

A lizofoszfatidsav szerepe az értónus szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Ruisanchez Éva

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Benyó Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kékesi Violetta, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Attila, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bérczi Viktor, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Radovits Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Mohácsi Attila, Ph.D., c. egyetemi docens

Budapest
2017

1. BEVEZETÉS

A lizofoszfátidsav (LPA) egy bioaktív lipid mediátor, melyben a glicerín vázhoz egy foszfátcsoport és valamilyen zsírsav kapcsolódik. A vegyületsalád több tagja is széles körben előfordul az élővilágban, hatásait elsősorban az LPA₁₋₆ nevű G-fehérjéhez kapcsolt receptorok közvetítik, de képes aktiválni a PPAR γ sejtmagi receptort is. Az LPA számos élettani és kórélettani folyamatban játszik szabályozó szerepet, mint pl. az idegrendszer fejlődése, gyulladásos folyamatok, férfi és női reprodukzív működések, az embrió beágyazódása, a csontanyagcsere szabályozása, vagy a tumorok terjedése. Szintéziséért elsősorban egy extracelluláris foszfolipáz D, az autotaxin (ATX) felelős, lebontását pedig lipid foszfát-foszfátázok végzik. Az LPA termelődik és degradálódik az érrendszerben, és a legtöbb vér- és érsejtre kifejt valamilyen hatást. A vérplazmában koncentrációja nyugalmi körülmények között az alacsony-közepes nanomoláris tartományban van, ám vérlemezke aktiváció hatására akár a 10 mikromólos nagyságrendet is elérheti. Érrendszeri hatásai közül messze legtöbbet tanulmányozott – és óriási klinikai relevanciájú – szerepe az ateroszklerózis és a trombózis kialakulásában van, de nem elhanyagolható az ATX-LPA tengely jelentősége az érrendszer fejlődésében, a tumor angiogenezisben, az érpermeabilitás- és az értónus szabályozásában sem.

A lizofoszfátidsavat éppen az érrendszeri hatásai kapcsán fedezte fel Tokumura és munkacsoportja 1978-ban, amikor megfigyelték, hogy átmeneti, szimpatikus aktivációtól független vérnyomásemelkedést vált ki altatott patkányokban. Később leírták, hogy az LPA vérnyomásra kifejtett hatása erősen függ a kísérleti állat fajtától, bizonyos fajokban éppen vérnyomás csökkenést hoz létre. Májig nincs irodalmi adat arról, hogy az LPA vérnyomásra kifejtett hatása közvetlen érhatás miatt alakul-e ki. Tigyi Gábor és

munkacsoportja később az találta, hogy a lizofoszfátidsav dózisfüggő vazokonstriktiót okoz újszülött malac piális ereiben, Caner és munkatársai szerint pedig nyulak arteria basilarisában. Irodalmi adatok alapján az LPA-nak szerepe lehet az erek mechanotranszdukciós folyamataiban. Nyíróerőnek kitett aortában az LPA endotélium-függő kontrakciót okozott tromboxán felszabaduláson keresztül, és fokozta egyéb vazokonstriktorok hatását, más vizsgálatokban pedig szabadgyök-képződésen keresztül erősítette az arteriolák miogén válaszát.

Az LPA irodalmi adatok alapján hatással van az endotélsejtek nitrogén monoxid (NO) termelésére, de ez a hatás ellentmondásos. Chen és munkatársai szerint az LPA endotél diszfunkciót okoz, mert szabadgyök képződésen keresztül gátolja az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) működését. Más kutatócsoportok azonban ennek épp az ellenkezőjét találták: különböző tenyésztett endotélsejtekben az LPA fokozza az eNOS aktivitását, amiben szerepe lehet a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) enzim általi eNOS foszforilációnak. Kutatásunk kezdetekor nem volt ismert, hogy az LPA *in situ*, vagy *in vivo* képes-e a vaszkuláris endotélsejtek NO-termelését befolyásolni és ez által megváltoztatni az értónust.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy a lizofoszfátidsav szerteágazó szerepet tölt be a kardiovaszkuláris rendszer működésének szabályozásában mind élettani, mind kórélettani körülmények között, az értónusra gyakorolt hatásával kapcsolatos ismereteink többnyire közvetettek és hiányosak. A bevezetésben röviden összefoglalt irodalmi adatok arra utalnak, hogy az LPA az erek összehúzódását és elernyedését egyaránt képes lehet kiváltani, illetve befolyásolni tudja az erek biomechanikai stimulusokra és farmakonokra adott válaszkészségét. Míg az LPA direkt vazokonstriktor hatása részben már ismert volt,

esetleges közvetett vagy közvetlen vazorelaxáns hatásáról kutatásunk kezdetekor semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésre.

