

# A hem – hem-oxigénáz – szénmonoxid rendszer szerepe az agyi véráramlás szabályozásában

Doktori tézisek

**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. Várbiro 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

## I. Bevezetés

A hem-oxigenáz (HO) katalizálta hem lebontás az endogén szénmonoxid (CO) keletkezésének legfontosabb útja. Ebben a reakcióban a hem equimoláris mennyiségű vasra, biliverdinre és szénmonoxidra bomlik. A vas elsősorban az új hem szintézisében használdik fel, a biliverdin pedig igen gyorsan bilirubinná alakul a nagy feleslegben jelenlévő bilirubin-reduktáz által. 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. A HO-1, vagy más néven hő-sokk fehérje 32, nehézfémek hatására és minden olyan stimulusra és ágensre indukálódik, amik oxidatív stresszt és egyéb patológiás állapotokat okoznak, mint például a hő-sokk, iszkémia, glutation-deplécio, sugárzás, hipoxia, hiperoxia, és sejtttranszformációs állapotokban is fokozódik az expressziója. Tény, hogy jelenleg nincs még egy enzim, ami ilyen sok, különböző típusú behatásra tudna reagálni, mint a HO-1. 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, újabb eredmények alapján úgy tűnik, hogy nincs is funkcionális HO-3 gén, a felfedezett gének csak intron nélküli pszeudogénjei a HO-2-nek.

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 reakcióút direkt érhatásokkal is rendelkezik és befolyásolhatja más keringésszabályozó mechanizmusok, például a ciklooxigenáz (COX) és nitrogén monoxid szintáz (NOS) rendszerek működését. Mindezek ellenére az endogén szénmonoxid szerepe az agyi vérkeringés szabályozásában alig ismert.

## II. Célkitűzések

A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer az agyi véráramlás szabályozásában játszott szerepével kapcsolatban a következőképpen kívántuk tisztázni:

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

### **III. Kísérleti módszerek**

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 analíziséhez. 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.

A regionális agyi véráramlást a hypothalamusban Auckland H<sub>2</sub>-gáz clearance módszerével határoztuk meg. Kísérleteink során a H<sub>2</sub>-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 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.

A parietális agykéreg területén lézer Doppler áramlásmérést használtunk. Az állatok koponyáját egy sztereotaxikus fejtartóban rögzítettük. A parietális régióban megnyitottuk a fejbőrt, majd a csontot egy fúróval 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 kétsatornás LD áramlásmérővel mértük és rögzítettük folyamatosan a kísérlet folyamán. Az LD szondákat minden kísérlet előtt kalibráltuk egy latex emulzió segítségével. A lézertény az infravörös tartományban (780 nm) volt, és körülbelül 1 mm mélységig hatolt be az agyba, egy megközelítőleg 7 mm<sup>2</sup>-es területét fedve le a parietális agykéregnek.

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 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 hypothalamikus NOS aktivitásra a jelölt L-arginin citrullinná való átalakulásának sebességéből következtettünk, a liquor (CSF) prosztanoid szintjeit gáz kromatográfia/triple-quadrupol tömegspektográfiával (GC-MS-MS) mértük, míg a CSF cGMP szintjét enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg a gyártó cég utasításait követve.

In vitro kísérleteinkhez mély éter altatásban gyorsan elvéreztetett hím Wistar patkányokból kiperaráltuk 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 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 % O<sub>2</sub> és 5 % CO<sub>2</sub> keverékével átbuborékolgatott Krebs oldatban helyezkedett el. A standard Krebs oldat összetétele a következő: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl,

2,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,17 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,027 mM EDTA, 11 mM glükóz. Az ereket 60 percig inkubáltuk 1,5-2 mN előfeszítéssel miközben az inkubáló oldatot 20 percenként cseréltük, a szervfürdőket felmelegítettük szobahőmérsékletre 37 °C-ra. A kísérlet kezdetén és végén meghatároztuk a maximális depolarizációra adott kontrakciós választ 124 mM  $\text{K}^+$ -ot tartalmazó Krebs oldat segítségével. Az ereket 10  $\mu\text{M}$   $\text{PGF}_2$ -val feszítettük elő, majd 10  $\mu\text{M}$  ZnDPBG és 10  $\mu\text{M}$  bradikinin hatását teszteltük

