

### **A piruvát elektrofiziológiai hatásai, diabeteses és kontroll patkányszív preparátumokon.**

A piruvát (**P**), mint a glikolízis végterméke több mechanizmuson keresztül is befolyásolhatja a szív elektrofiziológiai paramétereit: növeli a citoplazma foszforilációs potenciálját, elősegíti az inorganikus foszfát redukcióját ill. csökkenti a  $H^+$  koncentrációt, és ezen keresztül a citoplazmatikus redox állapotot befolyásolja. Irodalmi adatok szerint, a **P** növeli a cardiomyocyták akciós potenciál túllövését (OS [mv]), valamint csökkenti a repolarizáció időtartamát (APD [ms]), ezáltal alkalmas lehet a kontraktilitás javítására és szívelégtelenség kezelésére. Elsőként arra kerestünk választ, hogy megfigyelhető-e szignifikáns különbség a diabeteses és kontroll állatok elektrofiziológiai paramétereinek között illetve, hogyan változnak különböző **P** koncentrációk hatására. Kísérleteinket Wistar (150-300g), kontroll (n=28), valamint diabeteses (n=29) hím patkányokon végeztük. A diabeteses indukció 1x75 mg/tskg Streptozotocinnal történt ip. A heparinnal előkezelt patkányok szívének jobb kamrai papilláris izomrostjairól, hagyományos mikroelektrod technikával a következő paramétereket vezettük el: nyugalmi potenciál (RP [mV]), túllövés (OS [mV]), az akciós potenciál amplitúdója (APA [mV]), időtartama (APD [ms]), a depolarizáció maximális és minimális sebessége ( $dV_{max}$ ,  $dV_{min}$  [V/s]). 1 mM, 3 mM, 10 mM, 30 mM koncentrációjú Na-piruvát oldatokkal dolgoztunk.

A mikroelektrod technika mellett, Langendorff módszerrel is vizsgáltuk a **P** hatását a következő paraméterekre: vérnyomás (BP [mmHg]), szívfrekvencia (HR [1/min]), systolés nyomás (BP SYS [mmHg]), diastolés nyomás (BP DIAS [mmHg]), bal kamrai nyomás (LVP [mmHg]), bal kamrai frekvencia (LVP HR [1/min]), bal kamrai systolés nyomás (LVP SYS [mmHg]), bal kamrai diastolés nyomás (LVP DIAS [mmHg]).

Az elektrofiziológiai vizsgálatok során az előző eredményeinkhez hasonlóan a diabeteses csoportban szignifikánsan hosszabb volt az APD. A kontroll csoportban a legnagyobb **P** koncentráció, míg a diabetesesben már a második ill. a harmadik koncentráció is szignifikáns APD csökkenést okozott. Az OS tekintetében, szignifikáns eltérés nem volt tapasztalható egyik csoportban sem.

Langendorff rendszerünkben az LVP és az LVP DIAS értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a kontroll csoportban. A **P** hatására a kontroll csoportban szignifikáns LVP és LVP DIAS érték növekedést észleltünk, míg a diabeteses állatokban nem volt szignifikáns változás. A **P** hatását vizsgálva és a két csoportot összehasonlítva szignifikánsan magasabb értékeket regisztráltunk a kontroll csoportban a következő paraméterek esetén: 3mmol/l koncentrációnál LVP DIAS, 10mmol/l-nél LVP, LVP DIAS, 30mmol/l-nél LVP, LVP DIAS tekintetében.

Elektrofiziológiai eredményeink nagyrészt megfelelnek az irodalomban publikált eredményekkel. A Langendorff szíves eredményeinkkel kapcsolatban elképzelhető, hogy a diabeteses szív esetében nagyobb **P** dózisokra van szükség ugyanazon hatás elérésére. Eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a **P** egy olyan potenciális jövőbeli gyógyszer lehet, amivel a szívelégtelenség (pl. diabetes mellitus okozta) és a kardiogén sokk kezelésében új távlatok nyílhatnak meg, a szív elektrofiziológiájára és hatékonyságára gyakorolt jótékony hatása következtében.

