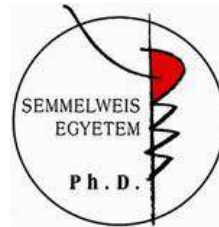


Endotél diszfunkció vizsgálata aortán, ateroszklerózis, és policisztás ovárium szindróma kísérleti modelljein

Doktori tézisek

Dr. Buday Anna

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Hamar Péter, Egyetemi docens, MTA Doktora, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Prof. Dr. Rónaszéki Aladár, Egyetemi magántanár, Med.Habil.,
Ph.D.

Dr. Zsembery Ákos, Egyetemi Adjunktus, Ph.D.

Bíráló bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Losonczy György, Egyetemi tanár, MTA doktora, Ph.D.

Tagok:

Dr. Veresh Zoltán, Ph.D.

Dr. Tóth János, Ph.D.

Dr. Cselenyák Attila, Ph.D.

Budapest 2013

BEVEZETÉS

A népbetegségnek számító cukorbetegség, magas vérnyomás betegség és érlemeszesedés súlyos, életet veszélyeztető szövődményeinek kialakulásában az egyik fontos tényező az érfal megbetegedése, melynek kezdeti kórfolyamata az endotél működés-zavara. Az endotél diszfunkció háttérében gyakran áll oxidatív stressz: a reaktív oxigén gyökök (ROS) akut és krónikus túltermelése. A termelődő szabadgyökök a nitrogén monoxid (NO) megkötésével csökkentik annak biológiai hozzáférhetőségét. A NO hatásainak kiesése az endotél funkció zavarához, elsősorban az ér beszűkült relaxációs képességéhez vezet. A NO megkötése mellett a szabadgyökök indukálják az endotélium gyulladással való átalakulását, az endotél sejteken az adhéziós molekulák expressziója fokozódik, és gyulladással sejtek tapadnak az aktivált endotélhez, melyek gyulladással mediátorokat termelnek. A folyamat során az endotél relaxációs készsége csökken. Az oxidatív stressz következtében kialakuló endotél diszfunkció kritikus szerepet játszik az aterosclerosis, illetve a magas vérnyomás kialakulásában, ami növeli kardiovaszkuláris betegségek kockázatát.

Az endotél gyulladással fenotípus-változása során felszabaduló citokinek központi szerepet játszanak azoknak a sejtszintű változásoknak a kialakulásában, amelyek az érlemeszesedésre jellemző fokozatos szerkezeti átalakuláshoz vezetnek. A Transzformáló Növekedési Faktor β (TGF- β) szerepe az érlemeszesedés krónikus gyulladással folyamatában évtizedek óta vitatott téma. Feltételezték, hogy a lipid lerakódást gátló és gyulladássalcsökkentő hatásának köszönhetően a TGF- β gátolja az érlemeszesedés folyamatát. Ugyanakkor számos tanulmány inkább aterosclerosis szerepet tulajdonít a TGF- β -nak az endotélsejt regeneráció gátlása, az érfali oxidatív stressz fokozása, és a fibrotikus folyamatok serkentése miatt. Mindebből következik, hogy a TGF- β szerepe az érlemeszesedésben nagyon összetett és ellentmondással folyamatok eredménye.

Kardiovaszkuláris szövődményekhez vezető endotél

diszfunkció jellemző a Policisztás Ovárium Szindrómára (PCOS) is, melynek hátterében a PCOS-hez társuló inzulinrezisztencia (IR) állhat. A PCOS okozta endotél diszfunkció kiváltói között szintén fontos az oxidatív stressz, és a NO termelés csökkenése. A PCOS nevét a cisztákkal borított, megnagyobbodott ováriumokról kapta, de hátterében alapvetően az androgének termelésének túlsúlya áll. A hiperinzulinémia és inzulinrezisztencia már a PCOS korai szakaszában jelen lehetnek, és jelentősen befolyásolhatják a betegség lefolyását. A PCO-szindrómás nőkben a T2DM, ill. a kardiovaszkuláris szövödmények sokkal korábban jelentkeznek, mint az átlagos női populációban.

