation in the rat nucleus tractus solitarii. *Molecular Pharmacology* 43:965-969
- Graser T, Vedernikov YP, Li DS. (1990) Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed Biochim Acta* 49:293-296
- Grozdanovic Z, Gossrau R. (1996) Expression of heme oxygenase-2 (HO-2)-like immunoreactivity in rat tissue. *Acta Histochem* 98:203-14
- Haider A, Olszanecki R, Gryglewski R, Schwartzman ML, Lianos E, Kappas A, Nasjletti A, Abraham NG. (2002) Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 300:188-94
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336(2):241-50
- Holt DC, Fedinec AL, Vaughn AN, Leffler CW. (2007) Age and species dependence of pial arteriolar responses to topical carbon monoxide in vivo. *Exp Biol Med* 232:1465-9
- Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. (1998a) Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 53(8):668-72
- Horváth I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. (1998b) Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 53(10):867-70

- Hu S, Kincaid JR. (1992) Resonance Raman studies of the carbonmonoxy form of catalase. Evidence for and effects of phenolate ligation. *FEBS Letters* 314:293-296
- Immenschuh S, Hinke V, Ohlmann A, Gifhorn-Katz S, Katz N, Jungermann K, Kietzmann T. (1998) Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 334:141-146
- Ingi T, Cheng J, Ronett GV. (1996) Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 16:835-842
- Ishikawa M, Kajimura M, Adachi T, Maruyama K, Makino N, Goda N, Yamaguchi T, Sekizuka E, Suematsu M. (2005) Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against NO-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ Res* 12:e104-14
- Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA. (2003) Heme oxygenase inhibitor restores arteriolar nitric oxide function in dahl rats. *Hypertension* 41(1):149-55
- Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA. (2004) Heme oxygenase-mediated endothelial dysfunction in DOCA-salt, but not in spontaneously hypertensive, rat arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5):H1681-7
- Johnson FK, Johnson RA. (2003) Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R536–R541
- Johnson FK, Johnson RA, Durante W, Jackson KE, Stevenson BK, Peyton KJ. (2006) Metabolic syndrome increases endogenous carbon monoxide production to promote hypertension and endothelial dysfunction in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(3):R601-8
- Johnson RA, Colombari E, Colombari DS, Lavesa M, Talman WT, Nasjletti A. (1997) Role of endogenous carbon monoxide in central regulation of arterial pressure. *Hypertension* 30(4):962-7

Johnson RA, Johnson FK. (2007) Heme oxygenase-derived endogenous carbon monoxide impairs flow-induced dilation in resistance vessels. *Shock* 2007 Aug 23 [Epub ahead of print]

Johnson RA, Lavesa M, Askari B, Abraham NG, Nasjletti A. (1995) A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension* 25:166-169

Johnson RA, Lavesa M, Deseyn K, Scholer MJ, Nasjletti A. (1996) Heme oxygenase substrates acutely lower blood pressure in hypertensive rats. *American Journal of Physiology* 271:H1132-H1138

Kanu A, Gilpin D, Fedinec AL, Leffler CW. (2006) Cyclooxygenase products stimulate carbon monoxide production by piglet cerebral microvessels. *Exp Biol Med* 231:181-5

Kim YM, Bergonia HA, Muller C, Pitt BR, Watkins WD, Lancaster JR. (1995) Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. *J Biol Chem* 270:5710-5713

Klatt P, Schmidt K, Mayer B. (1992) Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochemical Journal* 288:15-17

Kozma F, Johnson RA, Nasjletti A. (1997) Role of carbon monoxide in heme-induced vasodilation. *European Journal of Pharmacology* 323:R1-R2

Kozma F, Ligeti L, Monos E, Colombari E, Johnson RA. (1998) Heme-derived CO: Endogenous regulator of nitric oxide synthase? *Pathophysiology* 5:245

Kutty RK, Maines MD. (1981) Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J Biol Chem* 256:3956-3962

Kutty RK, Maines MD. (1984a) Effects of induction of heme oxygenase by cobalt and tin on the in vivo degradation of myoglobin. *Biochem Pharmacol* 18:2924-2926

Kutty RK, Maines MD. (1984b) Hepatic heme metabolism: possible role of biliverdin in the regulation of heme oxygenase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122:40-46