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

A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid reakciót tanulmányozásához cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikolt (ZnDPBG) 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 hogy az általunk használt dózis intraperitoneálisan az állatba juttatva, átjut a vér-agy gáton és jelentősen gátolja az agyi hem-oxigenáz aktivitást. Ennek igazolására a saját kísérleti körülményeink között patkányok egy csoportját ZnDPBG-vel, a másikat ennek vehikulával (fiziológiás sóoldat) kezeltük. 30 perccel később az agyi endogén szénmonoxid termelést szilárd fázisú gáz kromatográfiával határoztuk meg.

Az L-arginin-nitrogén monoxid reakciót a nitrogén monoxid szintáz (NOS) specifikus gátlószereivel, 50 mg/kg  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME) gátoltuk, amely átjut a vér-agy gáton, és jelentősen csökkenti az enzim aktivitását. Az L-NAME-t fiziológiás sóoldatban oldottuk és intravénásan adagoltuk.

A ciklooxygenáz (COX) enzimet 10 mg/kg diklofenákkal gátoltuk, melyet fiziológiás sóoldatban oldottunk, és intravénásan adagoltunk. Az általunk használt dózis az irodalmi adatok szerint jelentősen csökkenti az agy prosztanoid termelését patkányban. 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.

A szövegben, a 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,  $45\mu\text{mol/kg}$ ) 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, nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán és nem volt különbség a kísérleti csoportok között a vizsgált időtartamban. A kiindulási HBF hasonló volt a két kísérleti csoportban ( $103\pm 3$  vs  $108\pm 9$  ml/100g/min), és sem a fiziológiás sóoldat, sem a ZnDPBG nem okozott szignifikáns áramlásváltozást.

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. Méréseinkben a kísérleti csoportok között nem volt különbség a liquor cGMP szintjében ( $451\pm 165$  vs  $569\pm 148$  pmol/L).

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 ( $4,6\pm 0,9$  vs  $2,5\pm 0,4$  mikromol CO/kg szövet/óra,  $p=0,025$ , 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  
nitrogén monoxid szintázzal 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 ( $2,5\pm 0,4$  vs  $4,2\pm 0,9$  pmol citrullin/mg fehérje/perc,  
( $p<0,001$ , 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  
agyai 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.