A PCOS-es betegek 72%-ra D-vitamin hiány is jellemző. D-vitamin és egyidejű kalcium kezelés hatására a PCOS-es betegek egy részénél rendeződnek a menstruációs zavarok. Ezen kívül a D-vitamin-hiány összefüggésbe hozható számos metabolikus rizikofaktor (BMI, éhgyomri glükóz, triglicerid, CRP, inzulin) emelkedett szintjével PCOS-ban, míg D-vitamin-pótlás hatására ezek javulását írták le. A D-vitamin-hiány fontos patogenetikai tényezőnek bizonyult az inzulinrezisztencia kialakulásában is PCOS-ban, azonban a D-vitamin inzulinháztartásra gyakorolt esetleges jótékony hatását még nem sikerült bizonyítani.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az emelkedett TGF- β szint endotél funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata ismert hatású specifikus vazoaktív anyagok jelenlétében izolált aorta gyűrűkön.
2. Az emelkedett TGF- β szint endoteliális ROS termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata izolált aorta gyűrűkön.
3. Az emelkedett TGF- β szint hosszútávú, vérnyomásra, aorta- és szívморfológiára gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. Az inzulin relaxáció vizsgálata DHT-indukálta PCOS-ban specifikus gátlószerek jelenlétében izolált aorta gyűrűkön.
5. A D-vitamin hatásának vizsgálata DHT-indukálta PCOS-ban.

MÓDSZEREK

TGF- β -TGxAPO-E-KO egértörzs:

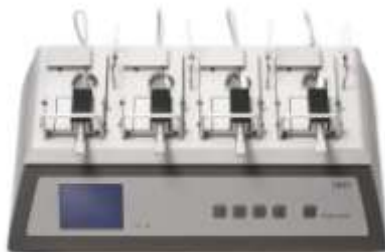
A magas keringő TGF- β szint az endotél funkcióra, és érlelmeszesedésre gyakorolt hatását emelkedett TGF- β szinttel és atheroszklerotikus elváltozásokkal rendelkező, két génmódosított törzs keresztezésével léterhozott, TGF- β -TGxAPO-E-KO egérben vizsgáltuk. Kontrollként az egyszeresen génmódosított (APO-KO és TGF- β -TG) törzseket és a háttér (C57BL/6) törzset vizsgáltuk.

A PCOS patkány modellje:

Húsz db 21-28 napos nőstény Wistar patkányon, 70 napig tartó dihidrotesztoszteron (DHT)-kezeléssel PCOS-t indukáltunk. 10 állatot párhuzamosan D-vitaminnal is kezeltünk. Újabb 10 állat álműtéten esett át.

Endotél funkció vizsgálata egér aortán miográffal:

Az endotél-függő relaxációt miográffal vizsgáltuk, 4 hónapos egerekből izolált aorta gyűrűkön. NOX-gátló apocynin, és ROS-fogó SOD inkubációt követően ismét endotél-függő relaxációt mértünk, majd megfigyeltük a relaxációs válaszok változását.



1. ábra: 610-M Multi Myográf Rendszer

Szuperoxid kimutatás dihidroethidin festéssel egér aortában:

4 hónapos egerekből izolált aorta szegmenteket dihidroethidinnel és Hoechst-el festettünk, és konfokális mikroszkóppal réteg-felvételeket készítettünk. A festődés intenzitását szoftverrel hasonlítottuk össze.

In vivo vérnyomásmérés carotis kanülön keresztül egérben:

Carotis kanülre kapcsolt vérnyomásmérő berendezéssel mértünk in vivo vérnyomást, 8 hónapos, altatott egereken.

Aorta és szív morfológiai vizsgálata egérben:

8 hónapos egerekből izolált aorta szövettani metszetein fal/lumen arányt, a miokardiumból készült félvékony metszeteken kapilláris- és fibrocita-sűrűséget mértünk.

Zsírfestés Oil-Red-O-val egér aortából nyert „en face” preparátumon:

8 hónapos egerek teljes hosszában kipreparált aortáin zsírfestést végeztünk Oli-Red-O-val. A zsíros plakkok területét szoftverrel értékeltük.