Kísérleteink során ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e a lizofoszfátidsavnak endotél-függő vazoaktív hatása, elsősorban
- képes-e a lizofoszfátidsav NO felszabaduláson keresztül befolyásolni az értónust, és ha igen, akkor az
- milyen receptor(ok) közvetítésével, milyen jelátviteli útvonal(ak)on keresztül valósul meg?
- Kifejeződnek-e a lizofoszfátidsav receptorai és az autotaxin az endotélsejtekben?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinket C57Bl/6J genetikai háttérű egereken végeztük, kontrollként vad típusú (WT, wild type) állatokat vizsgáltunk. Kísérleteink során az alábbi, genetikailag módosított egértörzsekkel dolgoztunk: ciklooxygenáz 1 knockout (COX1 KO), foszfolipáz C ϵ knockout (PLC ϵ KO), eNOS KO, valamint LPA₁ és LPA₂ receptor KO. Minden beavatkozás a Semmelweis Egyetem és a University of Tennessee Health Science Center állatvédelmi szabályzatainak megfelelően és érvényes állatkísérletes engedélyek birtokában történt.

3.2. Érprenparátumok előkészítése miográfós kísérletekhez

Éterrel vagy izofluránnal mélyen altatott egereket transzkardiálisan 10 ml heparinizált (10 IU/ml) Krebs oldattal perfundáltunk. A mellkasi aortát (TA) illetve a hasi aortát (AA)

mikroszkóp alatt megtisztítottuk a zsírtól és kötőszövetétől. Ezután a következő összetevőket tartalmazó, karbogén gázzal átbuborékolgatott (95% O₂, 5% CO₂) szobahőmérsékletű Krebs oldatba helyeztük: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂·H₂O, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 0,03 mM EDTA és 10 mM glükóz, pH=7,4. Az erekből kb. 3 mm hosszúságú gyűrűket preparáltunk és konvencionális miográf rendszer értartó tüire (d=200 μm) helyeztük. Az endotélium épségére különösen vigyáztunk a preparálás során. Ez alól kivételt jelentettek azok a vizsgálatok, amikor az endotéliumot szándékosan roncsoltuk. A roncsoláshoz sebési fonalat húztunk át többször óvatosan az ér lumenében. Kísérleteink során az endotélium eltávolításának sikerességét az acetilkolin- okozta relaxáció hiánya jelezte.

3.3. Az értónus vizsgálata miográfós kísérletekben

A miográfok szervfürdőit 6 ml Krebs oldattal töltöttük fel és karbogénnel buborékolgtattuk át. Az ereket 30 percig pihentettük az értartókon, miközben a Krebs-oldat hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük és beállítottuk az erek optimális nyugalmi feszülését (TA=15 mN, AA=10 mN).

A 30 perc elteltével lecseréltük a Krebs-oldatot 124 mM K⁺-t tartalmazó oldatra (K⁺-Krebs) 1 percen keresztül, majd néhány kimosás és az alaptónus visszatérte után 10 μM fenilefrinnel (PE) prekontraháltuk és 0,1 μM acetilkolinnal (ACh) relaxáltuk őket, és a rosszul reagálókat kizártuk a további kísérletekből.

Többszöri kimosás és a nyugalmi tónus visszatérte után 3 percig tartó K⁺-Krebs expozíció következett. Az így kialakuló érválaszt tekintettük a későbbiekben referencia-kontrakciónak, és használtuk a vazokonstriktor anyagok hatásának normalizálására. Ezt követően PE (10 nM – 10 μM) és ACh (1 nM – 10 μM) kumulatív

dózis-hatás összefüggését vizsgáltuk meg az érsimaizom és az endotélium válaszkészségének pontos tesztelése érdekében.

A TA-k egy részében valamint a deendotelizált aortaszegmenteken megvizsgáltuk, hogy az egyes LPA analógok okoznak-e értónus fokozódást. A többi éren a referencia-kontrakció 70-90 százalékának megfelelő előfeszítést hoztunk létre és megvizsgáltuk, hogy az LPA analógok képesek-e vazorelaxációt kiváltani. A további kísérleteket a legnagyobb relaxációt kiváltó oleoil-LPA-val végeztük.

Az LPA okozta relaxáció jelátvitelének vizsgálatához a különböző enzim inhibitorokat és receptor gátlószereket kétféle módon alkalmaztuk. Wortmannin, MK-2206, Ki16425 és AM095 esetében az LPA expozíció előtt 30 perccel kezdtük el inkubálni az ereket, és a gátlószer az LPA kezelés alatt is az oldatban volt. A PLC endotélium-szelektív gátlására a következő módszert alkalmaztuk: a perfúziós oldatban hoztuk létre a szükséges gátlószerkoncentrációt, és lassan perfundáltuk az állatokat, hogy az ér lumenében áramló gátlószerrel hosszú ideig érintkezhessenek az endotélisejtek. A kontrollkísérleteket is hasonlóan végeztük: az U73122 inaktív analógját az U73343-at, vehikulumukat a DMSO-t, valamint az edelfosine vehikulumát, az etanolt is minden esetben a perfúziós oldathoz adtuk. Hogy ne teljen el sok idő a gátlószer beadása és az LPA tesztelése között, kihagytuk az érreaktivitás kezdeti ellenőrzését. A szelektív gátlást a PE kontrakció épségével és az Ach-relaxáció elromlásával ellenőriztük. Annak igazolására, hogy a gátlószer a jelátviteli utat gátolta, és nem a simaizom NO-érzékenységét, az NO-donor nitroprusszid-nátrium (sodium nitroprussid, SNP) hatását is megvizsgáltuk.