Electrophysiological changes in rat ventricular and atrial myocardium at different stages of experimental diabetes. Kecskemeti V. et al., *Acta physiologica scandinavica* 1999, 166, 7-13.

Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles from control and diabetic histidine decarboxylase knockout and wild-type mice. Szebeni A et al., *Acta Diabetologica* (megjelenés alatt).

Témavezető: Prof. Dr. Kecskeméti Valéria, Dr. Szebeni Andrea

**Fülöp László ÁOK V.**

Semmelweis Egyetem Élettani Intézet, Budapest

### **A p38 MAPK gátló SB202190 mitokondriális hatásainak vizsgálata**

A mellékvesekéreg zona glomerulózájában az aldosterontermelés szabályozásának a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel is fontos tényezője. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az angiotenzin II jelpályában aktiválódó két Ser/Thr kináz, a p38 MAP kináz (p38 MAPK) és egy új típusú protein kináz C, egyidejűleg aktiválódva gátolja a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét. A kísérleteinkben használt p38 MAPK gátlószerrel (SB202190, továbbiakban SB) kapcsolatban azonban az irodalom felvetette, hogy hatását aspecifikusan, nem a kináz gátlásán keresztül fejt ki. Itt ismertetett kísérleteinkben az SB esetleges nem specifikus hatását kívántuk kizárni vagy megerősíteni.

Vizsgálatainkat a glomerulóza sejt immortalizált modelljének számító aldosterontermelő H295R humán sejtvonalon végeztük. A sejteket digitoninnal permeabilizáltuk; a citoszol  $\text{Ca}^{2+}$  és ATP koncentrációja így tetszőlegesen változtatható, a következményes mitokondriális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -változás pedig konfokális mikroszkópiával, fluoreszcens festékkel (Rhod-2) követhető. Kísérleteinkben minden esetben az SB inaktív analógját (SB202474) tekintettük kontrollnak.

A kinázok, így a p38 MAPK is, ATP-t használnak a szubsztrátjuk foszforilációjához. Elméletileg tehát ATP-mentes körülmények között a kináz nem gátolhatja, gátlószere pedig nem fokozhatja a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét. Ha ATP mentes körülmények között gátlószerehatást tapasztalunk, az aspecifikus hatást feltételez. Alábbi kísérleteinkben minden esetben gátoltuk a mitokondrium ATP-termelését oligomicinnel. Amennyiben, az irodalomnak megfelelően, a permeabilizált sejteket hexokináz és glükóz hozzáadásával ATP-mentesítettük, majd a citoszol  $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját 100 nM-ról 1  $\mu\text{M}$ -ra emeltük, a következményes mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel valóban fokozott volt SB jelenlétében. Ha azonban az ATP-mentesítést apyrase-zal (egy másik ATP bontó enzimmal) és 2-dezoxi-glükózzal végeztük, akkor a gátlószere már nem növelte a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt. Az SB továbbá hatástalan bizonyult olyan sejteken, melyekben a p38MAPK transzlációját előzőleg siRNS-sel csökkentettük.

Az alapkérdéstől függetlenül megfigyeltük továbbá, hogy a permeabilizáció önmagában  $\text{Ca}^{2+}$  jelet vált ki. Ez a  $\text{Ca}^{2+}$  jel a digitonin közvetlen és a permeabilizáló oldatban található ADP purinerg agonista hatásának bizonyult.

Eredményeink alapján az SB202190 ténylegesen a p38 MAPK gátlásán keresztül fejt ki mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt fokozó hatását: ATP vagy célfehérje hiányában a gátlószere hatástalan. Megfigyeléseink továbbá hangsúlyozzák, hogy permeabilizált sejteken végzett kísérletek során különös figyelem fordítandó a permeabilizáló oldat által esetlegesen kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  jelekre, illetve arra, hogy megfelelő ATP-mentesítés csak kellő körültekintéssel érhető el.