Orális Glükóz Tolerancia Teszt (OGTT), és inzulin szint meghatározás PCOS patkány modelljében:

8 hét DHT kezelést követően a patkányoknak rövid éter narkózisban 0,3g/100tsg glükózt kaptak gyomorszondán keresztül. Éhgyomri és 120 perces glükóz- és inzulinszinteket mértünk.

Inzulin-függő relaxáció vizsgálata PCOS patkány modelljében miográffal:

Az inzulin-függő relaxációt miográffal vizsgáltuk patkányokból izolált aorta gyűrűkön. NOS-gátló L-NAME, illetve prosztanoid-gátló indometacin inkubációt követően ismét inzulin-relaxációt mértünk, majd mefigyeltük a relaxációs válaszok változását.

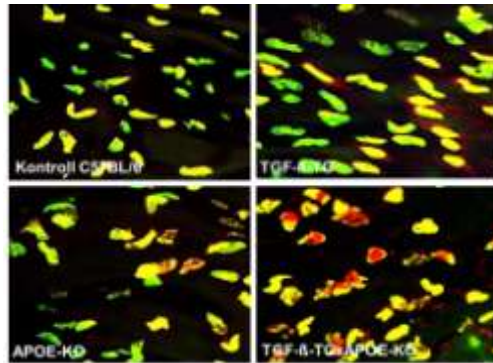
EREDMÉNYEK

Endotél-függő relaxáció az egér modellben:

Az TGF- β -TG α APO-E-KO egerekben csökkent endotél függő relaxációt mértünk a többi törzshöz képest, melyet a NOX rendszer illetve a ROS-termelés gátlása részben helyreállított.

Szuperoxid kimutatás egér aortában:

Az TGF- β -TG α APO-E-KO egér törzs aortáinak endotél rétegében fokozott dihidroetidin festődést találtunk a kontroll törzsekhez képest.



2. ábra: Szuperoxid kimutatás (Dihidroethidine festés)
A TGF- β -TG α APO-E-KO törzsben intenzív festődés látható

In vivo vérnyomásmérés változása az egér törzsekben:

A vérnyomás emelkedett volt az APO-E-KO törzsben a kontrollhoz képest. A TGF- β -TG α APO-E-KO törzsben az APO-E-KO törzshöz képest is további vérnyomás növekedést találtunk.

Aorta és szív morfológia összehasonlítása az egér törzsekben:

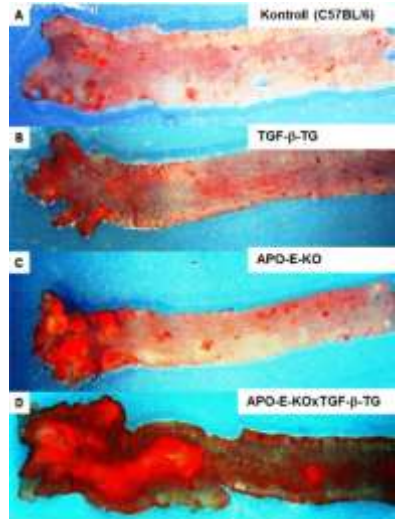
Az aorta fal/lumen arány magasabb volt, a szívizmon kapilláris sűrűsége pedig csökkent a TGF- β -TG α APO-E-KO törzsben a kontroll törzsekhez képest. A fibrocita-sűrűség emelkedett a TGF- β transzgénnel rendelkező törzsekben, a C57BL/6 és APO-KO törzshöz képest.

Plakk-képződés mértéke az egyes egér törzsekben:

Az APO-E-KO törzsben jelentős atheroszklerotikus plakk képződést találtunk a kontrollhoz képest, azonban a plakkok száma és mérete ehhez képest is jelentősen megnövekedett a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben.

Glükóz és inzulin szintek alakulása PCOS patkány modellben:

A glükóz szintekben és az éhgyomri inzulin értékekben nem találtunk különbséget a DHT-nal, a DHT+D-vitaminnal kezelt és álműtött patkányok között. A 120 perces inzulin érték magasabb volt a DHT-kezelt patkányokban, azonban DHT+D-vitaminnal kezelt csoportban nem mértünk emelkedést.