3.4. Endoteliális LPA receptorok és autotaxin expresszióanalízise

Az expresszióanalízist frissen izolált egér aorta endotélsejtekben végeztük. Altatás és perfúzió után az aorta lumenét DMEM oldattal átmostuk, és feltöltöttük 2 mg/ml II-es típusú kollagenázt tartalmazó DMEM oldattal. Az aortát mindkét végén fonállal lekötöttük, kivágtuk, DMEM oldatba helyeztük és 45 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A lument 3 ml DMEM oldattal átmostuk, hogy kinyerjük belőle az endotélsejteket. Az így kapott sejtuszuspenziót két centrifugacsőbe szétmértük, és 1200 fordulat/perc sebességgel 5 percen keresztül centrifugáltuk. Az első csőben lévő üledéket 300 µl RNAlater oldatban vettük fel, majd az RNS izolálásig hűtőszekrényben tároltuk. A másik csőben lévő mintát immuncitokémiai vizsgálatához készítettük elő: az üledéket reszuspendáltuk 20% FBS, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin tartalmú DMEM-ben, fedőlemezre pipettáztuk és egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, hogy a sejtek kitapadhasanak. Az immuncitokémiai vizsgálat célja az endotélsejtek relatív arányának meghatározása volt, vagyis azt vizsgáltuk, mennyire sikerült „tisztá” endotél-populációt nyernünk.

A mintában lévő összes sejt megszámlálására DAPI festést, az endotélsejtek kimutatására pedig klaudin-5-immuncitokémiai festést alkalmaztunk. A lemezeket 4-szer átmostuk PBS oldattal, a kitapadt sejteket pedig szobahőmérsékleten, 20 percig formalinnal fixáltuk. Ezután a lemezt 100 mM glicin tartalmú PBS oldatban 10 percig szobahőn átmostuk, majd 0,1%-os Triton X-100 oldattal 20 percen keresztül permeabilizáltuk és 1 órán keresztül 3% BSA tartalmú PBS oldattal blokkoltuk a sejteket. Ezt 1% BSA tartalmú PBS-ben oldott monoklonális klaudin-5 antitesttel (1:200 hígítás) történő inkubáció követte 1 órán keresztül, szobahőn. Az elsődleges antitestet PBS-sel lemostuk, majd 1 órás inkubáció következett szobahőn Alexa 568

konjugált egér ellenes IgG antitesttel (1:500 hígítás). A magfestéshez Alexa 488 konjugált DAPI festéket használtunk (1:1000 hígítás), 10 percen keresztül, szobahőn. Fluoreszcens mikroszkóppal megszámloltuk az endotél sejtek arányát az összes sejt számhoz viszonyítva.

Az expresszióanalízist csak abban az esetben végeztük el, ha az endotélsejtek aránya a mintában meghaladta a 98%-ot. Az RNS izolálást RNeasy micro kit-tel végeztük, az RNS koncentrációját és minőségét Nandrop-pal határoztuk meg. A reverz transzkripciót az Ovation PicoSL WTA System V2-el végeztük. A módszer lehetővé tette, hogy az átírt cDNS-t felfzaporítsuk. Az amplifikált cDNS-t QIAquick oszloppal tisztítottuk, majd mennyiségét Nanodrop-al mértük meg. A kvantitatív valós idejű PCR-hez 4 ng amplifikált cDNS-t használtunk. A PCR reakciók triplikátumban történtek, RT2 SYBR Green/ROX PCR master mix felhasználásával 25 µl végtérfigatban, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR rendszerben. Ciklusparaméterek: 1 inkubációs lépés 50 °C-on 2 percig, 1 denaturációs lépés 95 °C-on 10 percig, és 40 ciklus denaturáció 95 °C-on 10 másodpercig, primer kapcsolódás és elongáció 60 °C-on. A vizsgált gének relatív expresszióját dCt módszerrel határoztuk meg, normalizáló génként GAPDH-t használtunk.

3.5. Kiértékelés, statisztikai elemzés

Az értónus változásainak rögzítéséhez és az eredmények kiértékeléséhez Biopac MP100 rendszert és AcqKnowledge 3.7.3 szoftvert használtunk. A konstriktor érválaszokat a K⁺-Krebs által kiváltott kontrakció 3 perces értékére, a relaxáns válaszokat pedig a PE-nel kiváltott prekontrakció értékére normalizáltuk. Az adatok átlag±standard hiba formájában jelennek meg, *n* pedig a tesztelt érszakaszok számát jelöli. A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert használtunk. A dózis-hatás összefüggések kiértékelésekor

nonlineáris regressziót alkalmaztunk a maximális hatás (*E_{max}*) és a félmáximális hatást kiváltó koncentráció (*EC₅₀*) meghatározásához. Két csoport összehasonlításakor Student-féle páratlan *t*-tesztet, több csoport összehasonlításakor pedig varianciaanalízist használtunk az elrendezésnek megfelelő post hoc teszttel. A különbséget $p < 0.05$ esetében tekintettük szignifikánsnak.

