

## II. típusú diabéteszben sérül a kardiális SERCA2a funkció

**Bevezetés:** Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy II. típusú diabéteszes állatmodellen a megfigyelt kardiális diszfunkció háttérében feltételezhető a szarkoendoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáza (SERCA2a) funkciójának sérülése. Célunk ezen feltételezés igazolása volt.

**Módszerek:** Hím Sprague-Dawley patkányokban 10 hétig tartó fruktóz dús diétával inzulinrezisztens diabéteszt indukáltunk. Ezután szívüket izoláltuk, és Langendorff szerint perfundáltuk. Az izolált szíveken bal kamrai nyomást és Indo-1 felszíni fluorometriával  $Ca^{2+}_i$ -tranzienst regisztráltunk először nyugalomban, majd béta-agonista isoproterenol (ISO–5nM), és SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS–5 $\mu$ M) infúzióját követően.

**Eredmények:** Fruktóz-diétát követően az izolált szívekben inotróp (+dP/dt<sub>max</sub>) és luzitrop zavar (–dP/dt<sub>max</sub>), illetve a kontroll értékekhez hasonló szívfrekvencia volt megfigyelhető. A  $Ca^{2+}_i$ -tranziensek elemzése során lassult  $Ca^{2+}$ -felszabadulás (+dCa/dt<sub>max</sub>) és -szekvesztráció (–dCa/dt<sub>max</sub>) volt kimutatható. Izoproterenol infúzió hatására a diabéteszes szívek fokozott béta-adrenerg választ adtak a +/-dP/dt<sub>max</sub> és a +/-dCa/dt<sub>max</sub> paraméterek tekintetében, de a szívfrekvencia-fokozódás mértéke megegyezett a kontrolléval. Alacsony dózisú CPS alkalmazására a fruktóz-diétás állatok szíveiben - ellentétben a kontroll szívekben észleltekkel - a  $Ca^{2+}$ -szekvesztráció sebességének (–dCa/dt<sub>max</sub>) jelentős csökkenése volt tapasztalható.

	Kontroll (n=7)			Diabétesz (n=9)		
	nyugalom	ISO	CPS	nyugalom	ISO	CPS
<b>Szívfrekvencia (1/min)</b>	281 ±35	342 ±32 <sup>#</sup>	238 ±43 <sup>#</sup>	279 ±34	350 ±29 <sup>#</sup>	221 ±24 <sup>#</sup>
<b>+dP/dt<sub>max</sub> (Hgmm/s)</b>	2363 ±413	4094 ±603 <sup>#</sup>	1740 ±245 <sup>#</sup>	1878 ±392*	4308 ±798 <sup>#</sup>	879 ±279* <sup>#</sup>
<b>-dP/dt<sub>max</sub> (Hgmm/s)</b>	1842 ±267	2968 ±603 <sup>#</sup>	1268 ±395 <sup>#</sup>	1537 ±229*	3278 ±662 <sup>#</sup>	650 ±221* <sup>#</sup>
<b>+dCa/dt<sub>max</sub> (10<sup>3</sup> nM/s)</b>	23,7 ±4,5	29,9 ±6,3 <sup>#</sup>	20,4 ±5,0	15,1 ±4,0*	26,1 ±8,4 <sup>#</sup>	13,4 ±4,3*
<b>-dCa/dt<sub>max</sub> (10<sup>3</sup> nM/s)</b>	10,2 ±2,2	16,5 ±4,6 <sup>#</sup>	9,3 ±2,4	6,2 ±1,6*	13,1 ±6,0 <sup>#</sup>	4,2 ±1,6 <sup>#</sup> *

\*:p<0,05 Diabétesz vs. Kontroll; <sup>#</sup>:p<0,05 ISO vagy CPS kezelés vs. nyugalmi érték (ANOVA, Student-Neumann-Keuls post hoc test)

**Következtetés:** A korábbi vizsgálatainkban megfigyelt diabéteszes kardiális diszfunkció háttérében egyértelműen kimutatható a szív  $Ca^{2+}$ -háztartásának zavara. A diabéteszes szívekben a luzitrop zavarral párhuzamosan megjelenő csökkent  $Ca^{2+}$ -szekvesztráció, és annak alacsony dózisú SERCA2a gátló iránti fokozott érzékenysége a SERCA2a funkció sérülésére utal. A hanyatló szívfunkció kompenzálására fokozott béta-adrenerg válaszkésztség alakul ki, ami elsősorban a SERCA2a működésének serkentésén keresztül érvényesül, és kevésbé érinti a szívfrekvenciát.

Témavezetők: dr. Ivanics Tamás, dr. Miklós Zsuzsanna

### **Sejtalapú terápia alkalmazási idejének jelentősége in vitro szívinfarktus-modellben**

**Bevezetés:** A szívizom iszkémiát követő károsodásának csökkentésére, funkciójának javítására az utóbbi években megkezdődött a sejtalapú terápiák alkalmazási lehetőségeinek kutatása. Különböző kísérletes modelleken számos sejttípusról bebizonyították, hogy javíthatják az iszkémiás szív funkcionális regenerációját: új vérereket képeznek, szívizomsejtté differenciálódnak, angiogenezist serkentő vagy apoptózist gátló faktorokat termelnek. Autológ csontvelői őssejtek és más sejttípusok felhasználásával klinikai vizsgálatok is megkezdődtek, azonban a sejterápiával kapcsolatban a pontos mechanizmus felderítése, a legmegfelelőbb sejttípus kiválasztása, a sejtek bejuttatásának optimális ideje és módja, valamint az esetleges mellékhatások még tisztázatlanok. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a terápia során alkalmazandó sejtek hozzáadásának időpontja hogyan befolyásolja a károsodott sejtek túlélését.

**Módszerek:** Az iszkémiás állapotot in vitro körülmények között, H9c2 patkány szívizomsejtvonalon oxigén- és glükózmegvonást (OGD) alkalmazva modelleztük. A sejteket Vybrant DiO fluoreszcens membránfestékkel jelöltük, majd az OGD 2,5 óra időtartamára a médiumot lecseréltük glükózmentesre és N<sub>2</sub> gáz alkalmazásával 0,4% alá csökkentettük az O<sub>2</sub> szintet. Az OGD-t követően 0, 30, 60, és 240 perc elteltével a károsított sejtekhez Vybrant DiD festékkel jelölt, egészséges H9c2 sejteket adtunk. Kontroll csoportként egy olyan OGD-t elszenvedett csoportot használtunk, amely nem kapott egészséges sejteket. Az OGD előtt, majd 24 óra elteltével 4 látótérben fotókat készítettünk, hogy megállapítsuk az élő és halott sejtek számát. A halott sejteket Ethidium-homodimer festéssel, valamint morfológiai tulajdonságaik alapján különítettük el. A számoláshoz Photoshop és ImageJ szoftvereket alkalmaztunk, s a kezdeti sejtszám arányában fejeztük ki a túlélő sejtek mennyiségét.