3. ábra: Atheroszklerotikus plakkok
A TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben jelentős plakk képződés látható (Oli-Red-O festéssel)

Inzulin-függő relaxáció PCOS patkány modelljén:

Csökkent inzulin relaxációt találtunk a DHT-kezelt patkányokban a kontrollhoz képest, melyen a D-vitamin-kezelés nem változtatott.

L-NAME inkubáció hatása az inulin-függő relaxációra:

Az L-NAME inkubációt követően a relaxációs válaszok minden csoportban csökkentek. A legnagyobb relaxáció-csökkenést a kontroll csoportban, a legkisebb relaxáció-csökkenést a D-vitaminnal kezelt állatokban találtuk L-NAME hatására.

Indometacin inkubáció hatása az inzulin-függő relaxációra:

Indometacin jelenlétében az inzulin-relaxáció minden csoportban javult, de a DHT-csoport továbbra is elmaradt a kontrollhoz képest. Indometacin jelenlétében a D-vitamin-kezelés javította az inzulin-relaxációt a csak DHT-kezelést kapott csoporthoz képest.

MEGBESZÉLÉS

Az emelkedett TGF- β szint szerepe az endotél diszfunkció és az érlemezés kialakulásában:

Azon kutatások, amelyek szerint a TGF- β túltermelés emelkedett vaszkuláris szabadgyök felszabadulással, és endotél diszfunkcióval jár, új dimenziókat nyitottak meg a TGF- β érlemezésben játszott szerepének megítélése tekintetében. Eredményeink alátámasztják a TGF- β endotélkárosító hatását ateroszklerózisra hajlamos egérmodellben. Mindemellett azt is kimutattuk, hogy a TGF- β által indukált NADPH oxidáz aktiváció és az endotél funkció romlása, hosszútávon az ateroszklerotikus plakkok növekedéséhez, a vérnyomás emelkedéséhez, és a szív fibrotikus átépüléséhez vezet.

Kísérleteink során emelkedett TGF- β szinttel rendelkező, 4 hónapos, APO-E-KO egerekből izolált aorta-gyűrűkön csökkent endotél-függő relaxációt találtunk. Ebből arra következtetünk, hogy a keringő TGF- β koncentráció emelkedése súlyosbítja az APO-E-KO egerekben kialakuló endotél diszfunkciót, és ateroszklerózist.

Kísérleteink további részében az oxidatív stressz gátlására használt NOX inhibitor (apocynin) és ROS-semlegesítő SOD enzim részben helyreállította az endotél-függő relaxációt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben kialakult endotél diszfunkcióban a TGF- β indukálta NOX rendszer és a hatására kialakuló ROS túltermelés fontos szerepet játszik. A dihidroethidine festéssel igazolt jelentősebb szuperoxid termelés is alátámasztotta, hogy a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben kialakult endotél-függő relaxáció-csökkenés hátterében, az endotélsejtek emelkedett szuperoxid termelése áll.

Az endotél diszfunkció fontos szerepet játszik az ateroszklerózis, és a hipertónia patomechanizmusában. Kutatásunk során a magas keringő TGF- β szint 8 hónapos TGF- β -TGxAPO-E-KO egerekben, az APO-E-KO törzsnél is magasabb vérnyomáshoz vezetett. A 8 hónapos TGF- β -TGxAPO-E-KO egerekben a plakkképződés is jelentősen fokozódott, ezen kívül a szövettani

vizsgálatokkal az aorta fal megvasogodását és a miokardium fibrotikus átépülését találtuk.

Érdekes módon kísérleteink során önmagában az emelkedett TGF- β szint nem volt elegendő, hogy ateroszklerotikus elváltozásokat váltson ki a TGF- β -TG törzsben. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az APO-E-KO egerekben az oxidált LDL és egyéb lipidek lerakódása, és az ezzel együtt járó gyulladásos folyamatok következtében már fennáll az érfal bizonyos mértékű gyulladása, illetve sérülése, ami szükséges ahhoz, hogy a TGF- β endotél károsító és aterogén hatása érvényesüljön.