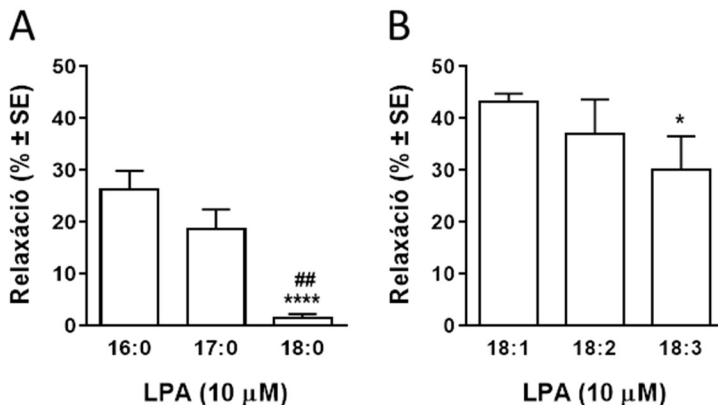
3.6. Reagensek

A kísérletekhez használt palmitoil-, heptadekanoil-, sztearoil-, és oleoil-LPA-t az Avanti Polar Lipidstől, míg a linoleoil- és linolenoil-LPA-kat az Echelon Biosciences Inc.-től szereztük be. A telítetlen LPA-kat közvetlenül a kísérlet előtt oldottuk fel fiziológiás sóoldatban, a kádakban létrehozott végkoncentrációhoz képest százszoros töménységben. A telített LPA-kat szintén közvetlenül a kísérlet előtt oldottuk metanolban, a kádakban létrehozott végkoncentrációhoz képest ezerszeres töménységben. Az AM095 szintetizálása egy korábban leírt módszer alapján történt. A Ki16425-t, az edelfosine-t valamint az U73122-t a Cayman Chemical Co.- től vásároltuk, az inzulint, az U73343-at és a wortmannint a Tocris Bioscience-től, az MK-2206-ot pedig a Selleckchem-től. Minden egyéb, jelen munkához felhasznált anyagot a Sigma-Aldrich-től szereztünk be. Amennyiben egy vegyületet szerves oldószerben oldottunk (U73122, U73343, Ki16425, wortmannin és MK-2206 esetében DMSO-ban, AM095 és edelfosine esetében etanolban), az oldószer végkoncentrációja a szervfürdőben legfeljebb 1 ezrelék volt, perfúzió esetén pedig 1 százalék. Ezekben a kísérletekben a kontroll erek oldószert kaptak. Az ábrákon és a szövegben minden alkalmazott anyag szervfürdőben létrehozott végkoncentrációja szerepel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A lizofoszfátidsav vazorelaxációt okoz egér mellkasi aortában

Annak eldöntésére, hogy képes-e valamely lizofoszfátidsav analóg vazorelaxáció kiváltására, ép endotéllel rendelkező mellkasi aortagyűrűket PE-nel prekontraháltunk, majd a prekontrakció stabilizálódása után különböző, eltérő oldallánc-hosszúságú, illetve eltérő mértékben telítetlen oldalláncot tartalmazó LPA analógot alkalmaztunk 10 μM -os koncentrációban. Az általunk vizsgált palmitoil- (16:0) és heptadekanoil-LPA (17:0) gyorsan létrejövő, tranziens relaxációt okozott, míg a sztearoil-LPA (18:0) alig váltott ki relaxációt.



1. ábra A lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatása

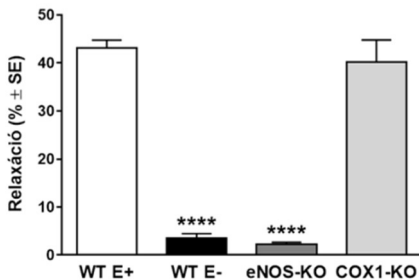
A maximális relaxáns hatások kiértékelése során a relaxáció mértéke az oldallánc hosszúságának növelésével csökkenő tendenciát mutat (1. ábra A panel: 26,3 \pm 3,6%, 18,6 \pm 3,8% valamint 1,4 \pm 0,8%, ### $p < 0,01$ vs. 17:0 LPA, **** $p < 0,0001$ vs. 16:0 LPA, $n = 16, 10, 10$; egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszt). Mivel a 18

szénatom hosszúságú oldalláncot tartalmazó LPA-k közül mind a telített, mind különböző telítetlen formák előfordulnak az emberi szervezetben, ezért következő lépésben megvizsgáltuk az oleoil- (18:1), linoleoil- (18:2) és linolenoil (18:3) LPA-k vazorelaxáns hatását. Mind az egyszeresen telítetlen oldalláncú oleoil-, mind a kétszeresen telítetlen oldalláncú linoleoil- és a háromszorosan telítetlen oldalláncú linolenoil-LPA gyorsan kifejlődő, tranzienst relaxációt okoz. A relaxációk maximumának kiértékelése alapján a relaxáns hatás a telítetlenség fokának növelésével csökkenő tendenciát mutat (1. ábra B panel: $43,1 \pm 1,6\%$, $37 \pm 6,7\%$ és $30,2 \pm 6,4\%$, $*p < 0,05$ vs. 18:1 LPA, $n=59$, 10, 11; egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszt). Érdekes, hogy amíg az oleoil-LPA relaxáns hatásának lecsengése után az értónus az előzőleg beállított prekontrakció értékére tér vissza, addig a többszörösen telítetlen LPA analógok a relaxáció lecsengése után a prekontrakció szintje fölé növelik az értónust.