Az alábbi megjelent cikkek kapcsolódnak a témához:

[Spät A, Fülöp L, Koncz P, Szanda G.](#) When is high-Ca microdomain required for mitochondrial Ca uptake? *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Oct 28. [Epub ahead of print]

[Szanda G, Koncz P, Rajki A, Spät A.](#) Participation of p38 MAPK and a novel-type protein kinase C in the control of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. *Cell Calcium*. 2008 Mar;43(3):250-9.

Az előadásban bemutatott kísérletek és azok eredményei ezen cikkekben nem szerepelnek.

Témavezető: Dr. Szanda Gergő

**Philipp Kirsch ÁOK IV, Bence Pap ÁOK IV**

Semmelweis University, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Nagyvárad tér 4., 1089, Budapest

**The gastroprotective effect of centrally injected agmatine and its interaction with the endogenous opioid system**

**Introduction:** In 1984, a previously unknown clonidine-displacing substance was partially purified from calf brain. 10 years later it was designated agmatine (decarboxylated arginine) and described as an endogenous ligand of the imidazoline binding sites. Recently, agmatine is known as an endogenous neuromodulator, which binds also to  $\alpha_2$ -adrenoceptors and serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors and is induced in response to stress and/or inflammation. While the antidepressant, anxiolytic, neuroprotective and other central effects (relief from pain and prevention of morphine tolerance) of agmatine have been intensively studied and well documented, the effect of agmatine on gastrointestinal functions has not been clarified.

**Methods:** The ethanol-ulcer model was used. After 24 h starvation, male Wistar rats were given 0.5 ml acidified ethanol orally. The mucosal lesions were evaluated 1 h later.

Agmatine was given either intracerebroventricularly (i.c.v.) or intraperitoneally (i.p.) 10 and 20 min before the ethanol challenge, respectively. The  $\alpha_2$ -, imidazoline I(1)- and opioid-receptor antagonists were injected peripherally (s.c.) or centrally (i.c.v.) 20 and 10 min before the administration of agmatine, respectively.  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA) and norbinaltorphimine (norBNI) were given i.c.v. 24 h before the experiment.

**Results:** 1. Agmatine after both central (0.044 - 1.76 nmol/rat i.c.v.) and peripheral (18 - 438 nmol/kg i.p.) administration exerted a dose-dependent gastroprotective effect. 2. The non-selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist yohimbine (5  $\mu$ mol/kg s.c.), the selective  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor subtype antagonist BRL-44408 (15 nmol/rat i.c.v.) and  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor subtype antagonist prazosin (4.8 nmol/rat i.c.v.) inhibited the agmatine-induced mucosal protection. 3. The imidazoline I(1) receptor antagonist efaroxan (4 nmol/rat i.c.v.) also antagonized the effect of agmatine. 4. Similarly, the non-selective opioid-antagonist naloxone (2.75  $\mu$ mol/kg s.c.) and the selective  $\delta$ -receptor antagonist naltrindole (0.5 nmol/rat i.c.v.) abolished the effect, while the selective  $\mu$ -receptor antagonist  $\beta$ -FNA (20 nmol/rat i.c.v.) and the selective  $\kappa$ -antagonist norBNI (14 nmol/rat i.c.v.) failed to reduce the agmatine-induced protection.

**Conclusions:** Agmatine via activation of central  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor subtypes and imidazoline I(1) receptors may initiate a chain of events which result in the gastric mucosal protection. Endogenous opioid system - by central  $\delta$ -opioid receptors - may be involved in the mucosal protective effect of agmatine.

These results have not been published yet. Some publications from our group in this field:

Gyires K, Zádori Z. Analysis of central mechanisms involved in gastric mucosal integrity. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2008;10(3):121-5.

Zádori ZS, Shujaa N, Köles L, Király KP, Tekes K, Gyires K. Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection. *Peptides.* 2008;29(12):2257-65.

Gyires K, Zádori ZS, Shujaa N, Minorics R, Falkay G, Mátyus P. Analysis of the role of central and peripheral alpha2-adrenoceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat. *Neurochem Int.* 2007;51(5):289-96.