- Lacza Z, Erdös B, Görlach C, Wahl M, Sándor P, Benyó Z. (2000) The cerebrocortical microcirculatory effect of nitric oxide synthase blockade is dependent upon baseline red blood cell flow in the rat. *Neurosci Lett* 291:65-68
- Laitinen KSM, Salovaara K, Severgnini S, Laitinen JT. (1997) Regulation of cyclic GMP levels in rat frontal cortex in vivo: effect of exogenous carbon monoxide and phosphodiesterase inhibition. *Brain Res* 755:272-278
- Lee HU, Lee HJ, Park HY, Lee SH, Jang CG, Lee SY. (2001) Effects of heme oxygenase system on the cyclooxygenase in the primary cultured hypothalamic cells. *Arch Pharm Res* 24:607-12
- Leffler CW, Nasjletti A, Yu C, Johnson RA, Fedinec AL, Walker N. (1999) Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276:H1641-H1646.
- Levere RD, Martasek P, Escalante B, Schwartzman ML, Abraham NG. (1990) Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J of Clinical Invest* 86:213-219
- Liachenko S, Tang P, Hamilton RL, Xu Y. (2001) Regional dependence of cerebral reperfusion after circulatory arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1320-1329
- Lindén IB, Tokola O, Karlsson M, Tenhunen R. (1987) Fate of haem after parenteral administration of haem arginate to rabbits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39:96-102
- Li Volti G, Seta F, Schwartzman ML, Nasjletti A, Abraham NG (2003) Heme oxygenase attenuates angiotensin II-mediated increase in cyclooxygenase-2 activity in human femoral endothelial cells. *Hypertension* 41:715-9
- Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Saade GR, Goodrum L, Facchinetti F, Garfield RE. (1999) Effect of nitric oxide and carbon monoxide on uterine contractility during human and rat pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 181:981-988

- MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81(4):641-50
- Maines MD. (1984) New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *Crit Rev Toxicol* 12:241-314
- Maines MD. (1988) Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2:2557-68
- Maines MD. (2000) The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol* 46:573-85
- Maines MD, Eke BC, Zhao X. (1996a) Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat. *Brain Res* 722:83-94
- Maines MD, Mark J, Ewing J. (1993a) Heme oxygenase, a likely regulator of cGMP production in the brain: Induction in vivo of HO-1 compensates for depression in NO synthase activity. *Mol Cell Neurosci* 4:398-405
- Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK. (1993b) Induction of kidney HO-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia: possible role of heme as both promoter of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 264:457-62
- Maines MD, Plevoda BV, Huang TJ, McCoubrey WK. (1996b) Human biliverdin IX alpha reductase is a zinc-metalloprotein. Characterization of purified and Escherichia coli expressed enzymes. *Eur J Biochem* 235:372-381
- Makino R, Matsuda H, Obayashi E, Shiro Y, Iizuka T, Hori H. (1999) EPR characterization of axial bond in metal center of native and cobalt-substituted guanylate cyclase. *J Biol Chem* 274:7714-7723
- Mancuso C, Pistrutto G, Tringali G, Grossman AB, Preziosi P, Navarra P. (1997) Evidence that carbon monoxide stimulates prostaglandin endoperoxide synthase activity in rat

hypothalamic explants and in primary cultures of rat hypothalamic astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 45:294-30

Mancuso C, Tringali G, Grossman A, Preziosi P, Navarra P. (1998) The generation of nitric oxide and carbon monoxide produces opposite effects on the release of immunoreactive interleukin-1beta from the rat hypothalamus in vitro: evidence for the involvement of different signaling pathways. *Endocrinology* 139:1031-7

Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. (1991) Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends in Pharmacological Sciences* 12:185-188

Martasek P, Schwartzmann ML, Goodman AL, Solangi KB, Lever RD, Abraham NG. (1991) Hemin and L-arginine regulation of blood pressure in spontaneous hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 2:1078-1084

Matsuoka A, Stuehr DJ, Olson JS, Clark P, Ikeda-Saito M. (1994) L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 269:20335-20339

Matz P, Turner C, Weinstein PR, Massa SM, Panter SS, Sharp FR. (1991) Heme oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* 713:211-22

Mayevsky A, Meilin S, Rogatsky GG, Zarchin N, Thom SR. (1995) Multiparametric monitoring of the awake brain exposed to carbon monoxide. *J Appl Physiol* 78:1188-1196

McCoubey Jr WK, Huang TJ, Maines MD. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry* 247:725-732

McGrath JJ, Smith DL. (1984) Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* 177:132-136.

McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BSS. (1992) Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11141-11145

- McMillan K, Masters BSS. (1995) Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* 34:3686-3693
- Meilin S, Mendelman A, Sonn J, Manor T, Zarchin N, Mayevsky A. (1999) Metabolic and hemodynamic oscillations monitored optically in the brain exposed to various pathological states. *Adv Exp Med Biol* 471:141-146
- Mersich T, Szelke E, Erdos B, Lacza Z, Komjáti K, Sándor P. (2007) Somatosensory pain does not affect total cerebral blood volume. *Neuroreport* 18:649-52
- Moncada S, Higgs EA. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB Journal* 9:1319-1330
- Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. (1996a) NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270:H107-H114
- Motterlini R, Hidalgo A, Sammut I, Shah KA, Mohammed S, Srai K, Green CJ. (1996b) A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 225:167-172
- Necchi D, Virgili M, Monti B, Contestabile A, Scherini E. (2002) Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. *Brain Res* 933(1):31-41
- Pannen BH, Bauer M. (1998) Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci* 62:2025-2033
- Parfenova H, Zuckerman S, Leffler CW. (1995) Inhibitory effect of indomethacin on prostacyclin receptor-mediated cerebral vascular responses. *Am J Physiol* 268(5Pt2):H1884-90
- Penney DG. (1988) Hemodynamic response to carbon monoxide. *Environmental Health Perspectives* 77:121-130

- Percival MD, Ouellet M, Vincent CJ, Yergey JA, Kennedy BP, O'Neill GP. (1994) Purification and characterization of recombinant human cyclooxygenase-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:111-118
- Premkumar DRD, Smith MA, Richey PL, Petersen RB, Castellani R, et al. (1995) Induction of heme oxygenase-1 in mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65:1399-402
- Pucci ML, Chakkalakkal B, Liclican EL, Leedom AJ, Schuster VL, Abraham NG. (2004) Augmented heme oxygenase-1 induces prostaglandin uptake via the prostaglandin transporter in micro-vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (4):1299-305
- Pufahl RA, Marletta MA. (1993) Oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase: evidence for the involvement of the heme in catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193:963-970
- Quan S, Yang L, Shnouda S, Schwartzman ML, Nasjletti A, Goodman AI, Abraham NG (2004) Expression of human heme oxygenase-1 in the thick ascending limb attenuates angiotensin II-mediated increase in oxidative injury. *Kidney Int* 65:1628-39
- Raff H, Jankowski B. (1994) Inhibition of aldosterone release by hypoxia in vitro: interaction with carbon monoxide. *Journal of Applied Physiology* 76:689-693
- Raju VS, Maines MD. (1996) Renal ischemia/reperfusion in rats upregulates HO-1 (HSP32) expression and increases cGMP in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1814-22
- Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. (1989) Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 243:388-390
- Sándor P, Petty M, de Jong W, Palkovits M, de Wied D. (1991) Hypothalamic blood flow autoregulation remains unaltered following surgical and pharmacological blockade of central vasopressin. *Brain Res* 566(1-2):212-8

- Scapagnini G, D'Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D, Cavallaro S. (2002) Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res* 954(1):51-9
- Schmidt HH. (1992) NO., CO. and OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Letters* 307:102-107
- Seki T, Naruse M, Naruse K, Yoshimoto T, Tanabe A, Imaki T, Hagiwara H, Hirose S, Demura H. (1997) Interrelation between nitric oxide synthase and heme oxygenase in rat endothelial cells. *Eur J Pharm* 331:87-91
- Smith WL, Marnett LJ (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1083:1-17
- Steinhorn RH, Morin FC, Russell JA. (1994) The adventitia may be a barrier specific to nitric oxide in rabbit pulmonary artery. *J Clin Invest* 94:1883-1888
- Stone JR, Marletta MA. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33:5636-5640
- Stone JR, Marletta MA. (1998) Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem Biol* 5:255-261
- Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. (1990) Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain: Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 265:8212-17
- Szelke E, Varbiro S, Mersich T, Banhidy F, Szekacs B, Sandor P, Komjati K. (2005) Effects of estrogen and progestin on hypothalamic blood flow autoregulation. *J Soc Gynecol Investig* 12(8):604-9
- Takahashi K, Hara E, Suzuki H, Sasano H, Shibahara S. (1996) Expression of heme oxygenase isozyme mRNAs in the human brain and induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J of Neurochemistry* 67:482-489

- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 244:6388-6394
- Tenhunen R. (1972) Method for microassay of microsomal heme oxygenase activity. *Analytical Biochemistry* 45:600-607
- Teran FJ, Johnson RA, Stevenson BK, Peyton KJ, Jackson KE, Appleton SD, Durante W, Johnson FK. (2005) Heme oxygenase-derived carbon monoxide promotes arteriolar endothelial dysfunction and contributes to salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3):R615-22
- Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. (1999) Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F882–F889
- Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. (1988) Resolution of the rat brain heme oxygenase activity: absence of a detectable amount of the inducible form (HO-1). *Arch Biochem Biophys* 260:732–39
- Turnbull AV, Kim CK, Lee S, Rivier CL. (1998) Influence of carbon monoxide, and its interaction with nitric oxide, on the adrenocorticotropin hormone response of the normal rat to a physico-emotional stress. *J of Neuroendocrinology* 10:793-802
- Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Tringali G, Preziosi P, Navarra P. (2001) A functional link between heme oxygenase and cyclo-oxygenase activities in cortical rat astrocytes. *Biochem Pharmacol* 61:437-41
- Vedernikov YP, Graser T, Vanin AF. (1989) Similar endothelium-independent arterial relaxation by carbon monoxide and nitric oxide. *Biomed Biochim Acta* 48:601-603
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259:381-84
- Villamor E, Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Conde-Oviedo J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez JG, Tamargo J. (2000) Relaxant effects of carbon monoxide compared with nitric oxide in pulmonary and systemic vessels of newborn piglets. *Pediatr Res* 48:546-553.

- Vogel KM, Hu S, Spiro TG, Dierks EA, Yu AE, Burstyn JN. (1999) Variable forms of soluble guanylyl cyclase: protein-ligand interactions and the issue of activation by carbon monoxide. *J Biol Inorg Chem* 4:804-813
- Vreman HJ, Lee OK, Stevenson DK. (1991) In vitro and in vivo characteristics of a heme oxygenase inhibitor: ZnBG. *American Journal of the Medical Sciences* 302:335-341
- Wada A, Ohnishi T, Nonaka Y, Okamoto M, Yamano T. (1985) Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-450_{11β} from bovine adrenocortical mitochondria. *Journal of Biochemistry* 98:245-256
- Wang R, Wang Z, Wu L. (1997) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 121:927-934
- Weber CM, Eke BC, Maines MD. (1994) Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J Neurochem* 63:953-62
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng G, Huang F, Xu D, Muller W, Moncada S, Leiw FY. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411
- Weiss G, Werner-Felmayer G, Werner ER, Grünewald K, Wachter H, Hentze MW. (1994) Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med* 180:969-976
- Werkstrom V, Ny L, Persson K, Andersson KE. (1997) Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* 120:312-318
- White KA, Marletta MA. (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31:6627-6631
- Woods MJ, Williams DC. (1996) Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem Pharmacol* 52(12):1805-14

Xie QW, Leung M, Fuorites M, Sassa S, Nathan C. (1996) Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4891-96

Yet SF, Pellacani A, Patterson C, Tan L, Folta SC, Foster L, Lee W-S, Hsieh C-M, Perella MA. (1997) Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock. *The Journal of Biological Chemistry* 272(7):4295-4301

Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH. (1996) Heme oxygenase 2: Endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:795-98

Zuckerman SL, Armstead WM, Hsu P, Shibata M, Leffler CW. (1996) Age dependence of cerebrovascular response mechanisms in domestic pigs. *Am J Physiol* 271(2Pt2):H535-40

X. Saját közlemények jegyzéke

X./1. Az értekezés témájában írt saját közlemények és idézhető előadáskivonatok

Horváth B, Hrabák A, Káldi K, Sándor P, Benyó Z. (2003) Contribution of the heme oxygenase pathway to the maintenance of hypothalamic blood flow during diminished NO synthesis. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 2003; 23(6):653-7 **IF: 5,37**

Ishiguro M, *Horváth B, Lenzsér G, Hermán P, Horváth EM, Sándor P, Benyó Z.* (2007) Influence of the heme oxygenase pathway on the cerebrocortical blood flow under physiological conditions and during hypoxia/hypercapnia. **Neuroreport** 2007; 18(11): 1193-1197 **IF: 2,137 (2006)**

Horváth B, Hrabák A, Johnson RA, Sándor P, Benyó Z. (2001) Heme oxygenase blockade increases nitric oxide synthase activity without changing blood flow or vascular resistance in the hypothalamus of rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2001; 21: S205 (XXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 2001, Taipei, Taiwan)

Horváth B, Hrabák A, Káldi K, Johnson FK, Sándor P, Benyó Z. (2002) The role of endogenous carbon monoxide (CO) and its interaction with nitric oxide (NO) in the cerebral circulation. **Acta Physiologica Hungarica** 2002; 89:58 (International Congress of Pathophysiology, June 2002, Budapest, Hungary)