A relaxáció további vizsgálatához leghatékonyabb vazorelaxációt kiváltó oleoil-LPA-t választottuk. Az oleoil-LPA által kiváltott vazorelaxáció maximuma (E_{max}) $53,9\%$, a félmaximális hatáshoz tartozó koncentráció (EC_{50}) pedig 400 nM. Ez az EC_{50} érték a kísérleti állatokban és embereknél mért plazma és szérumban LPA koncentráció tartományában van.

4.2. A lizofoszfátidsav vazorelaxáns hatásának kialakulásához ép endothéliumra és az eNOS enzimre van szükség

Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen mediátor(ok) közvetítik az LPA vazorelaxáns hatását. Azt feltételeztük, hogy a relaxációban endothélium-függő vazóaktív anyagok, elsősorban NO és prosztanoidok játszhatnak szerepet. Ezt a feltételezést kétféleképpen ellenőriztük: az LPA-t vad típusú állatokban endothéliumhiányt követően, illetve eNOS-deficiens és COX1-KO egerekből preparált erekben alkalmaztuk.



2. ábra Az LPA vazorelaxáns hatásának endothélium-függése

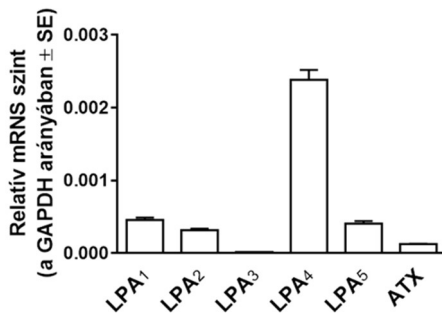
Az endothélium eltávolítása teljesen megszüntette az LPA-okozta vazorelaxációt, sőt, endothélium hiányában az LPA növelte az értónust (2. ábra, **** $p < 0,0001$ vs. „WT E+”, $n = 59, 21, 27, 8$; egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt). Ez arra utal, hogy az LPA hatása komplex, az

eredő hatásban nem csak endothélium-függő relaxáció, hanem endothélium-független kontrakció is szerepel.

4.3. A lizofoszfátidsav-indukálta vazorelaxációt közvetítő receptor(ok) azonosítása

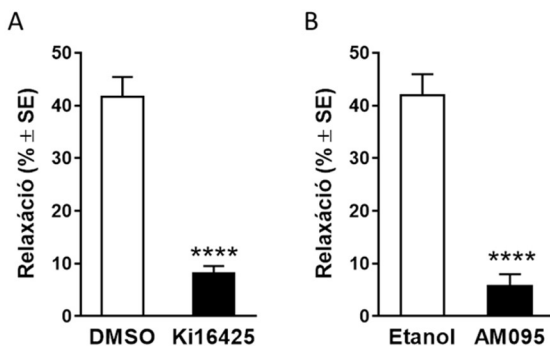
Mivel eredményeink alapján az endothélium játszik szerepet az LPA vazorelaxáns hatásának kialakításában, elsőként ellenőriztük, hogy az egér aorta endothélium sejtjeiben valóban expresszálódnak-e LPA receptorok és autotaxin. Izolált egér aorta endothélium sejtjeit kvantitatív valós idejű PCR technikával vizsgálva azt találtuk, hogy

az edg típusú recetorok közül az LPA₁ és LPA₂ receptorok átíródnak, míg az LPA₃ nem. A nem edg típusú receptorok közül az LPA₄ és LPA₅ receptorok átíródnak, hasonlóan az autotaxin enzim génjéhez (3. ábra).



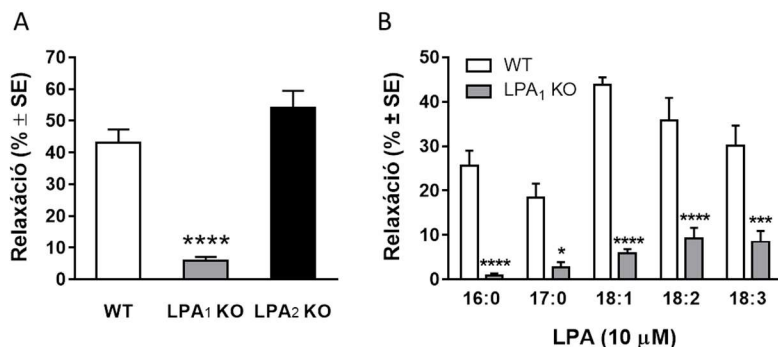
3. ábra Az LPA receptorok és az autotaxin expresszióanalízise