**Eredmények:** A sejtpusztulás mértéke a kontroll, 30., 60. és 240. percben kezelt csoportokban nem különbözött, azonban abban a csoportban, ahol közvetlenül az OGD után adtuk az egészséges sejteket, a túlélő sejtek aránya lecsökkent.

sejtek hozzáadásának időpontja	kontroll	0. perc	30.perc	60. perc	240. perc
túlélő sejtek aránya	89,4±0,5	12,0±11,3*	85,0±0,4	89,9±2,0	85,6±2,3

\*: p<0,001 0.perc vs. többi csoport (átlag±SEM, ANOVA, Neumann-Keuls post hoc teszt)

**Következtetés:** Az OGD után közvetlenül hozzáadott egészséges sejtek rontják a károsodott sejtek túlélését. Ezt a negatív hatást az magyarázhatja, hogy a reaktív vegyületeket tartalmazó környezet a hozzáadott sejtek egy részének pusztulását okozta. A sejthalál során apoptotikus faktorok és reaktív vegyületek szabadulhattak fel, circulus vitiosus-t hozva létre, így az OGD által már károsított sejtek pusztulását növelték.

**Témavezetők:** Dr. Kiss Levente, Dr. Lacza Zsombor

### **Az inozitol-1,4,5-triszfoszfát lokális hatásainak vizsgálata emlős sejtben**

Az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP3), mint második hírvívő alapvető szerepet játszik a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -anyagcseréjében. A klasszikus képnek megfelelően a  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló hormonok és neurotranszmitterek hatására a sejtmembránon keletkező IP3 eldiffundál az endoplazmás retikulumhoz (ER), majd aktiválja annak membránján található IP3-érzékeny  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákat, létrehozva ezzel azt a raktárból történő kezdeti  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást, amely a kialakuló citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -jel első szakaszát adja. A raktárürülés hatására létrejövő kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -influx pedig a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel fenntartott fáziséért felelős. Az irodalomból ismert, hogy a humán 1-es típusú IP3-receptor 224-605-ös aminosavig terjedő szakasza felelős az IP3 kötéséért, ez a úgynevezett ligand-kötő domén (IP3R-LBD).

A munkacsoport korábbi munkájából ismert, hogy az IP3R-LBD, amelyet piros fluoreszcens fehérjével (RFP) jelöltük, egy olyan citoplazmában elhelyezkedő fúziós fehérjét eredményezett, amelyet sikeresen használtak citoplazmatikus IP3-pufferolásra, gátolva ezzel az agonista ingerlést követő  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulását (1). Jelen munkában célunk a lokális IP3 hatások jelentőségének vizsgálata volt, aminek az érdekében ezt a fehérjét N-, illetve C-terminálisan megfelelő irányítoszekvenciákkal láttuk el, és különböző sejtorganellumok felszínére irányítottuk. Így lehetőségünk nyílt arra, hogy az egyes sejtalkotók (ER, mitokondrium, plazmamembrán) citoplazma felé eső részein, jól meghatározott térben kössük meg az agonista stimulus hatására képződő IP3-at. Kísérleteinket COS-7 sejteken végeztük. A fúziós fehérjék lokalizációját konfokális mikroszkóppal ellenőriztük. A  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáló agonista (ATP) hatására kialakuló citoplazmatikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  változást Fura-2 fluoreszcens festék alkalmazásával, digitális képalkotó eljárással követtük egy olyan mikroszkópos rendszerben, amely lehetővé tette az egyes fúziós fehérjék expressziójának párhuzamos meghatározását is. Így tehát egy-sejt szinten tudtuk vizsgálni, hogy az adott sejtorganellumok környezetében pufferolt IP3 milyen módon változtatja meg a sejtekben kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kinetikáját.

Eredményeink alapján a plazmamembránhoz irányított IP3R-LBD, és ennek következtében a szubplazmalemmális térben történt IP3 pufferolás hatására késéssel ugyan, de létrejött a szinkronizált  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás. A  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál ilyen módon történő megváltozása megfelel az IP3 sejtmembránban való keletkezésének. Az ER-hoz irányított IP3R-LBD ugyancsak a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulásának jelentős késését eredményezte, aminek magyarázata az, hogy az IP3R-LBD konstrukciónak sokkal nagyobb az affinitása az IP3-hoz, mint a sejtek endogén receptorainak. Meglepő módon a mitokondrium külső membránjára irányított IP3R-LBD már nagyon alacsony expressziós szint mellett igen hatékonyan gátolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál kialakulását, azonban az expresszió növelésével ez a gátló hatás csökkent. Mindez egyrészt megerősíti a már korábban is feltételezett ER-mitokondrium kapcsolat jelentőségét a  $\text{Ca}^{2+}$  anyagcserében, másrészt felveti annak lehetőségét, hogy az ER-mitokondrium kapcsolódási pontok alapvető szerepet játszanak magában a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakulásában. A nagyobb expresszió esetén tapasztalt hatástalanságot az ER-mitokondrium struktúra megváltozásának tulajdonítjuk, az ezt megerősítő morfológiai vizsgálatok folyamatban vannak.

1. P. Varnai, A. Balla, L. Hunyady, and T. Balla, Targeted expression of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) ligand-binding domain releases  $\text{Ca}^{2+}$  via endogenous IP3R channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(22):7859-64.

Témavezető: Dr. Várnai Péter

**Fürjész Dóra ÁOK V., Ahres Abdelkrim ÁOK IV.**

Semmelweis Egyetem ÁOK, Kardiológiai Központ, Budapest

Semmelweis Egyetem ÁOK, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, Budapest

### **A ghrelin hatásának vizsgálata izolált kutya koronária arteriolákon**

A ghrelin a növekedési hormon elválasztását serkentő receptor (GHS-R) endogén ligandja. A keringő ghrelin jelentős hányada a gyomor mucosa X/A sejtjeiben termelődik, de a peptid mRNS-e több sejtfeleségben, így érendotél- és szívizomsejtekben is kimutatható. A ghrelin a növekedési hormon elválasztásának fokozásán és összetett anyagcsere hatásain túl a szív és az érrendszer működését is befolyásolja: csökkenti a vérnyomást, növeli a perctérfogatot, valamint kardioprotektív hatásokkal is rendelkezik. A peptid direkt érhatása azonban még nem tisztázott: dilatátor vagy konstriktor válasz - fajoként és érterületenként eltérő módon - egyaránt felléphet.

Kísérleteink célja a ghrelin koronária hatásának vizsgálata volt spontán és emelkedett értónus mellett. Vizsgálni kívántuk továbbá a ghrelin legtöbb hatását közvetítő receptor altípus, a GHS-R1a szerepét az érválasz létrejöttében.

Vizsgálatainkat egészséges kutyaszívűből izolált intramurális koronária arteriolákon végeztük (belső átmérő átlag $\pm$ SEM: 210 $\pm$ 16 $\mu$ m, n=16). Az ereket izolálás után mindkét végükön kanuláltuk, majd 50 Hgmm-es intraluminális nyomáson normál Krebs-Ringer (nKR) oldatban inkubáltuk 30 percig. Ezután mikroangiometriás módszerrel az érátmérő változását mérve követtük a növekvő koncentrációban adott ghrelin (30-100-300 nM) hatását spontán tónus mellett, majd egy thromboxán (TXA2) analóg, az U46619 (1 $\mu$ M) adásával megemelt tónusú ereken (n=8). További kísérletekben az érhatások GHS-R1a receptor-függését vizsgáltuk specifikus blokkolószert (D-Lys3-GHRP-6, 50  $\mu$ M) jelenlétében (n=8). A statisztikai értékelést párosított Student-féle t-tesztel végeztük.