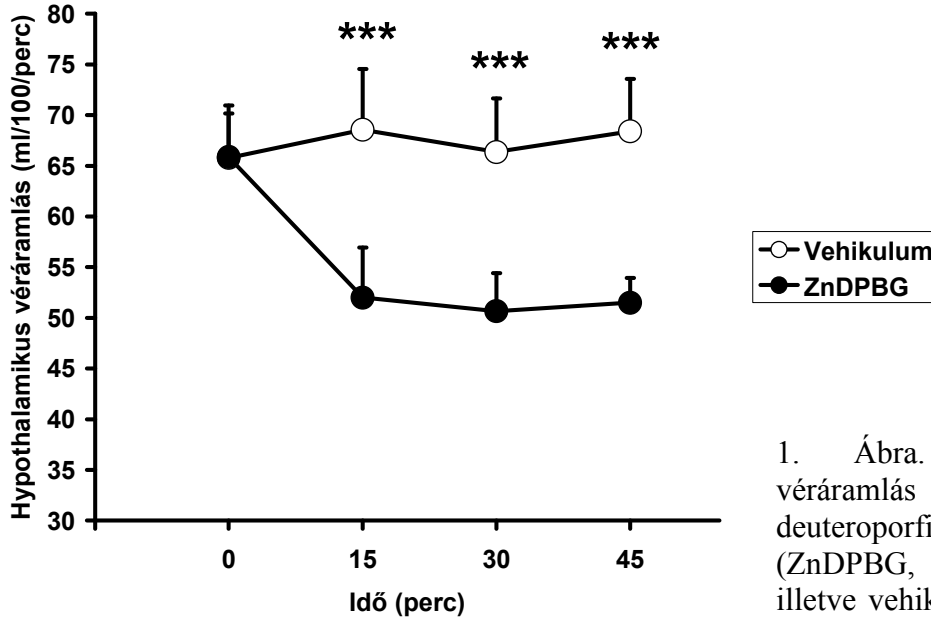
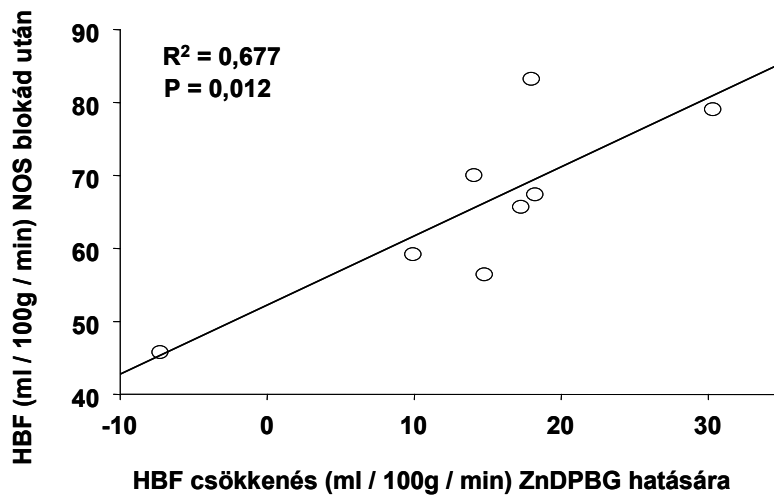
Ezen csoportokban a kezdeti nyugalmi áramlásmérés után az állatok 50 mg/kg L-  
NAME-t kaptak intravénásan. Az állatok egy csoportja ( $n=9$ ) vehikulum-kezelt  
kontrollként szolgált, és az L-NAME adagolás után 30 perccel intraperitonálisan fiziológiás  
sóoldatot kapott. Az állatok második csoportjában ( $n=8$ ) 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, és nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán egyik kísérleti csoportban sem.

Az L-NAME előkezelés szignifikánsan megnövelte az artériás középnyomást ( $105 \pm 7$  vs.  $138 \pm 6$  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 ( $96 \pm 9$  vs.  $67 \pm 5$  ml/100g/perc,  $p < 0,001$ , Student-féle páratlan t-teszt). A már jelentősen csökkent HBF tovább csökkent a ZnDPBG kezelés hatására, míg a fiziológiás sóoldat alkalmazása nem befolyásolta a HBF-et (1A. ábra). Ezen felül szignifikáns lineáris korrelációt találtunk a NOS gátlás utáni HBF értékek és ezek csökkenése között HO-gátlást követően (1B. ábra). Ez az összefüggés arra utal, hogy a HBF jobban megtartott maradt azokban az NO-hiányos állatokban akik nagyobb hypothalamikus HO-aktivitással rendelkeznek.