A következő lépésben azt vizsgáltuk, melyik LPA receptor altípus(ok) közvetíti(k) az eNOS-függő vazorelaxációt, amihez farmakológiai és genetikai módszereket egyaránt felhasználtunk. Kísérleteinkben az LPA_{1/3} receptorokat Ki16425-tel gátolva szignifikánsan lecsökkent az LPA-indukálta vazorelaxáció (4. ábra A panel, n=7, 18), míg az AM095 nevű szelektív LPA₁ receptor gátlószer 10 μM koncentrációban az LPA-okozta relaxáció jelentős, 90%-os csökkenését okozta (4. ábra B panel, n=7, 8; mindkét panelen **** $p < 0,0001$ vs. oldószerrel kezelt erek, Student-féle párosítatlan *t*-próba). Egyik receptor gátlószer sem változtatta meg az acetilkolin-ozokta eNOS-függő relaxációt.



4. ábra Az LPA vazorelaxáns hatásának receptor-függése

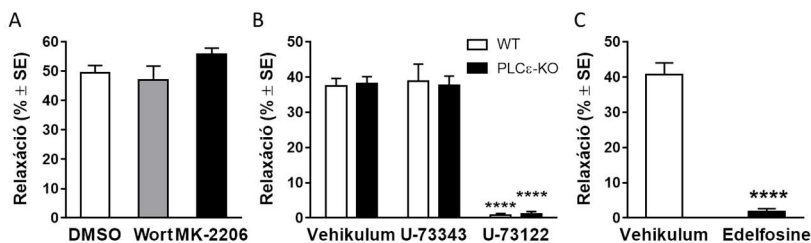
Ezután LPA₁ és LPA₂ KO egerekből izolált aortákon is megvizsgáltuk az LPA hatását. LPA₁ KO egerek erei nem mutattak relaxációt LPA hozzáadására, miközben az acetilkolinra adott válaszkészségük normális volt, míg LPA₂ KO egerek aortái sem az LPA, sem az acetilkolin hatásokban nem különböztek a kontroll egerektől. (5. ábra A panel, n=19, 15, 4; *****p*<0,0001 vs. „WT”, egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post hoc teszt). A fenti eredmények ismeretében megvizsgáltuk a többi LPA típus relaxáns hatását is LPA₁ KO egerekből preparált aortákban. Mivel a sztearoil-LPA nem váltott ki érdemleges vazorelaxációt, így ezt az LPA-t nem vizsgáltuk KO erekben. A többi általunk vizsgált LPA fajta vazorelaxáns hatását nagyrészt LPA₁ receptorok közvetítik (5. ábra B panel, n=19, 13, 52, 10, 11 a WT és n=6, 6, 20, 7, 9 az LPA₁ KO esetében. **p*<0,05, ****p*<0,001, *****p*<0,0001 vs. „WT”, kétváltozós ANOVA, Sidak-féle post hoc teszt).



5. ábra Az LPA vazorelaxáns hatásának receptor-függése

4.4. A lizofoszfatsav indukálta vazorelaxáció kialakulásában érintett intracelluláris jelátviteli utak azonosítása

Azért, hogy az LPA₁ receptor és az eNOS enzim aktivációja közötti jelátviteli útvonalat tisztázzuk, elsőként megvizsgáltuk a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) – Akt/protein kináz B (PKB) jelátviteli út esetleges szerepét, ugyanis irodalmi adatok alapján az LPA ezen útvonal aktiválásán keresztül okozta az eNOS enzim aktiválódását tenyésztett endotélsejtekben. Eredményeink alapján sem a PI3K gátlószere, a wortmannin (100 nM), sem az Akt/PKB gátló MK-2206 (5 μM) nem változtattak az LPA-indukálta vazorelaxáció amplitúdóján (6. ábra A panel, n=27, 16, 17; *****p*<0,0001 vs. “DMSO”, egyváltozós ANOVA, Dunnett-féle post hoc teszt). Annak ellenőrzése céljából, hogy a fent említett anyagok valóban gátolták a PI3K-Akt/PKB útvonalat, az inzulin okozta vazorelaxációt vizsgáltuk meg. Az ismert PI3K-Akt/PKB útvonalon ható inzulin vazorelaxáns hatása szignifikánsan csökkent a wortmannin és MK-2206 kezeléstől. Így állíthatjuk, hogy az LPA₁ és eNOS által közvetített vazorelaxáció nem a PI3K-Akt/PKB jelátviteli útvonalon keresztül alakul ki.



6. ábra Az LPA indukálta vazorelaxációban érintett jelátviteli útvonalak

Szintén irodalmi adatok utalnak arra, hogy az LPA₁ receptor képes fokozni az inozitol-triszfoszfát (IP₃) termelődését, és az ezt követő intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedés aktiválhatja az eNOS-t. Azért, hogy tisztázzuk az eNOS aktiváció mechanizmusát,

ezután a foszfolipáz C (PLC) enzimre fókuszáltunk, ami a fent említett IP_3 - Ca^{2+} útvonalon keresztül aktiválhatja az NO termelődést. Mivel az LPA néhány hatását az irodalmi adatok alapján PLC ϵ közvetíti, elsőként ennek az izoenzimnek az érintettségét vizsgáltuk meg. PLC ϵ -KO egerekből preparált aortákban azonban az LPA vazorelaxáns hatása nem volt különböző a vad típusú kontroll erekben mérhetőtől (6. ábra B panel, „Vehikulum” oszlopok; n=18 WT; 20 PLC ϵ -KO), így kizárhatjuk ennek az izoenzimnek a szerepét a jelátvitelben.