Eredmények szerint a ghrelin nem okozott szignifikáns érátmérő-változást a normál tónussal rendelkező izolált érszakaszon. U46619-el végzett prekontrakciót (érátmérő változás,  $\Delta d_{max}$ : -25 $\pm$ 4 %, p<0,01) követően azonban a ghrelin további kontrakciót idézett elő ( $\Delta d_{max}$ : 25 $\pm$ 9 %, az U46619 hatás százalékában, p=0,03). A GHS-R1a blokkoló nem befolyásolta a ghrelin által kiváltott vazokonstriktiót, bár a receptorok jelenlétét immunhisztokémiai vizsgálattal igazoltuk.

Eredményeink szerint a ghrelin kutya koronária arteriolákon megemelt tónus esetén érszűkítő hatással bír. A vazokonstriktor válasz nem GHS-R1a receptor aktiváción keresztül jön létre - annak hátterében más, eddig ismeretlen receptorális mechanizmus állhat.

A vizsgálat anyagából eddig sem nemzetközi, sem hazai folyóiratban nem jelent meg közlemény.

Témavezető: Dr. Sax Balázs, Dr. Nádasy György

**Az extracelluláris ionkörnyezet hatása a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ioncsatornák aktivitására cisztás fibrózisos légúti hámsejtekben**

**Bevezetés:** A „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator” (CFTR) fehérjét kódoló gén mutációja következtében irreverzibilisen károsodik a cAMP-függő transepithelialis iontranszport. Következésképpen, cisztás fibrózisban (CF) a légúti hámsejtek felszínét borító folyadékréteg összetétele és volumene is megváltozik, amely hozzájárul a krónikus tüdőbetegség kialakulásához. A jövő CF terápiájának egyik fontos eleme lehet a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ioncsatornák aktiválása, amely pótolja a cAMP-függő aniontranszport kiesését. Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy CF légúti hámsejtekben a  $\text{Zn}^{2+}$  alkalikus,  $\text{Na}^+$ -mentes oldatban megemeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Jelen munkánkban arra kerestük a választ, hogy a  $\text{Zn}^{2+}$ , illetve az extracelluláris ionkörnyezet indukálta intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jel képes-e  $\text{Cl}^-$  és/vagy  $\text{K}^+$  áramokat kiváltani CF sejtekben.

**Módszerek:** Kísérleteinkhez CF légúti hámsejteket (IB3-1) használtunk. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változását mikrofluorometriás eljárással vizsgáltuk. A sejteket  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitív fluoreszcens festék (Fluo-3-AM; 4  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a fluoreszcencia intenzitásának változását inverz konfokális mikroszkóp segítségével regisztráltuk. Az ionáramok méréséhez a sejtek membrán potenciálját -50 mV-on tartottuk, majd 100 ms időtartamú, 20 mV-onként emelkedő tesztpotenciálokat (-100 és +100 mV között) alkalmaztunk. A feszültség/áramerősség összefüggést a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában határoztuk meg.

**Eredmények:** NaCl-tartalmú extracelluláris oldatban sem az alkalinizáció (pH 7.4-ről pH 8.2-re), sem a  $\text{ZnCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ) nem okozott szignifikáns  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedést és nem fokozta az ionáramokat. Az extracelluláris  $\text{Na}^+$  elvonása ( $\text{Na}^+$  helyettesítés N-methyl-D-glucaminnal; NMDG<sup>+</sup>) alkalikus közegben (pH 8.2) szignifikáns  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedést és az inward, illetve outward ionáramok fokozódását eredményezte. A  $\text{ZnCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ) tovább fokozta mind a  $\text{Ca}^{2+}$  jel, mind az ionáramok amplitúdóját. Az inward áram fokozódása szignifikánsan gátolható volt a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatorna antagonistá nifluminsav (100  $\mu\text{M}$ ) hozzáadásával, illetve az extracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  3 mM-ről 0.1 mM-ra csökkentésével. Az outward áram fokozódását az extracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  csökkentése csak részben gátolta. A nagy konduktanciájú  $\text{K}^+$  csatornák gátlása (iberiotoxin; 100 nM), illetve az intracelluláris  $\text{K}^+$  helyettesítése  $\text{Cs}^+$ -nal nem védte ki a  $\text{Zn}^{2+}$  indukálta outward ionáramok fokozódását.

**Következtetések:** Korábbi megfigyeléseinken túlmenően, jelen eredményeink azt mutatják, hogy az extracelluláris tér ionösszetételének megváltozása önmagában is eredményezhet olyan amplitúdójú intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelet, amely az iontranszport fokozódásához vezet. Mind az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedése, mind az ionáramok gátolhatók az extracelluláris közeg  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának csökkentésével, ami arra utal, hogy az extracelluláris térből történő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás fontos szerepet játszik a jel kialakulásában. A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  és  $\text{K}^+$  áramok stimulálása pozitív hatást gyakorolhat a CF betegek légúti hámsejtjeinek működésére.

**Az előadás témájában a munkacsoport által közölt korábbi publikációk:**

1. Zsembery Á. et al. Extracellular zinc and ATP restore chloride secretion across cystic fibrosis airway epithelia by triggering calcium entry. J. Biol. Chem. 2004; 279:10720-9.
2. Hargitai D. és mtsai. Új lehetőségek a cisztás fibrózis kezelésében – légúti hámsejtek mint közvetlen célpontok? Medicina Thoracalis 2007; 5:286-292.

Témavezető: Dr. Zsembery Ákos

**A zona pellucida vastagsága és a praeembryo egyéb morfológiai jellemzői közti összefüggések vizsgálata az in vitro fertilizációs (IVF) kezelések során.**