Dr. Zoltán Zádori, Dr. Klára Gyires

**Tuftsín alapú kemotaktikus drug targeting konjugátumok vizsgálata**  
***Tetrahymena pyriformis* modell-sejten**

Napjaink gyógyszerterápiájában előtérbe kerül a sejtek célzott kezelése, melyre megoldást jelenthet a munkacsoportunk által kidolgozott új módszer az ún. kemotaktikus drug targeting (CDT). Ekkor a célsejtek kemotaxisának és fagocitózisának indukciójával érjük el a kívánt hatóanyagkoncentrációt. A kedvező hatást a CDT konjugátumok felépítése biztosítja. A hordozó molekulához kapcsolódó kemoattraktáns ligandok a sejtek kemotaktikus válaszát indukálják, míg a hordozó molekula a konjugátum internalizációjának elősegítésével a hatóanyag koncentrációjának sejtbelti fokozását éri el. A konjugátum spacer szekvenciájának célzott megválasztása – pl. lizoszómális enzimekre érzékeny kapcsolás - a hatóanyag intracelluláris felszabadulását eredményezi.

Munkánkban oligotuftsín hordozóhoz kötött, kemotaktikus ligandként tuftsín motívumokat tartalmazó és citotoxikus gyógyszert tartalmazó konjugátumok hatásait vizsgáltuk csillós eukariótán, mint referencia sejten. Célunk volt: (i) tisztázni a kemotaktikus hatás és a ligand kémiai szerkezetének viszonyát; (ii) vizsgálni, hogy a hatóanyag megőrzi-e a rá jellemző sejtproliferációt gátló hatását a konjugátumokban; (iii) összehasonlítani a csillós egysejtűn és THP-1 humán monocitán nyert eredményeket.

Modell-sejtként *Tetrahymena pyriformis* GL sejteket alkalmaztunk. A kemotaxist multichannel-kapilláris assay-vel mértük. A vizsgált molekulák: TKPR, TKPPR, TKPKG; ezekből kialakított oligomer hordozók [TKPKG]<sub>4</sub> = OT20 és a [TKPPR]<sub>4</sub> = OTp20 és a fenti tetra és penta peptideket oldalláncként tartalmazó OT20 és OTp20 konjugátumok. A peptidek az ELTE Szerveskémiai Tanszékén készültek. A molekulák hatását 10<sup>-12</sup>-10<sup>-6</sup> M koncentrációtartományban vizsgáltuk. Citotoxikus hatóanyagként a folátantagonista methotrexátot (Mtx), illetve daunorubicint (Dau) vizsgáltuk. A proliferáció mérésekor a sejtdenzitásokat ELISA Readerrel határoztuk meg (λ=620 nm). Az adatok statisztikai kiértékelését Origin 8.0 Pro programmal végeztük.

A TKPPR széles koncentráció tartományban (10<sup>-12</sup>-10<sup>-11</sup>; 10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup>M) mutatott szignifikánsan attraktáns hatást, ennek oligomerje az OTp20 pedig az összes koncentráción szignifikánsan növelte az aktivitást. Az OTp20 konjugátumok közül a Dau-OTp20-(TKPPR)<sub>4</sub> 10<sup>-9</sup>-10<sup>-6</sup> M koncentráció tartományban szignifikánsan repellens hatást mutatott, míg a Dau-OTp20-(TKPR)<sub>4</sub> konjugátum 10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup> és 10<sup>-11</sup> M koncentrációkon attraktánsnak bizonyult. A kemotaxis ligandspecifitását jól mutatja az OT20-(TKPKG)<sub>4</sub> és az OT20-(AcTKPKG)<sub>4</sub> ellentétes hatása. Hasonlóan az oldallánc formilezése is meghatározó, következtében a konjugátum attraktáns jellege repellenssé alakul. Míg a Mtx kapcsolása nem befolyásolta jelentősen a konjugátum kemotaktikus karakterét, addig a daunorubicin jelenléte repellens hatást váltott ki, kivéve a Dau-OTp20-(TKPR)<sub>4</sub> molekula esetében. A proliferáció vizsgálat eredménye alapján a methotrexát és a daunorubicin konjugátumban is megtartja gátló jellegét.