Horváth B, Ishiguro M, Hrabák A, Káldi K, Lacza Z, Sándor P, Benyó Z. (2003) Interaction between the heme oxygenase and nitric oxide synthase pathways in the regulation of the resting CBF. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 2003; 23:S77 (XXIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 2003, Calgary, Canada)

Horváth B, Ishiguro M, Lenzsér G, Hermán P, Hrabák A, Káldi K, Sándor P, Benyó Z. (2004) Interaction between the heme oxygenase (HO) and NO synthase pathways in the regulation of the resting CBF. **FASEB Journal** 2004; 18: A268 (Experimental Biology 2004, April 2004, Washington, DC, USA)

Horváth B, Ishiguro M, Hortobágyi L, Lenzsér G, Hermán P, Hrabák A, Káldi K, Sándor P, Benyó Z. (2004) Role of heme oxygenase pathway in the regulation of the resting CBF. **Acta Physiologica Hungarica** 2004; 91:302-303 (Magyar Élettani Társaság 68. Vándorgyűlése, 2004 Június, Debrecen)

Horváth B, Hortobágyi L, Sándor P, Benyó Z. (2005) Interactions between the heme oxygenase, cyclooxygenase and nitric oxide synthase pathways in the regulation of the resting hypothalamic blood flow. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 2005; 25:S187 (XXII. International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 2005, Amsterdam, The Netherlands)

Hortobágyi L, Kis B, Hrabák A, *Horváth B*, Sándor P, Busija DW, Benyó Z. (2005) Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide synthase blockade **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 2005; 25:S206 (XXII. International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 2005, Amsterdam, The Netherlands)

X./2. Egyéb közlemények és előadások

Horváth B, Órsy P, Benyó Z. (2005) Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** 2005; 45(3):225-231 **IF: 1,313**

Hortobágyi L, Kis B, Hrabák A, *Horváth B*, Huszty G, Schweer H, Benyó B, Sándor P, Busija DW, Benyó Z. (2007) Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent of vasodilator prostanoids. **Brain Research** 2007; 1131(1):129-137 **IF: 2,341 (2006)**

Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Órsy P, *Horváth B*, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind S, Offermanns S. (2008) G12/G13-LARG-mediated signalling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. **Nature Medicine** 2008; 14(1):64-8 **IF: 28,588 (2006)**

Órsy P, *Horváth B*, Offermanns S, Benyó Z. (2004) Endothelial-dependent relaxations of the mouse thoracic aorta **Acta Physiologica Hungarica** 2004; 91:343-344 (Magyar Élettani Társaság 68. Vándorgyűlése, 2004 Június, Debrecen)

Horváth B, Órsy P, Benyó Z. (2005) Endothelial-dependent relaxations of the mouse thoracic aorta FASEB Journal 2005; 19:A1553 (Experimental Biology 2005, XXXV. IUPS, April 2005, San Diego, CA; USA)

XI. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Benyó Zoltánnak folyamatos szakmai segítségéért, feltétlen támogatásáért és türelméért. Személyében egy emberi nagyságot, egy példamutató jellemet ismerhettem meg, és ő az, akinek minden elért eredményemet köszönhetem.

Köszönöm dr. Sándor Péter professzor úrnak, hogy diákkörösként kísérletes munkámat a laborjában végezhettem és odafigyelő támogatásával segítette munkámat.

Köszönöm a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet jelenlegi és volt vezetőjének, dr. Kollai Márk és dr. Monos Emil professzor uraknak, hogy ideális feltételeket biztosítottak kísérleteim elvégzéséhez, értékes tanácsaikkal gazdagították a munkámat és támogatásukról biztosítottak.

Közvetlen munkatársaim közül Hortobágyi László, Dr. Hrabák András, Dr. Káldi Krisztina, Dr. Leszl-Ishiguro Miriam, Dr. Órsy Petra és Dr. Ruisanchez Éva járultak hozzá munkám sikeréhez. Segítségüket hálásan köszönöm.

Köszönöm Harvichné Velkei Máriának, Kovács Hajnalkának Sámson Szilviának és az igényes technikai segítségét, Németh Gyulának pedig a műszaki és technikai háttér kreatív megteremtését. Köszönettel tartozom a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet valamennyi munkatársának a kutatómunkához nyújtott hasznos és önzetlen támogatásért.

Köszönet illeti végül, de nem utolsósorban a családomat és kedvesemet, kitartó türelmükért és belém vetett bizalmukért, amely elengedhetetlen volt munkám elvégzéséhez.