**Bevezetés:** Az in vitro fertilizációs kezelések során beültetésre kerülő praeembryók mindösszesen 15%-a ágyazódik be a méh nyálkahártyájába, ezért az embryotransfert (ET) megelőzően igen fontos a megfelelő életképességű előébrények kiválasztása. A praeembryók életképességének megítélésére napjainkban a legelterjedtebb módszer az osztódó előébrény morfológiai vizsgálata, mely a sejtszám, fragmentáció, morfológiai pontérték valamint a zona pellucida (ZP) vastagságának meghatározásából áll. Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy az embriók életképességével összefüggő morfológiai bélyegek milyen kapcsolatban állnak a zona pellucida vastagságával. Adataink értékelésével arra kerestük a választ, hogy a ZP normálistól eltérő vastagsága mennyiben befolyásolja az embriók életképességét, valamint a beágyazódás esélyét. **Anyag és módszer:** Retrospektív tanulmányunkban a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán 2005. november és 2008. május között elvégzett 830 IVF kezelés során beültetett 2336 praeembryót vizsgáltuk. A beültetésre került praeembryók hagyományos morfológiai vizsgálata mellett a zona pellucida vastagságának mérését is elvégeztünk. Az IVF kezelések során hormonális petefészek stimulációt követően ultrahangvezérelt tüszőpunkció útján nyertük a petesejteket, amelyeket saját készítésű tápoldatban inkubáltuk a megtermékenyítésig. A férj ondómintájából meghatároztuk a hímivarsejtek koncentrációját, motilitását, morfológiai sajátosságait. A hímivarsejtek minőségétől függően került sor a megtermékenyítés módszerének kiválasztására, ami hagyományos IVF kezelés, vagy intracitoplasmikus spermium injectió (ICSI) lehet. A megtermékenyítés után 16-18 órával került sor a megtermékenyülés ellenőrzésére. A praeembryók fejlődését a 2. és a 3. napon is ellenőriztük. A megtermékenyítést követő 2. illetve 3. napon került sor a praeembryók beültetésére. Az ET előtt a praeembryókról fénymikroszkópos fotókat készítettünk, amelyeken OCTAX Eyeware számítógépes program segítségével határoztuk meg a beültetésre kerülő praeembryók átlagos ZP vastagságát. Az így kapott ZP vastagságok alapján hoztunk létre a 15 µm alatti vékony (A csoport), a 15-20 µm közötti normál (B csoport) és a 20 µm és fölötti vastag (C csoport) ZP csoportokat. Az így létrehozott három ZP vastagsági csoportban összevetettük az embryók életképességét meghatározó morfológiai jellemzőket, valamint megvizsgáltuk, hogy milyen összefüggés van a ZP vastagsága és a beágyazódás esélye között. **Eredmények:** A sejtszám tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a vizsgált ZP csoportokban. A fragmentáció mennyiségét vizsgálva azonban szignifikáns eltérést találtunk (A: 15.4±9.0; B: 16.8±10.0, C: 18.2±10.7;  $P < 0.01$ ). A morfológiai pontérték a normál és a vastag csoportban szintén szignifikáns eltérést mutatott (A: 2.3±0.5; B: 2.3±0.5, C: 2.2±0.5;  $P = 0.04$ ). A biztosan beágyazódott és a biztosan be nem ágyazódott praeembryók csoportjában a ZP vastagságát hasonlóan találtuk. **Következtetések:** A ZP vastagsága összefügg az embriók életképességét mutató egyéb morfológiai jellemzőkkel, mint a fragmentáció és a morfológiai pontérték, vagyis a normálnál vastagabb zona pellucida kedvezőtlen embryófejlődéssel, jelentősebb mennyiségű fragmentációval társul. Ugyanakkor a normálnál vastagabb ZP beágyazódásra gyakorolt kedvezőtlen hatását nem sikerült igazolni. Ezek tükrében az egyértelmű eredményekhez további vizsgálatok elvégzése szükséges.

Témavezetők: Prof. Dr. Urbancsek János, Dr. Fancsovits Péter

**Hunyor Réka ÁOK V.**

Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet

**A muszkarinos receptorok jelátviteli folyamatai a húgyhólyag simaizom-tónusának szabályozásában**

**Kérdésfelvetés:** A simaizom-kontrakció klasszikus jelátviteli elmélete szerint a heterotrimér  $G_{q/11}$  fehérjék aktiválódása foszfolipáz C-mediálta inozitol-triszfoszfát képződésen keresztül intracelluláris  $Ca^{++}$ -felszabaduláshoz és ezáltal a miozin-könnyűlánc-kináz aktiválódásához vezet. Emellett bizonyos agonisták hatására a miozin-foszfataz gátlása okozza a kontrakciós választ, amiért az utóbbi évek kutatásai szerint a  $G_{12/13}$  fehérjék által aktivált kis G-fehérje RhoA szabályozta Rho-kináz (ROCK) enzim felelős. Munkánkban arra kerestük a választ, hogy ezek közül a jelátviteli utak közül melyik vesz részt a húgyhólyag simaizomzatában expresszáldó, élettani és terápiás szempontból is kulcsszerepet játszó muszkarinos receptorok ( $M_2$  és  $M_3$ ) aktiválódásának közvetítésében.

**Módszerek:** Vizsgálatainkat vad típusú (WT),  $G\alpha_{11}$ -deficiens (11KO), valamint simaizom-specifikus, kondicionális gendelációs technikával előállított  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  dupla knock out (q/11KO) és  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  dupla knock out (12/13KO) egerekből izolált húgyhólyagokon végeztük. Western blot analízissel igazoltuk a  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  ill.  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  fehérjék hiányát a kondicionális knock out egerek húgyhólyagjának simaizomzatában. Meghatároztuk a fiziológiás sóoldattal történő feltöltésük során kialakuló nyomásváltozásokat (cisztometria), valamint a belőlük preparált simaizom-szeletek kontrakciós válaszait miográffal.

**Eredmények:** WT simaizom-szeleteken a muszkarinos agonista carbachol ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$   $\mu$ M) erős, dózis-függő kontrakciót váltott ki, ami csökkent az  $M_2$  receptor antagonistá AFDX-116 (1  $\mu$ M) jelenlétében és majdnem teljesen eltűnt az  $M_3$  receptor antagonistá 4-DAMP (1  $\mu$ M) adása után. A carbachol hatása nem változott 11KO és 12/13KO, de több mint 50 %-kal csökkent q/11KO egerekből származó húgyhólyagban és a maradék kontrakciós hatás gátolható volt AFDX-116 adásával. A ROCK gátlószer Y-27632 (10  $\mu$ M) mindegyik kísérleti csoportban csökkentette a carbachol okozta kontrakciós válaszokat.

A WT, 11KO és 12/13KO egerek cisztometriás eredményei nem különböztek egymástól, azonban a q/11KO húgyhólyagok tónusos nyomásemelkedése mintegy 50 %-kal csökkent, a fázisos nyomáshullámok pedig majdnem teljesen eltűntek. Ez utóbbi változások megegyeztek a WT húgyhólyagokban atropin (10  $\mu$ M) jelenlétében tapasztalt képpel.

**Következtetések:** A húgyhólyag simaizomzatának összehúzódásában az  $M_3$  receptorok által aktivált klasszikus  $G_{q/11}$  jelátviteli út játssza a főszerepet. Ennek potenciózásában részt vesz a ROCK valószínűleg  $M_2$  receptorok által közvetített, de meglepő módon  $G_{12/13}$ -tól független aktiválódása. Ez utóbbi jelátviteli út tisztázását tervezzük további kísérleteinkben.

**Témavezetők:** Dr. Benyó Zoltán és Dr. Ruisanchez Éva

**Az előadás témájában a munkacsoport által megjelentetett publikációk:**

Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Örsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind JS, Offermanns S:  $G_{12}$ - $G_{13}$ -LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. **Nature Medicine**, 2008; 14: 64-68

### Duox enzimek expressziójának vizsgálata knock-out állatmodellekkel

A NADPH oxidázok családjába tartozó Duox enzimeknek eddig két funkcióját azonosították. Az enzimek a pajzsmirigyben a tireociták apikális membránjában találhatóak, ahol hidrogén peroxidot termelnek, melyet a tireoperoxidáz tirozin aminosavak jódozására és a keletkezett jód-tirozin oldalláncok keresztkötésére használ fel, a pajzsmirigy hormon bioszintézis során. Nyálmirigyben, légutakban és a végbélben a Duox enzimek az immunvédekezésben játszanak szerepet, mely során az általuk termelt hidrogén-peroxidot a laktoperoxidáz egy hatékony antimikrobiális vegyület, a hipotiocianát képzésére használja.

A pajzsmirigyben betöltött funkciót bizonyítják olyan betegek, akiknél a hipotireózis hátterében Duox2 mutációt sikerült igazolni. Bár a Duox1 enzim expressziója szintén jelentős pajzsmirigyben, nem ismert Duox1 mutációra visszavezethető hipotireózis. A laborunkban rendelkezésünkre álló Duox1 és Duox2 knock-out (KO) egértörzsek is ezt igazolják: a Duox2 KO egerek hipotireózisban szenvednek, azonban a Duox1 KO egereknek semmilyen feltűnő fenotípusos elváltozása nincsen. A két Duox KO egér eltérő fenotípusa alapján célul tűztük ki a Duox1 enzim szerepének azonosítását.