**A****B**

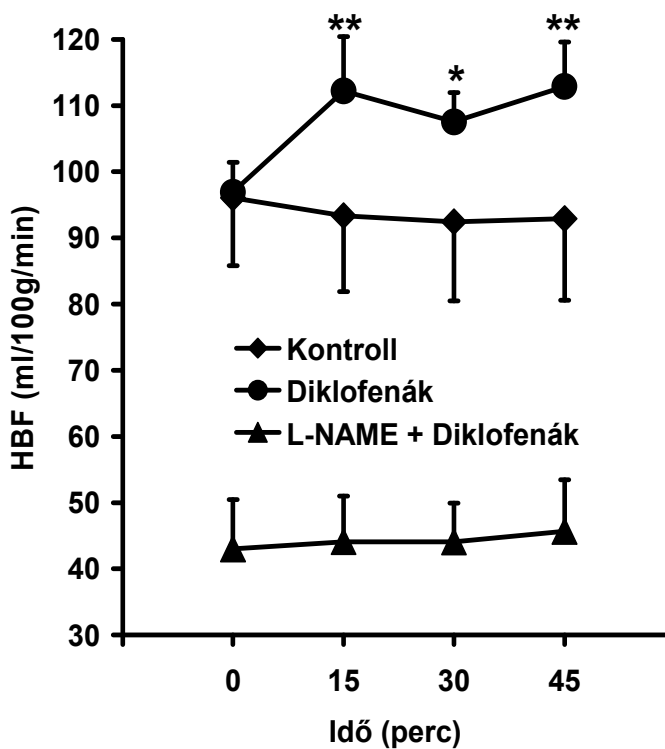
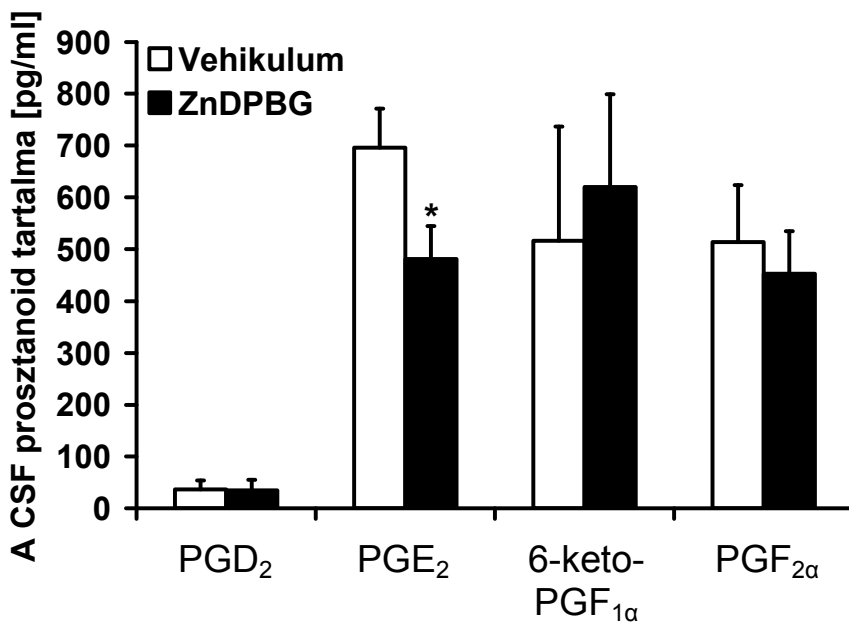
1. Ábra. (A) Hypothalamikus véráramlás a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45 $\mu$ mol/kg, fekete, n=8) illetve vehikuluma (fiziológiás sóoldat, fehér, n=9) intraperitoneális alkalmazása előtt (0. perc) és után 15, 30, 45 perccel N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil észterrel (L-NAME) előkezelt állatokban, \*\*\*P<0,001 vs 0. perc (repeated measurement ANOVA és Fisher-féle protected LSD post-hoc teszt) (B) 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 ciklooxigenáz-prosztanoid rendszerrel a hypothalamus véráramlásának szabályozásában**

Irodalmi adatok szerint a hem-oxigenáz befolyásolja az agyi prosztanoid-szintézist in vitro agyszeleteken és sejt kultúrákon. Kísérleteink első szakaszában azt vizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás megfigyelhető-e in vivo is. A HO-blokád jelentősen csökkentette a CSF PGE<sub>2</sub> tartalmát, azonban érdekes módon nem befolyásolta a többi prosztanoid (PGD<sub>2</sub>, a PGI<sub>2</sub> metabolit 6-keto-PGF<sub>1α</sub> és PGF<sub>2α</sub>) szintjét a CSF-ben (2A. ábra).

Ezek az eredmények a korábbi in vitro megfigyelésekkel együtt arra utalnak, hogy a hem-oxigenáz reakcióút konstitutívan és szelektíven stimulálja a PGE<sub>2</sub> 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 (10mg/kg diklofenák iv.) COX-aktivitás mellett. A kísérleti csoportokban a légzési és sav-bázis paraméterek a fiziológiás tartományban voltak, 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 (2B. 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 PGE<sub>2</sub> 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.



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

(B) Hypothalamikus véráramlás a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45  $\mu$ 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<sup>G</sup>-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).