Mindezek alapján a TGF- β szisztémásan emelkedett szintje rizikófaktorként kezelendő, és a jövőben esetleg új terápiás célpontként is használható az endotél diszfunkcióval és az érlemezéssel járó krónikus betegségek esetében.

DHT-indukálta PCOS modellben kialakuló ér-szintű inzulinrezisztencia patomechanizmusa és a krónikus D-vitamin-kezelés hatásai:

A PCOS patkány modelljében a 120 perces inzulin értékek jelentősen magasabbak voltak, melyet a D-vitamin-kezelés kivédett. Bár 2-es típusú diabétesz még nem alakult ki ezekben az állatokban, az OGTT inzulin rezisztenciát igazolt, így modellünk alkalmasnak bizonyult a PCOS kezdeti és korai szakaszában kialakuló érszintű károsodások és zavarok vizsgálatára.

Az inzulinnal kiváltott vazorelaxáció csökkenése, az inzulin-rezisztencia érszintű megjelenési formája. PCOS modellünkben csökkent inzulin-függő relaxációt találtunk a DHT-kezelt csoportban, amit D-vitamin nem védett ki. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, az aortával ellentétben a gracilis artéria inzulin-rezisztenciáját a krónikus D-vitamin-kezelés szignifikánsan javította a DHT-indukálta PCOS modellben. A két érterületen tapasztalt eltérő D-vitamin hatás alapján feltételezzük, hogy a gracilis artériában az inzulinfüggő relaxáció NO-független útvonalon is működik, míg aortában a NO-független inzulin-relaxáció dominál, és a D-vitamin főleg a NO-független útvonalak segítségével állítja vissza a normál érreaktivitást.

Kísérleteink további részében az inzulin-függő relaxáció-csökkenésében szerepet játszó mechanizmusokat vizsgáltuk. A NO hatást L-NAME-mel blokkolva a kontroll aorták inzulin-relaxációja csökkent leginkább, ami a DHT-al kezelt csoportokban a NO-függő jelátviteli útvonal sérülésére utal. A NO útvonal blokkolása után fennmaradó relaxációs kapacitás azonban azt bizonyítja, hogy egyéb útvonalak is érintettek. L-NAME inkubációra a D-vitaminnal kezelt erek voltak a legkevésbé érzékenyek. Ebben a csoportban volt a legkisebb a relaxáció-csökkenés az inkubáció előttihez képest, ami arra utal, hogy a D-vitamin-kezelés egyéb NO-független inzulinfüggő relaxációs mechanizmusokat is felerősít. A D-vitamin hatása a gracilis erek inzulin-relaxációjára, és hiánya az aorta inzulin-relaxációjára előkezelés nélkül, azt valószínűsíti, hogy ezek az NO-független mechanizmusok inkább a mikroerek szintjén jelentkeznek.

A korábbi kutatásokban a COX gátlók adására enyhe vazorelaxáns hatást írtak le aortában. Ezt a relaxációs hatást mi is megfigyeltük indometacin inkubációt követően, minden kísérleti csoportban. Érdekes módon, a DHT-vel kiváltott inzulin-függő relaxáció-csökkenést indometacin jelenlétében a D-kezelés részben kivédte. Ez alapján feltételezzük, hogy a D-vitamin hatás hiánya az aorta inzulin-relaxációjára előkezelés nélkül, az NO-független relaxációs mechanizmusok és a konstriktor-prosztanoidok hatásának kiegyenlítéséből adódik. Összességében, eredményeink szerint a D-vitamin lokálisan részben NO-független relaxációs mechanizmusokat, részben a konstriktor prosztanoidok hatását erősíti.

KÖVETKEZTETÉSEK

A szisztémásan keringő TGF- β emelkedett szintje endotél-diszfunkciót okozott APO-E-KO egérben, a NADPH-oxidáz rendszer stimulációja révén fokozva az oxidatív stresszt. Továbbá a magas keringő TGF- β aortafal megvastagodást, fokozott plakkképződést, hipertóniát, valamint miokardiális fibrózist okozott hosszútávon. A keringő magas TGF- β szint tehát, ateroszklerotikus környezetben, ami egy APO-E-KO állatra jellemző, elősegíti az amúgy is fennálló endotél diszfunkció és az ateroszklerózis progresszióját.