A Duox1 és Duox2 KO egér törzseket heterozigóta formában tartjuk fent, az utódokat PCR reakcióval genotipizáljuk. A funkció megismeréséhez a lokalizáción keresztül szeretnénk eljutni, tehát első lépésben RNS szinten próbáltuk meg elkülöníteni az enzimek jellemző előfordulási helyeit. Knock-out és vad típusú egerek szöveteiből RNS-t izoláltunk, melyekben real time PCR-rel új, eddig nem ismert helyeken találtunk Duox mRNS-t. Duox2 esetében magas mRNS szintet detektáltunk az epehólyagban, Duox1 esetében pedig nyelöcsőben, húgyhólyagban és tejmirigyben találtunk magas, bőrben, szívben és haránt csíkkolt izomban pedig alacsonyabb RNS expressziót.

A pontosabb lokalizáció érdekében immunhisztokémiai festést kezdtünk az RT-PCR-rel is vizsgált helyeken. A fehérje detektálást 8  $\mu$ m-es fagyasztott metszeteken végeztük, egy poliklonális antitesttel, melyet egy belga kutató csoport bocsátott rendelkezésünkre. A Duox enzimek nagy mértékű homológiája miatt, az antitest mindkét Duox enzimet felismeri, melyek elkülönítését a rendelkezésünkre álló knock-out egerek teszik lehetővé.

Az immunhisztokémiai lokalizáció során a nyálkahártyák és a bőr többrétegű laphámjában, valamint a húgyhólyag urotheliumban láttunk Duox1 festődést.

Korábban már leírták, hogy a Duox2 enzimek a légutakban az immunvédekezésben van szerepe. A peroxidáz enzimekről pedig ismert, hogy antibakteriális hatásuk mellett ditirozin keresztkötésre képesek. Annak eldöntéséhez, hogy az általunk elsőként detektált új expressziós helyeken a Duox1 enzim az immunvédekezésben vagy a hámréteg stabilizálásában játszik-e szerepet, a lokalizáción túl még további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink, új expressziós helyek azonosításában és ezeken belül a fehérje pontos szövettani lokalizációjában mutatnak túl, a témavezető e területen eddig megjelent közleményein.

1. M. Geiszt, J. Witte, J. Baffi, K. Lekstrom, T. L. Leto. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* (2003) 17,1502-1504.

2. Á. Donkó, Z. Péterfi, A. Sum, T. Leto, M. Geiszt. Dual oxidases. *Phil. Trans. R. Soc.B.* (2005) 360, 2301-2308.

Témavezető: Donkó Ágnes, Dr. Geiszt Miklós



### **Feszültségfüggő protoncsatorna (H<sub>v</sub>1) humán fehérvérsejtekben**

Feszültségfüggő, depolarizáció-aktivált protonáramot több emlős és nem emlős sejttypusban is leírtak. A legtöbb kísérletet - melyek ezen áram biofizikai és farmakológiai tulajdonságait jellemezték - hemopoetikus eredetű sejteken végezték, legfőképp granulocitákon. Az intenzív kutatás ellenére kevés ismerettel rendelkezünk a protonáramok fehérvérsejtekben és egyéb sejtekben betöltött szerepéről. Fagociták esetében elfogadott, hogy a feszültség-függő protonáram hatékonyan csökkenti a légzési robbanás során a NADPH-oxidáz (phox) által okozott potenciálisan veszélyes mértékű depolarizációt és intracelluláris elsavanyodást. Ismert csatornaféhrje hiányában azt feltételezték, hogy a phox nemcsak elektron-transzporterként, hanem protoncsatornaként is működik. A feltételezés ellen szólt azonban, hogy a különböző phox alegységekre (p47phox, gp91phox) deficiens granulociták gyakorlatilag normál depolarizáció-aktivált protonárammal rendelkeznek. A 2006-os év során viszont klónoztak egy humán fehérvérsejt (H<sub>v</sub>1), amit különböző sejt vonalakba transzfektálva nagy szelektivitású, depolarizáció-aktivált protonáramot hozott létre. Érdekes módon azonban a natív H<sub>v</sub>1 kifejeződését nem sikerült semmilyen fehérvérsejtben sem kimutatni, noha feszültségfüggő protonáram jelenléte ezekben a sejtekben egyértelműen bizonyított.

A fenti ellentmondás tisztázása céljából nyulak immunizálásával poliklonális antitesteket állítottunk elő H<sub>v</sub>1 N-terminális 99 aminosava ellen (aH<sub>v</sub>1-N). Az affinitás-tisztított aH<sub>v</sub>1-N-t Western-blotban alkalmazva vizsgáltuk nyugvó fehérvérsejtekben H<sub>v</sub>1 kifejeződését. Magas expressziót tapasztaltunk mind monociták, mind neutrofil és eozinofil granulociták esetén (a bazofil granulocitákat nem vizsgáltuk). Limfociták közül B-sejtekben jelentős H<sub>v</sub>1 kifejeződést tapasztaltunk, T-sejtekben viszont nem detektálható megbízhatóan ezen fehérje. Továbbiakban immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia segítségével azt vizsgáltuk, hogy hogyan viszonyul egymáshoz H<sub>v</sub>1 és gp91phox expressziójának mértéke, ill. elhelyezkedése. A gp91phox kifejeződését 7D5 jelű monoklonális egér hibridóma felülúszójával detektáltuk. Perifériás vérkenetben, illetve tisztított és letapasztott fehérvérsejtekben vizsgálódva megfigyelhetőek bizonyos tendenciák. Polimorfonukleáris sejtek esetén aH<sub>v</sub>1-N jelölés eozinofilekben bizonyult a legerősebbnek. A neutrofilek jelölődése ennél általában gyengébb, de meglehetősen változó mértékű volt. 7D5-tel viszont neutrofileken tapasztaltunk erőteljesebb jelölődést. A kolokalizáció mértéke eozinofilekben bizonyult erősebbnek, míg a neutrofilek többségében a két jel egyértelműen elkülönült. Monocitákban az eozinofilekhez hasonlóan magas aH<sub>v</sub>1-N jelintenzitást és gyakori kolokalizációt tapasztaltunk. Limfociták közül csak a sejtek egy része jelölődött, de azok általában mindkét antitisszel. Kolokalizáció azonban nem volt jellemző. Szérum opszonizált zimozánnal összehozott granulocitákban 10 perc elteltével fagoszómák kialakulása tapasztalható, melyek falában aH<sub>v</sub>1-N és 7D5 nagyon hasonló mintázatban dúsul, jelentősen növelve ezzel a kolokalizációt neutrofilekben is.

Fenti kísérleteink igazolják, hogy H<sub>v</sub>1 valóban jelen van a legtöbb fehérvérsejt membránjában, így létrehozhat ott protonáramot. Az pedig, hogy H<sub>v</sub>1 a fagoszóma falában gp91phox-szal együtt dúsul, igazolni látszik a neki tulajdonított oxidázt támogató szerepet.

A fenti adatokból jelenleg kézirat készül.