Ezt követően a többi PLC enzimre fókuszáltunk. A PLC enzim endotélium-specifikus gátlása érdekében az ereket a lumen felől kezeltük 10 μ M U73122-vel. Az LPA vazorelaxáns hatása szinte megszűnt mind vad típusú, mind PLC ϵ -KO egerek aortáiban U73122 kezelést követően, míg a kontrollként használt inaktív analóg U73343 hatástalan volt (6. ábra B panel; n=18, 7, 18 WT; 20, 11, 20 PLC ϵ -KO; **** p <0,0001 vs. „Vehikulum”, kétváltozós ANOVA Tukey-féle post hoc teszt). Kísérleteinket egy kémiaileg és hatásmechanizmusban eltérő másik PLC gátlószerrel, edelfosine-nal is elvégeztük, és hasonló eredményre jutottunk: az edelfosine is megszüntette az LPA-ra kialakuló vazorelaxációt (6. ábra C panel, n=10, 11. **** p <0,0001 vs. „Vehikulum”, Student-féle párosítatlan t-próba). A 3.3 fejezetben leírt módon ellenőriztük, hogy e két gátlószeres kezelés (U-73122 és edelfosine) egyébként valóban hatékonyan csökkentette a PLC függő vazorelaxációt, de nem befolyásolta a simaizom exogén NO-ra adott válaszkészségét. Összefoglalva tehát megállapítottuk, hogy a PLC enzim(ek)nek – de nem a PLC ϵ izoformának – döntő szerepe van az LPA vazorelaxáns hatásának közvetítésében.

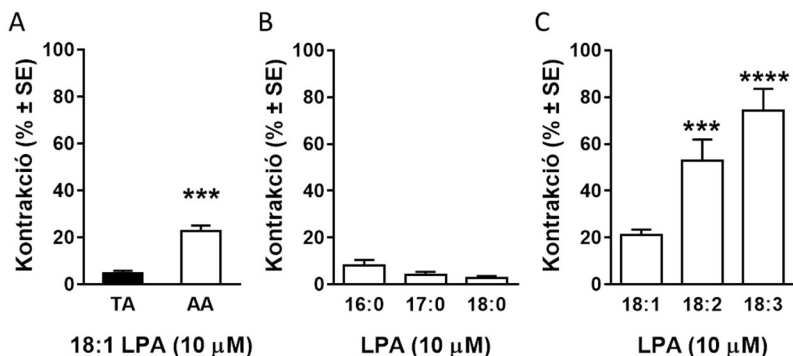
4.5. A lizofoszfátid sav endotélkárosodás esetén vazokonstriktiót okoz

Az LPA adását követően több esetben értónus-növekedést is tapasztaltunk, pl. endotélirtást követően, valamint eNOS KO egerekből preparált aortákon az LPA konstriktor hatást fejtett ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az általunk látott érhatás több komponensű lehet, de a vazokonstriktor komponenst az esetek többségében felülírja az endotélium-függő vazorelaxáció. Ennek kiküszöbölése érdekében további kísérleteinkben az endotéliumot eltávolítottuk, az oleoil-LPA-t pedig a nyugalmi értónusra adtuk. A kontrakciós hatás kiértékelésekor a következő megfigyeléseket tettük:

- a kontrakció amplitúdója nagyobb endotél irtás esetén, mint ép endotéllel rendelkező erekben ($1,2 \pm 0,3\%$, $n=17$ vs. $4,8 \pm 1,0\%$, $n=14$, a 124 mM K^+ által létrehozott referencia-kontrakcióhoz viszonyítva, $p < 0,001$, Student féle páratlan t -teszt),
- a kontrakció amplitúdója nagyobb hasi aortában, mint mellkasi aortában (7. ábra A panel, $n=14$, 42; $***p < 0,001$ vs. “TA”, Student féle páratlan t -teszt), és
- hasi aortában továbbvizsgálva a kontrakciót, az dózisfüggőnek bizonyult, maximális értéke (E_{\max}) a referencia kontrakció $30,3 \%$ -a, a félmaximális hatáshoz tartozó koncentráció (EC_{50}) pedig $3,15 \mu\text{M}$ ($n=4-42$, nonlinearis regresszió).

Az oleoil-LPA vazokonstriktor hatása így gyengének mondható, főleg annak tükrében, hogy az LPA receptorok közül az edg receptorokon agonista VPC31143 saját eredményeink szerint ennél lényegesen erősebben képes kontrahálni az endotél irtott hasi aortát (jelen dolgozatban nem kerül bemutatása). Ezért

megvizsgáltuk a többi, korábban már említett LPA típus vazokonstriktor potenciálját is.