Összefoglalva: A CDT konjugátumokban a TKPPR és az OTp20 kedvező komponensnek bizonyul. Az oligomer forma kemotaxist növelő, az oldalláncok acetilezése repellens hatású volt. THP-1 humán monocita modellel összehasonlítva egyes ligandok eltérő hatást mutatnak, pl. OT20-(fTKPR)<sub>4</sub> Tetrahymenában repellens, monocitán szignifikánsan kemoattraktáns. A konjugátumok e családja fentiek alapján a CDT jó jelöltjének ígérkezik.

Korábbi évek során SE TDK Konferencián az előadásban elhangzó anyag kis része, OT20 és 7 derivátuma THP1 sejteken került bemutatásra. A jelenleg Tetrahymenán bemutatott 28 anyag elemzésére, eddig nem került sor, sem előadáson, sem írásos formában más szerzővel.

Témavezető: Dr. Láng Orsolya

## Mihályi Csaba ÁOK V., Kollárovics Nóra ÁOK IV.

Semmelweis Egyetem, Kardiovaszkuláris Centrum, Kutató Laboratórium és Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, Budapest

### Acetilcolin hatásvizsgálata izolált szívmodellen

Az acetilcolin (ACh) és a bradikinin (BK) jellemző érhatása az endotélfüggő vazodilatáció, ami nitrogén-monoxid (NO) és prosztaciklin felszabadulás révén jön létre. Ugyanakkor közvetlenül az ér-simaizomra hatva mindkét szabályozó ágens konstriktiót vált ki. Irodalmi adatok szerint az izoláltan perfundált patkányszív erei acetilcolinra igen változatos válaszokat adnak. A leggyakoribb hatás a vazokonstriktió, melynek hátterében konstriktor prosztanoidok és tromboxán A<sub>2</sub> által közvetített endoteliális mechanizmusokat találtak. Egyes szerzők tisztán dilatátor, mások bifázisos válaszokat is kaptak.

Az ACh koronária hatásának jobb feltárására, hatásmechanizmusának tisztázására vizsgáltuk az ACh hatásokat Langendorff szerint perfundált patkányszíven, állandó koronária áramlás (12,3±0,4 mL/perc) és szívfrekvencia (280±3 ütés/perc) mellett. A koronária tónust a perfúziós nyomásértékkel (CPP) jellemeztük.

Kísérleteinkben 15 perc inkubáció és 15 perc kontroll fázis után, az endotélfunkciót BK bólus (30 nmol), az ér-simaizom válaszkésztséget nátrium-nitroprussid (SNP) bólus adásával teszteltük (1 nmol). Ezután vizsgáltuk az ACh infúzió (0,01-0,1-1µM) hatásait. További kísérletekben az ACh koronária válasz változását tanulmányoztuk ciklooxygenáz (COX) enzim gátló (indometacin 5 µM), vagy megemelt értónus mellett. Az értónus fokozására vazopresszor ágenseket (tromboxán A<sub>2</sub> agonista U46619, 0,5 nM n=7; vazopresszin 1 IU/L, n=7) alkalmaztunk, valamint fokozott ér-feszülést idéztünk elő (forszírozott perfúzió) átlagosan 81±4 Hgmm perfúziós nyomás eléréséig (n=6).

Normál perfúzió során az ACh infúzió dóziszfüggő konstriktiót eredményezett ( $\Delta\text{CPP}_{\text{max}}$ : 27±8 ΔHgmm, n=8, p<0,01). A BK szignifikáns módon emelte (8±1 ΔHgmm, n=27, p<<0,001), az SNP szignifikáns módon csökkentette (-6±1 ΔHgmm, n=20, p<<0,001) a koronária tónust. Az indometacin infúzió önmagában sem az ACh, sem a BK hatásait nem változtatta meg. Kétszeresére növelt perfúziós nyomás mellett az ACh érösszehúzó hatása nem változott szignifikánsan. Ezzel szemben a BK hatása megfordult és erőteljes dilatációt hozott létre mind U46619 (-41±6 ΔHgmm, n=7, p<0,001), mind vazopresszin (-40±8 ΔHgmm, n=7, p<0,003), mind pedig forszírozott perfúzió (n=6, -21±3 ΔHgmm, p<<0,001) mellett. Az SNP dilatátor hatása is fokozódott magas koronária tónus esetén a kontroll perfúzióhoz képest.