Dr. Petheő Gábor és Dr. Geiszt Miklós

**Liktor Balázs, ÁOK, VI.**

Farmakológia Osztály, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest

### **ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ változások egér hemicochlea preparátum Corti-szerv sejtjeiben**

A  $Ca^{2+}$  és az ATP fontos szerepet játszanak a belfül sejtjeinek intra- és intercelluláris jelátvitelében élettani és kórelattani körülmények között is. Mindeztáig hiányzott egy olyan *in vitro* preparátum, amely őrzí az eredeti anatómiai struktúrát, mentes a szövettenyészetek adaptív metabólikus változásaitól és amelyben egyszerre mérhető a már kifejtett hallással rendelkező egér Corti-szerv szenzoros és támasztó sejtjeinek  $Ca^{2+}$  regulációja. Kifejlesztettünk egy olyan módszert, amellyel 15-21 napos egerek cochleáját a modiolusnál vibratómmal félbevágjuk és az így elkészített hemicochleában CCD kamerával időben követjük a perfundált és fluoreszcens mikroszkópba helyezett preparátum sejtjeinek intracelluláris  $Ca^{2+}$  változásait. A sejtet  $Ca^{2+}$  érzékeny fura-2/AM-mel töltöttük. A preparátum előnye, hogy a Corti-szerv összes sejtípusa szöveti környezetében vizsgálható. ATP perfúziójával ismételtő  $Ca^{2+}$  válaszokat tudunk kiváltani a külső és belfő szőresejtben valamint a támasztó pillér, Deiters és Hensen sejtben. Meghatároztuk az ATP dózis-hatás görbét, a válasz deszenzitizációjának időtartamát és vizsgáltuk a válaszok  $Ca^{2+}$  forrásait. A módszer, összehasonlítva a drog jelenlétében és hiányában adott ATP válaszokat, alkalmazható potenciális gyógyszerjelöltek tesztelésére. Egy *in vivo* cochleoprotektív hatást mutató, jelenleg fejlesztés alatt álló vegyület, előzetes tesztelését el is végeztük a módszer segítségével.

Témavezető: Dr. Zelles Tibor

## Lőrincz Márton Ákos, ÁOK, VI.

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät Mannheim, Ruprecht-Karls Universität, Heidelberg

### A p63RhoGEF szerepe a simaizomsejtek angiotenzin II jelátvitelében.

Az angiotenzin II (angII) az egyik legjelentősebb peptid az emlősök vérnyomás-szabályozásában, ezért kulcskérdés jelátvitelének pontos megértése a szabályozás végrehajtósejtjén, a simaizomsejten. Német laborom korábban leírta a p63RhoGEF és a Gαq direkt interakcióját, mely felvetette a simaizomsejtekben is a RhoA aktivációjának Gαq-kapcsolt receptorok általi szabályozását.<sup>1,2,3</sup> Ilyen receptor az AT1R, melyről nemrégiben leírták, hogy a klasszikus Gαq-PLC-IP3-Ca<sup>2+</sup> jelátviteli úttól függetlenül G<sub>12-13</sub>-p115RhoGEF úton RhoA aktivitásnövekedést okoz, és ezáltal kontrakciót vált ki a simaizomsejtekben. A két jelátvitel között kapocs lehet a p63RhoGEF, ezért vizsgáltuk szerepét a simaizomsejtek angII indukálta RhoA aktivációjában, proliferációjában és fenotípus-változásában.

Kísérleteink során 6-8 hetes patkány aortából izolált simaizomsejt kultúrákat használtunk, melyekben 5-ös típusú adenovírus (ad5) infekcióval RGS2 proteint termeltettünk, mely a Gαq protein GTP-áz aktivitását növeli, ezáltal gátolja a Gαq jelátvitelt. Szintén ad5 vírussal juttattuk be az aktivitással nem, de Gαq kötő képességgel rendelkező p63RhoGEFΔN protein DNS-ét, valamint a p63RhoGEF shRNS-t, mellyel a sejtek p63RhoGEF mennyiségét csökkentettük, és így specifikusan gátoltuk a Gαq-p63RhoGEF jelátvitelt. Rhotekin pulldown technikával vizsgálva a sejtek RhoA-GTP mennyiségét, megállapítottuk, hogy mind a Gαq fehérje gátlása, mind a p63RhoGEF knockdown jelentős mértékben csökkentette a sejtekben az angII kiváltotta RhoA aktivációt a kontroll sejtekhez képest. Vizsgáltuk az shRNS technikával jelentősen redukált p63RhoGEF tartalmú sejtek proliferációját is a kontroll sejtekhez viszonyítva. A sejt kultúrákhoz a 4 napos inkubációs idő végén MTT festéket adtunk, ami a sejtek mitokondriumában sötétlila precipitátumot képez, mely savas izopropanollal oldható és a minta optikai denzitása 570 nm-ren fotométerrel mérhető. Megfigyeltük, hogy ha a médiumban tartósan angII van jelen, akkor a sejtek proliferációs képessége megnő. Ez a proproliferatív hatás 40%-ban gátolható a sejtek p63RhoGEF mennyiségének csökkentésével. Ezen kísérletek során felfigyeltünk rá, hogy az angII hatására a sejtek morfológiája a kontraktilis orsószerű forma fele tolódik el. Ez az eltolódás nagymértékben csökkenthető mind a Gαq jelátvitel direkt gátlásával, mind pedig p63RhoGEF knockdownnal.

Eredményeink azt mutatják, hogy az AT1R a korábban leírt G<sub>12-13</sub>-p115RhoGEF jelátviteli út mellett Gαq-p63RhoGEF úton is szabályozza a RhoA kis G fehérje aktivitását. Ez nemcsak egy újabb lehetőség az angII indukálta kontrakció szignáltranszdukciójában, hanem kapocs az eddig ismert jelátvitel között, és ezáltal szerepet játszhat a kontrakció finom szabályozásában. A simaizom proliferációs és morfológiai vizsgálataink közelebb visznek a renin-angiotenzin rendszer kóros működése következtében megfigyelt érfal-eltváltozások megértéséhez. Ezen folyamatok klinikai jelentősége és összetettsége megkívánja a mérések folytatását az in vivo-hoz közelebb álló rendszereken. Ezért tervezzük p63RhoGEF knockout patkányok sóterhelés utáni vérnyomásmérését, valamint érfaluk szövettani vizsgálatát.

A kutatócsoport korábbi közleményei a témában:

1. Lutz et al., J Biol Chem. 2005 Mar 25;280(12):11134-9.
2. Lutz et al., Genes Dev. 2007 Nov 1;21(21):2731-46.
3. Lutz et al., Science. 2007 Dec 21;318(5858):1923-7.

Témavezető: Dr. rer. nat. Susanne Lutz

**Márki Alex ÁOK V.**

Semmelweis Egyetem, Kórleletani Intézet, Budapest

### **ADMA szuperoxid termelés révén csökkenti az endothélium vasomotoros működését arteriolákban**

Számos humán keringési betegségben megemelkedik a fiziológiásan is megtalálható aszimmetrikus dimetil arginin (ADMA) plazmaszintje. Azonban az ADMA szerepe a mikroerekben kifejlődő betegségek pathomechanizmusában még nem egészen tisztázott. Korábbi eredmények alapján feltételeztük, hogy az ADMA nemcsak mint a nitrogén monoxid szintáz (NOS) természetes kompetitív inhibitoraként a nitrogén monoxid (NO) termelés csökkentése, hanem az emellett oxidatív stressz növelése révén is szerepet játszik mikrovaszkuláris diszfunkció kifejlődésében. Ezért feltételeztük, hogy izolált arteriolákban az ADMA csökkenti az NO donor nátrium-nitro-prusid (SNP) okozta dilatációt.