A PCOS modellben a D-vitamin pótlás kivédte a szisztémás inzulinrezisztenciát. Nem akadályozta meg azonban az aortában az inzulinnal kiváltott vazorelaxáció beszűkülését. Eredményeink az androgén hatásra kialakult vaszkuláris-reaktivitás változásának részleges NO-függését mutatták. A D-vitamin neutrális hatása az aortában a lokális vazokonstriktor prosztanoidok, és az NO-független relaxáns útvonalak egymást semlegesítő hatásával magyarázható.

A DISSZERTÁCIÓBAN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Buday A, Orsy P, Godo M, Mozes M, Kokeny G, Lacza Z, Koller A, Ungvari Z, Gross ML, Benyo Z, Hamar P **Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice** AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 299:(2) pp. H386-H395. (2010) **IF: 3.880**

Masszi G*, Buday A*, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, Sara L, Revesz C, Benko R, Nadasy GL, Benyo Z, Hamar P, Varbiro S (* megosztott elsőszerek) **Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome.** FERTILITY AND STERILITY 12: pp. S0015-0282. (2012) **IF: 3.775**

A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN ÍRÓDOTT EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GL, Varbiro S **Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome.** FERTILITY AND STERILITY 97:(2) pp. 462-468. (2012) **IF: 3.775**

Masszi G, Novak A, Tarszabo R, Horvath EM, Buday A, Ruisanchez E, Tokes AN, Sara L, Benko R, Nadasy GL, Revesz C, Hamar P, Benyo Z, Varbiro S **Effects of vitamin D+ derivate calcitriol on pharmacological reactivity of aortic ring sin a rodent PCOS model** PHARMACOLOGICAL REPORTS 2012 (*in press*)

Gabriella Masszi, M.D.; Robert Tarszabo; Eszter Maria Horvath; Rita Benko; Agnes Novak; Anna Buday; Anna Maria Tokes; Levente Sara; Gyorgy L Nadasy; Peter Hamar; Zoltán Benyó; Szabolcs Varbiro. **Reduced Estradiol-Induced Vasodilatation and Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Activity in the Aortas of Rats with Experimental Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)** PLOS ONE 2012 (*in press*)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ehhez a tanulmányhoz kapcsolódó tudományos munka 2005-re nyúlik vissza. Akkor még TDK-hallgatóként a Kóréletteni Intézetben kezdtem kísérletezni. Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani **Dr. Hamar Péternek**, hogy a kezdetektől fogva támogatott a munkámban, átsegített a holtpontokon, és mindig a megfelelő helyre irányított, a további eredmények érdekében.

Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet munkatársainak, **dr. Örsy Petrának**, **dr. Riusanchez Évának**, **Körmöci Évának**, **Balog Ibolyának**, és **Dr. Benyo Zoltán** professzor Úrnak, hogy befogadtak, tanítottak, és bármikor szerettel és segítséggel láttak viszont laborjaikban.

Köszönettel tartozom **Dr. Maria-Luis Gross-nak**, és a Heidelbergi Pathológia Intézet munkatársainak, hogy vendégül láttak, és hozzájárultak ahhoz, hogy kutatásunk további eredményekkel bővüljön.

Köszönöm **Dr. Várbíró Szabolcsnak**, hogy részt vehettem a témavezetésével zajló 2011-es kísérletsorozatban, melynek köszönhetem, hogy eljutottam ideig.

Köszönöm **Cser Áginak**, hogy mindig számíthattam rá, továbbá **Dr. Masszi Gabriellának**, **Godó Marcsinak**, **Kécsán Kamillának**, **Dr. Novák Ágnesnek**, **Tarsabó Róbertnek**, **Dr. Révész Csabának**, **Dr. Sára Leventének**, **Dr. Kökény Gábornak**, **Dr. Nádasy Györgynek**, és a kutatásban résztvevő összes munkatársamnak a munkám során nyújtott személyes segítséget, és közreműködést.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a türelmet és biztatást, és hogy velem voltak a legnehezebb időkben.