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, azonban ez az emelkedett vérnyomás a kísérlet folyamán már nem változott ( $p < 0,001$  vs. vehikulum, one-way ANOVA, Dunett-féle post-hoc teszt). A ZnDPBG-nek nem volt hatása az állatok HBF-jére ebben a kísérleti csoportban (2B. ábra).

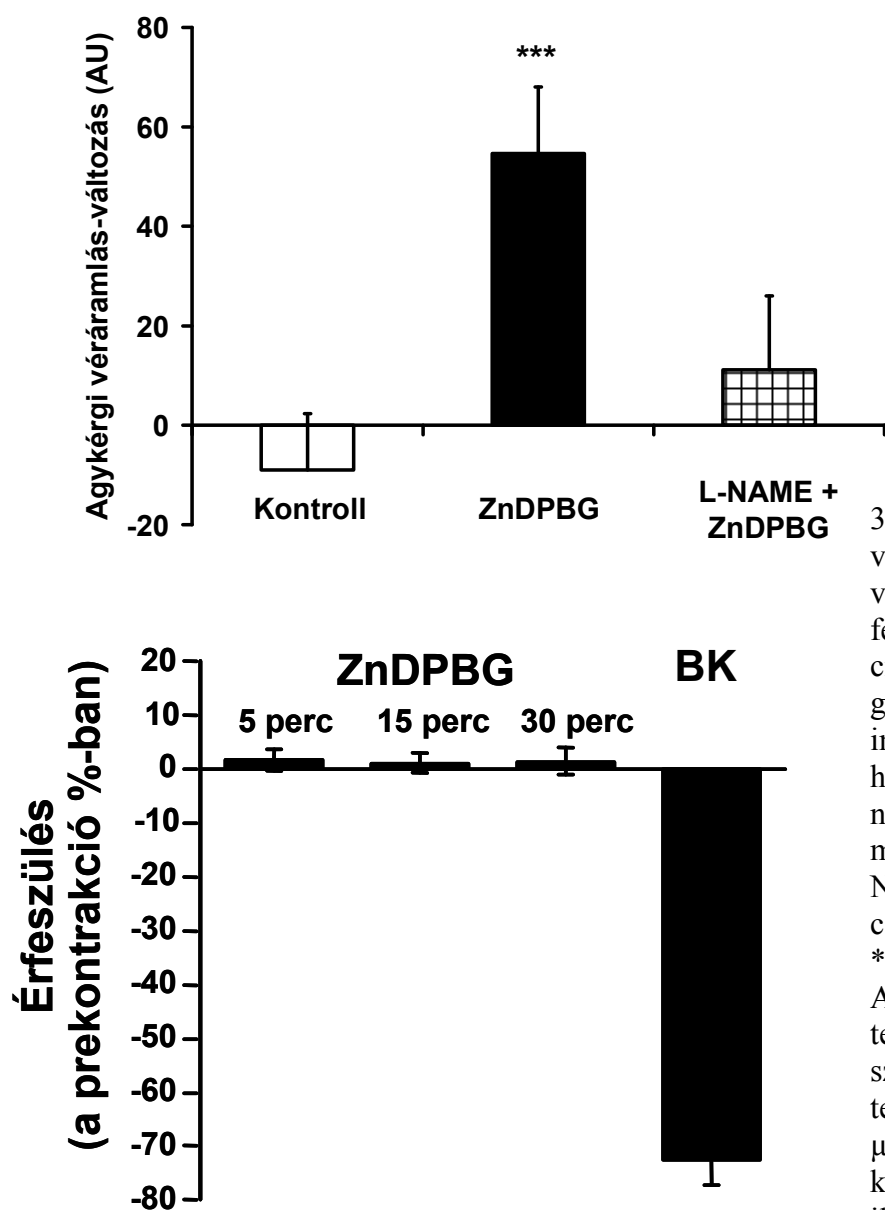
#### **IV./4. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer szerepe az agykéreg véráramlásának szabályozásában**

A hem-oxigenáz illetve NOS aktivitás jelentősen eltér a különböző agyi régiókban, 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, és nem változtak szignifikánsan a kísérlet folyamán. Az L-NAME előkezelés megnövelte az artériás középnyomást, azonban ez az emelkedett vérnyomás a kísérlet folyamán már nem változott. A megemelkedett vérnyomás ellenére a kezdeti CBF jelentősen alacsonyabb volt, mint az előkezeletlen csoportokban ( $348 \pm 16$  vs.  $249 \pm 23$  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 (3A. ábra). A NOS gátlása L-NAME-mel teljes mértékben kivédte a HO-blokád okozta áramlásnövekedést (3A. ábra).