Patkány gracilis izomból izolált, kanulált arteriolákat (~ 160 µm alap átmérő, 80 Hgmm jelenlétében) használtunk. Kontrol körülmények között az endothélium-függő acetilkolin (ACh) és az endothélium-független NO donor SNP koncentrációfüggő dilatációt okozott (max.: 82 % illetve max.: 94 %). Az ADMA kezelést ( $10^{-4}$  M koncentrációval, inkubálás 30 percig) követően, az ACh indukálta dilatáció nem változott szignifikánsan, míg az SNP indukálta dilatáció szignifikánsan csökkent (max.: 31 %). ADMA és szuperoxid dizmutáz és kataláz (SOD/CAT) együttes inkubációja esetén az SNP indukálta dilatáció szignifikánsan megnőtt (max.: 54 %).

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy mikroerekben ADMA jelenlétében szuperoxid termelődik, ami az NO donor SNP-ből felszabaduló NO-val kapcsolatba lépve peroxinitritet képez, és ezáltal az NO hatásos szintje és a dilatáció csökken. Továbbá az ACh indukálta dilatáció elsősorban endothéliumból származó hiperpolarizáló faktor (EDHF) révén közvetítődik, ami kevésbé érzékeny az oxidatív stresszre. Az ADMA emelkedett szintje mind az NO termelés, mind az oxidatív stressz növelése révén endothélium diszfunkciót okozhat, ami hozzájárulhat a keringési betegségek kifejlődéséhez.

Témavezető: Dr. Veresh Zoltán, Prof. Dr. Koller Ákos

**Németh Adrienn, ELTE TTK, biológus, V évfolyam**  
Semmelweis Egyetem, Kóréletani Intézet, Budapest

### **A retinsav kezelés csökkenti az endotheliális permeabilitást és a feneztrátum-asszociált PV-1 fehérje expresszióját endothel sejteken**

A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), amelyet tumorok által termelt növekedési faktoroként írtak le, megnöveli a PV-1 expresszióját és fokozza az endotheliális permeabilitást. A retinsav, amely egy A vitamin származék, szerepet játszik a sejt differenciációban illetve a diabetes és különböző kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. Feltételezésünk szerint a retinsav módosíthatja a VEGF hatását endothel sejteken. Állításunk igazolására megvizsgáltuk, hogy a retinsav milyen hatással van a PV-1 expressziójára és az endotheliális permeabilitásra endothel sejtenyészeten. A vizsgálatokhoz frissen izolált köldökzsinór-véna eredetű endothel sejteket használtunk, amelyeket 1 illetve 10  $\mu\text{M}$  retinsavval kezeltünk. A PV-1 mRNS illetve fehérje szintjét real-time PCR-el illetve western blottal vizsgáltuk. Az endothel sejtréteg permeabilitását 40 kDa méretű FITC-el jelzett dextránnal határoztuk meg. A 10  $\mu\text{M}$  retinsav kezelés szignifikánsan csökkentette a PV-1 mRNS illetve fehérje szintjét és ez a hatás 48 óra után volt a legerőteljesebb, továbbá szignifikánsan csökkentette az endotheliális permeabilitást is. A 30 perces retinsav előkezelés kivédte a 100 ng/ml VEGF kezelés által előidézett permeabilitás fokozódást és PV-1 mRNS illetve fehérje szint növekedést. Kimutattuk, hogy a retinsav csökkentette az endotheliális permeabilitást és a PV-1 expressziót, továbbá gátolta a VEGF hatását az endothel sejtekre. Eredményeink alapján a retinsav módosíthatja a VEGF permeabilitást fokozó hatását, amelynek a kialakulásában a megnövekedett PV-1 expresszió szerepe lehet.

Témavezető(k): Prof. Dr. Rosivall László  
Bodor Csaba

### Párkányi Adrienn, ÁOK III.

Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet

#### A neutrális szfingomielináz hatásai az értónusra

**Kérdésselvetés:** A szfingolipid mediátorok, melyek szintézisének első lépése a sejtmembrán szfingomielinájének szfingomielináz (SMase) által katalizált átalakulása ceramiddá, irodalmi adatok szerint fontos szerepet játszanak gyulladásos és immun-folyamatokban. Mivel a vérplazma SMase-aktivitása megnő egyes érdiszfunkcióval járó kórállapotokban (pl. diabetes, atherosclerosis, sepsis, krónikus szívelégtelenség) kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy SMase adása okoz-e akut értónus-változást, és ha igen, mi annak a mechanizmusa.

**Módszerek:** Felnőtt hím C57BL/6J (WT) és thromboxán-receptor deficiens (TPko) egerekből izolált 3 mm hosszúságú thoracalis aorta szegmentek kontrakciós és relaxációs válaszait határoztuk meg izometriás körülmények között miográfon. Megvizsgáltuk különböző dózisu (0,05 – 0,5 U/ml) neutrális SMase (nSMase) hatásait az értónusra prekontrakció nélkül, valamint 0,1, 1 és 10  $\mu\text{M}$  phenylephrinnel (PE) okozott prekontrakciót követően.

**Eredmények:** WT erekben a nSMase egy kezdeti kontrakcióból és azt követő relaxációból álló bifázisos értónus-változást okozott. Nem prekontrahált erekben a dilatációs komponens alig volt megfigyelhető, míg maximális prekontrakciót (10  $\mu\text{M}$  PE) követően a dilatáció dominált. A nSMase hatása 0,05 és 0,2 U/ml között dózisufüggő volt, de 0,5 U/ml adásakor már nem fokozódott, ezért további kísérleteinkben 0,2 U/ml koncentrációban alkalmaztuk.

A továbbiakban a nSMase értónust befolyásoló hatásának mechanizmusát vizsgáltuk. Az alábbi táblázatban az 1  $\mu\text{M}$  PE-nel történő prekontrakciót követően 0,2 U/ml nSMase hatására kialakuló kezdeti kontrakciós és azt követő relaxációs hatásokat tüntettük fel a 124 mM  $\text{K}^+$  hatására kialakuló referencia-kontrakció %-ában. Mind WT mind pedig TPko erekben elvégeztük méréseinket élettani körülmények között és a nitrogén monoxid (NO) szintézis 100  $\mu\text{M}$  nitro-L-arginin methyl észterrel (L-NAME) történő gátlását követően. Kezeletlen WT erekhez képest a TPko erekben hiányzott a hatás kontrakciós komponense, míg L-NAME-val kezelt WT erekben fokozott kontrakciós hatás volt megfigyelhető késői relaxáció nélkül. Az L-NAME kezelést kapó TPko erekben a nSMase egyáltalán nem befolyásolta az értónust.