7. ábra Az LPA által kiváltott vazokonstrikciónak

A többszörösen telítetlen linoleoil- és linolenoil-LPA az oleoil-LPA-nál lényegesen erősebb vazokonstrikciónak okoznak (7. ábra C panel, $n=48, 12, 13$; $***p<0,001$, $****p<0,0001$ vs. 18:1 LPA, egyváltozós ANOVA, Tukey-féle post-hoc teszt). Ezek a típusok szintén tranziens, de a VPC31143 hatásával összemérhető érösszehúzódot váltottak ki. Ugyanakkor az általunk vizsgált telített LPA-k egyáltalán nem, vagy alig okozták az endotél irtott hasi aorta összehúzódot (7. ábra B panel, $n=9, 9, 6$).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során arra kerestünk választ, hogyan befolyásolja a lizofoszfátidsav (LPA) az erek tónusát, és ennek háttérében milyen jelátviteli folyamatok állhatnak. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy egér aortában:

- Az LPA dózisfüggő vazodilatációt okoz, melynek kialakulása az endotélium épségéhez kötött. A vazodilatáció erőssége függ az LPA-ban található zsírsavlánctól: telített zsírsavlánccú LPA-k esetében a lánchossz, míg a 18 szénatomszámú LPA-k esetében a kettős kötések számának növelése csökkenti a relaxáns hatást.
- Endotélium hiányában az LPA dózisfüggő vazokonstriktációt okoz, mely kifejezettebb a hasi aortában, mint a mellkasi aortában, és erőssége fokozódik az LPA zsírsav oldalláncának telítetlenségével.
- Az endotélisejtekből kifejeződnek az LPA₁, LPA₂, LPA₄ és LPA₅ receptorok, valamint az LPA szintéziséért felelős autotaxin enzim. A vazorelaxáció közvetítéséért az LPA₁ receptor felelős.
- Az LPA okozta vazorelaxációt az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) közvetíti, ciklooxygenáz metabolitoktól független.
- Az eNOS aktiválása a foszfolipáz-C (PLC) – de nem a PLC ϵ – közreműködésével történik, és független az eNOS foszforilációhoz vezető foszfatidil-inozitol-3-kináz – Akt/PKB útvonaltól.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények listája

Ruisanchez, E., Dancs, P., Kerek, M., Nemeth, T., Farago, B., Balogh, A., Patil, R., Jennings, B. L., Liliom, K., Malik, K. U., Smrcka, A. V., Tigyi, G., Benyo, Z. (2014) Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J* 28: 880-890

Dancs, P. T., **Ruisanchez, E.**, Balogh, A., Panta, C. R., Miklos, Z., Nusing, R. M., Aoki, J., Chun, J., Offermanns, S., Tigyi, G., Benyo, Z. (2017) LPA1 receptor-mediated thromboxane A2 release is responsible for lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle contraction. *FASEB J* 31: 1547-1555

A disszertációtól független közlemények listája

Donko, A., **Ruisanchez, E.**, Orient, A., Enyedi, B., Kapui, R., Peterfi, Z., de Deken, X., Benyo, Z., Geiszt, M. (2010) Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med* 49: 2040-2048

Ruisanchez, E., Cselenyak, A., Papp, R. S., Nemeth, T., Kaldi, K., Sandor, P., Benyo, Z. (2012) Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. *PLoS One* 7: e37798

Iring, A.*, **Ruisanchez, E.***, Leszl-Ishiguro, M.*, Horvath, B., Benko, R., Lacza, Z., Jarai, Z., Sandor, P., Di Marzo, V., Pacher, P., Benyo, Z. (2013) Role of endocannabinoids and cannabinoid-1 receptors in cerebrocortical blood flow regulation. *PLoS One* 8: e53390

Masszi, G., Novak, A., Tarszabo, R., Horvath, E. M., Buday, A., **Ruisanchez, E.**, Tokes, A. M., Sara, L., Benko, R., Nadasy, G. L., Revesz, C., Hamar, P., Benyo, Z., Varbiro, S. (2013) Effects of vitamin D3 derivative--calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacol Rep* 65: 476-483

Szekeres, M., Nadasy, G. L., Turu, G., Soltesz-Katona, E., Benyo, Z., Offermanns, S., **Ruisanchez, E.**, Szabo, E., Takats, Z., Batkai, S., Toth, Z. E., Hunyady, L. (2015) Endocannabinoid-mediated modulation of Gq/11 protein-coupled receptor signaling-induced vasoconstriction and hypertension. *Mol Cell Endocrinol* 403: 46-56

Benyo, Z., **Ruisanchez, E.**, Leszl-Ishiguro, M., Sandor, P., Pacher, P. (2016) Endocannabinoids in cerebrovascular regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H785-801

Polycarpou, A., Hricisak, L., Iring, A., Safar, D., **Ruisanchez, E.**, Horvath, B., Sandor, P., Benyo, Z. (2016) Adaptation of the cerebrocortical circulation to carotid artery occlusion involves blood flow redistribution between cortical regions and is independent of eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311: H972-H980

* megosztott első szerzős közlemény