In vitro is megvizsgáltuk a parietális kérget ellátó arteria cerebri medián (MCA) a HO-gátlás hatását. A ZnDPBG (10  $\mu$ M) nem befolyásolta az izolált MCA szegmentek tónusát (3B. ábra), azonban 10 $\mu$ M bradikinin szignifikáns vazodilatációt okozott igazolva az endotélium funkcionális épségét (3B. ábra).



3. Ábra (A) A parietális agykéreg véráramlásának változása vehikulum (fiziológiás sóoldat, fehér, n=6), illetve a HO-gátló cink deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45  $\mu$ mol/kg) intraperitoneális alkalmazásának hatására előkezeletlen (fekete, n=8) illetve N<sup>G</sup>-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) (B) Arteria cerebri media szegmentek in vitro tenzióváltozása HO-gátlás (10  $\mu$ M ZnDPBG) után az adását követő 5., 15. és 30. percben, illetve 10  $\mu$ 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.

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 iszkémia 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 iszkémia/reperfúzió során.

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. 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 is. 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.

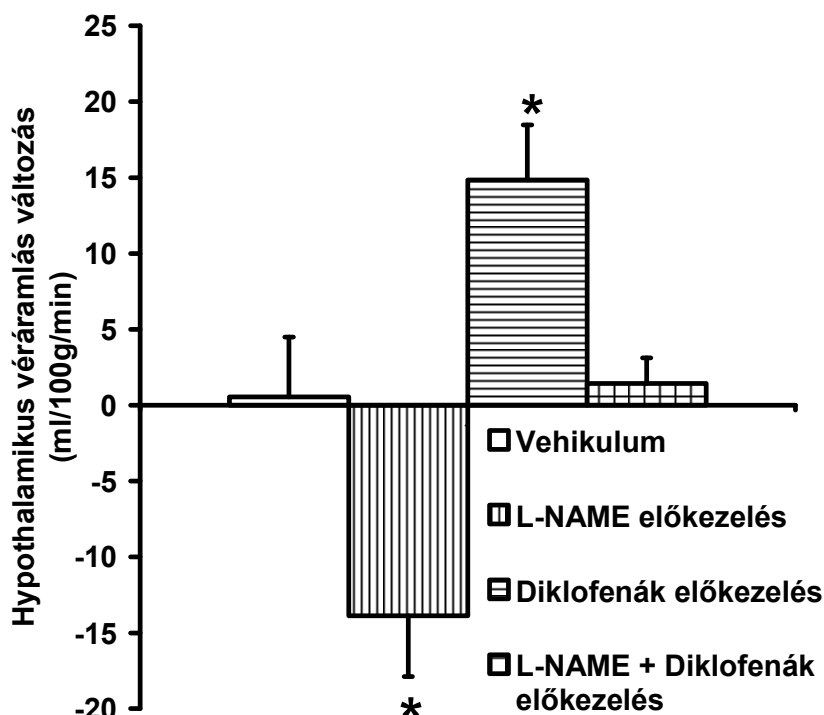
#### **V./2. A hem – hem-oxigenáz – szénmonoxid rendszer kölcsönhatása a ciklooxygenáz-prosztanoid rendszerrel a hypothalamikus véráramlás szabályozásában**