Genotípus	WT		TPko	
	–	L-NAME	–	L-NAME
124 mM $\text{K}^+$ referencia-kontrakció (mN)	9,8 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,4	8,7 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 1,8
0,02 U/ml nSMase kontrakció (%)	20 $\pm$ 4	64 $\pm$ 7***	4 $\pm$ 3*	3 $\pm$ 1*
0,02 U/ml nSMase relaxáció (%)	45 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0**	87 $\pm$ 14**	6 $\pm$ 3**

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. kezeletlen WT (ANOVA, Student-Neumann-Keuls post-hoc test)

**Következtetések:** Kísérleteinkben elsőként írtuk le a nSMase bifázisos hatását az értónusra, valamint azt, hogy ennek kontrakciós komponensét thromboxán  $\text{A}_2$ , míg relaxációs komponensét NO közvetíti. Eredményeink alapján felmerül az endogén szfingolipid mediátorok szerepe az érdiszfunkció kialakulásában fokozott SMase-aktivitással járó kórállapotokban. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy mely szfingolipid mediátor(ok) felelős(ek) a nSMase okozta konstriktor és dilatációs hatásokért.

**Témavezetők:** Dr. Benyó Zoltán és Dr. Ruisanchez Éva

Varga Márk ÁOK V., Garbaisz Dávid ÁOK IV.

### **Szisztémás gyulladásos válaszreakció csökkentésének lehetősége postconditionálással infrarenalis aortakirekesztést követően**

**Bevezetés:** A szervezet stresszingerekre adott gyulladásos válaszai fiziológiai körülmények között a túlélést szolgálják. Az alsó végtag akut vérellátási zavara esetén az izomszövet lokális gyulladása, súlyosabb esetben rhabdomyolysis jelentkezik. Reperfusio során ez az állapot tovább romlik, a capillaris dysfunctio következményeként oedema, esetenként compartment szindróma rontja tovább az érintett terület vérellátását. Az infrarenalis aorta kirekesztésével járó rekonstruktív érműtétek kapcsán az ischaemiás-reperfusió károsodás következményeként ezek a reakciók egyes esetekben generalizált formában is megjelennek. A műtétek postoperatív szövődményeként megjelenő szisztémás gyulladásos válaszreakció (SIRS) a tüdő, a vese, a máj, illetve a bél károsodását hozza létre, így többszörös szervi dysfunkciók (MODS) klinikai képét idézheti elő.

**Célkitűzés:** Kísérletes modellünkben az alsó végtagi nagyérműtétek után kialakuló lokális és generalizált gyulladásos folyamatok mérséklésének lehetőségét vizsgáltuk egy újszerű sebészeti technikával: postconditionálással.

**Anyagok és módszerek:** Hím Wistar patkányokon általános anaesthesiában 180 perces infrarenalis aorta-kirekesztést végeztünk atraumatikus mikroklippel. Az állatok felében a reperfusio első 2 percében postconditionálást hajtottunk végre (10s felengedés/10s reocclusio 6 ciklusban). A haemodinamikai paramétereket invazív artériás nyomásmérővel, a microcirculációs változásokat laser Doppler flowmeterrel (LDF) detektáltuk. A 4., a 24., illetve a 72. postoperatív órában vizelet, szérum, illetve szövettani mintavétel történt, rutin laboratóriumi és morfológiai vizsgálatok céljából. Minden állatból csoportbeosztástól függetlenül azonos anatómiai helyről vettünk mintát (m. rectus femoris, tüdő, vese, vékonybél, máj), melyeket 24 órás 4%-os formalinban történő fixálás után ágyaztunk paraffinba. A vizsgálatokat konvencionális fénymikroszkópos elemzéssel végeztük, hematoxilín-eozin (HE) festés után. A postoperatív szisztémás gyulladásos válaszreakció mértékének jellemzésére a plazma citokinszintjeit vizsgáltuk. Az antioxidáns-státusz vizsgálata is plazmamintákból történt, Heide-Bögl-féle luminometriás módszerrel (Blázovics féle módosítás).

**Eredmények:** A tüdőben a kontroll csoportban partialis atelectasia, pneumocytákárosodás ábrázolódott, a postconditionált állatokban minden időpontban kedvezőbb szöveti képet kaptunk. A m. rectus femoris, illetve a vékonybél szövettani metszetein a postoperatív 24. órában a kontroll csoportban neutrophil sejtes infiltratio és ödéma volt megfigyelhető, míg a postconditionált csoportban a gyulladásos reakció kisebb mértékű volt. A 72 órát túlélő állatokban inflammatio nem volt jellemző. Laser Doppler flowmeterrel a postconditionált csoportokban a reperfusio alatt magasabb áramlási értékeket detektáltunk, a végtag keringése hiperaemiás áramlással stabilizálódott. Luminometriás vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a postconditionált állatok redox homeostasisát a módszer kedvező irányban befolyásolta. A korai szisztémás gyulladásos választ jellemző TNF- $\alpha$  szintje 4 órával a reperfusio kezdete után az áloperált csoportban mért értékhez ( $6,615 \pm 1,423$  pg/ml) képest szignifikánsan emelkedett volt a 3 órás aortakirekesztésben részesített állatokban, azonban a postconditionált csoportban szignifikánsan kisebb értékeket mértünk, mint a kontroll csoportban (kontroll:  $44,904 \pm 8,693$  pg/ml vs. postconditionált:  $22,906 \pm 4,904$  pg/ml).

**Következtetés:** A postconditionálás alkalmas módszernek tűnik az alsó végtagi prolongált ischaemiával járó nagyérműtétek kapcsán fellépő akut lokális izomszöveti, illetve szisztémás gyulladásos válaszreakciók mérséklésére.

**Témavezetők:** Dr. Szijártó Attila, Dr. Gyurkovics Endre

**Végh Borbála, ELTE TTK, biológus, V évfolyam**

**Az angiotenzin II (Ang II) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) szerepe az endoteliális fenesztráció és permeabilitás szabályozásában**

Az ereket borító endotél sejtréteg permeabilitása meghatározó szerepet játszik a szervek működésében. Megnövekedett permeabilitású fenesztrált endotélium található a vesében, májban és kóros körülmények között a tumorokat behálózó erekben is. A fenesztráció kialakulásában több citokin is szerepet játszik. Korábban kimutattuk, hogy az Ang II és a VEGF fokozza az afferens arteriola fenesztrációját és permeabilitását. Munkánk során vizsgáltuk a p38 MAP kináz aktivációjának szerepét a fenesztráció és a permeabilitás szabályozásában, frissen izolált humán köldökzsinór-véna eredetű endotél sejteken, amelyeket Ang II-vel és VEGF-el kezeltünk. A sejtek morfológiai változását, a sejtfelszínen megjelenő fenesztrátumokat atomerő mikroszkóppal, az endoteliális permeabilitást FITC-el jelzett dextránnal határoztuk meg. A fenesztrátum asszociált PV-1 fehérjét western blottal, mRNS szintjét real-time PCR-el detektáltuk. A 48 órás Ang II ill. VEGF kezelés megnövelte a fenesztrációt, a permeabilitást és a PV-1 mRNS szintjét. A PV-1 mRNS növekedés az Ang II kezelés során kétszeres, a VEGF esetében hatszoros volt. A p38 aktivációját gátolva SB203580 előkezeléssel, elmaradt a VEGF ill. Ang II kezelést követő mRNS expresszió növekedés, fenesztrálódás és permeabilitás fokozódás. Eredményeink arra utalnak, hogy az Ang II és a VEGF a p38 aktivációjának és a PV-1 expressziójának fokozásán keresztül szabályozhatja a permeabilitást és a fenesztrációt.

Témavezető(k): Prof. Dr. Rosivall László  
Bodor Csaba