Megfigyeléseink alapján úgy tűnik, hogy a HO-reakcióút vazodilatációs hatását a PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> szintézis aktivátora, mivel kimutatták, hogy ezen metabolitok stimulálják a PGE<sub>2</sub> termelését patkány hypothalamikus sejt kultúrákban in vitro. Ezek a megfigyelések és az, hogy a HO reakcióút nem befolyásolja az agyi mikroerek PGE<sub>2</sub> termelését egyértelműen arra utal, hogy az agyi parenchyma sejtjeinek PGE<sub>2</sub> termelése közvetíti a konstitutív HO aktivitás vazorelaxáns hatását; ebből kifolyólag nem meglepő, hogy exogén szénmonoxid relaxálta a

patkány piális artériákat in vivo, azonban in vitro hatástalan volt, és kísérleteinkben sem volt hatása a HO gátlásnak in vitro körülmények között.

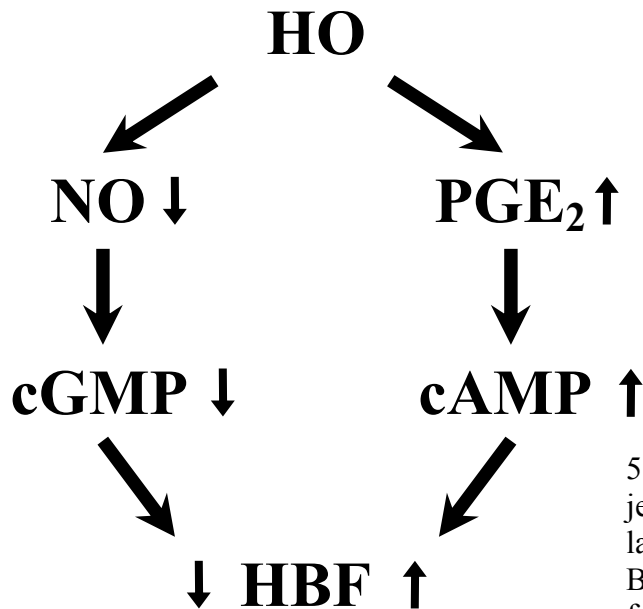
A különböző kísérletsorozataink eredményét összegző 4A. ábrán látható, hogy a ZnDPBG-vel kiváltott HO-gátlás nem befolyásolja a hypothalamikus véráramlást nyugalmi körülmények között, azonban csökkenti a HBF-t NOS gátlás után és növeli azt COX-blokád után. Egyidejű NOS és COX gátlás után a ZnDPBG nem befolyásolja a HBF-et. A megfigyeléseink alapján felállítható következtetéseket összegzi a 5. ábra.

Úgy tűnik, hogy a HO-reakcióútnak nincsen közvetlen cerebrovaszkuláris hatása felnőtt patkányokban, azonban képes mind növelni (PGE<sub>2</sub>-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.



4. Ábra Hypothalamikus véráramlás változása a HO-gátló zinc deuteroporfirin 2,4-bisz glikol (ZnDPBG, 45  $\mu$ mol/kg) intraperitoneális alkalmazása után vehikulummal (fiziológias sóoldat, fehér, n=8) N<sup>G</sup>-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).





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

Endoteliális diszfunkció esetén például, amikor az NO termelés jelentősen lecsökken, a PGE<sub>2</sub>-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, mind pedig az agyi parenchyma sejtjei képesek termelni, és úgy tűnik, hogy a másodlagos PGE<sub>2</sub> termelés is származhat nem-vaszkuláris sejtekből (lásd fent). Így a HO-CO-PGE<sub>2</sub>-cAMP reakcióút 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, a hem-oxigenáz általi hem degradáció negatívan befolyásolhatja a COX aktivitását. Ezzel összhangban, a HO-1 indukció csökkenti a COX expresszióját és aktivitását endotélsejtekben és a vesében. Továbbá, a hem-oxigenáz indukciója endotélsejtekben megnöveli a prosztaglandin transzporter expresszióját és így növeli a prosztaglandinok clearance-ét. Az eredmények alapján a konstitutív HO aktivitás az agyban nem okoz ilyen

hatásokat, mivel a PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> csökkent termelése és a PGE<sub>2</sub> illetve PGI<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub>-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. Saját közlemények jegyzéke

### VII./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)

## VII./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 JS, 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)