Összefoglalva, kontroll perfúziós paraméterek mellett patkányszíven sem az acetilcolin, sem a bradikinin nem tudta kifejteni a rá jellemző értágító hatást. Az ACh infúziója következetesen erőteljes és szignifikáns vazokonstriktiót váltott ki és ezt a hatást a COX enzim blokádnak nem csökkentette. A BK szintén szignifikáns vazokonstriktiót idézett elő. Ebből arra következtetünk, hogy az izoláltan perfundált szíven az endoteliális dilatátor mechanizmusok kevésbé aktívak, vagy a kapcsolódó jelátviteli utak konstriktor hatású másodlagos hírvivők keletkezésének kedveznek. Ugyanakkor fokozott értónus mellett az addig konstriktor hatású BK szignifikáns és jelentős dilatációt hozott létre. Így valószínűsíthető, hogy a fiziológiás szinthez közeli értónus mellett az ér-endotéliumban aktiválódnak a relaxációhoz vezető reakcióutak, ugyanakkor az ACh és a BK endoteliális hatása eltérő. Mindezek mellett a fokozott értónus az erek NO-függő relaxációs képességét is növeli, amit a magasabb (fiziológiás) értónus mellett tapasztalható nagyobb relaxációs kapacitás magyarázhat.

Ezeket az eredményeket eddig semmilyen közleményben sem hoztuk nyilvánosságra.

Témavezetők: Dr. Kerekes Máté, Dr. Dézsi László

## REDUKTION DER ANTIBIOTIKUM-ASSOZIIERTEN NEPHROTOXIZITÄT DES POLYMYXINS

**Zielsetzung:** Das zu den zyklischen Peptiden gehörende Polymyxin B, ein selektiv gegen Gram negative Bakterien wirkendes Antibiotikum, besitzt nephro- und neurotoxische Nebenwirkungen. In der folgenden Tierversuchsreihe verabreichten wir Polymyxin B in zwei modifizierten Formen (Northern Antibiotics), um dessen mögliche Nebenwirkungen in einem Rattenmodell zu untersuchen.

**Methodik:** Männliche CD Ratten (8 Wochen alt, 211±7g) wurden 14 Tage lang mit NAB7061 (8 und 16 mg/kg/Tag s.c.) und NAB739 (4 und 8 mg/kg/Tag i.p.) behandelt. Mit physiologischer Kochsalzlösung (Negativkontrolle: NaCl) und Polymyxin B (Positivkontrolle: Poly) behandelte Tiere dienten als Kontrolle. Urea, Kreatinin, ALP, GOT, GPT, GGT im Blut bzw. Kreatinin, Albumin im Urin und das Blutbild wurden gefolgt.

**Ergebnisse:** Als Sofortfolgen der Behandlungen waren das Anschwellen der Füße, Hyperämie und Dosis-abhängige Erhöhung der Granulozyten- und Lymphozytenzahl bei der Poly - Gruppe stärker ausgeprägt als in allen NAB Gruppen.

Antibiotikum	Dosierung (mg/kg/Tag)	Neutrophile	Eosinophile	Basophile
Poly	8	0,48±0,15	1,1±0,41	0,33±0,05
Poly	16	0,87±0,36	1,48±0,43	0,43±0,13
NAB7061	8	0,38±0,15	0,83±0,46	0,28±0,05
NAB7061	16	0,41±0,18*	0,78±0,26*	0,38±0,05
Poly	4	0,18±0,02	0,02±0,01	0,01±0,00
Poly	8	0,31±0,14	0,03±0,01	0,01±0,01
NAB739	4	0,14±0,05	0,01±0,00	0,00±0,00
NAB739	8	0,11±0,08*	0,01±0,01*	0,24±0,08

Leukozytenzahl gemessen mit hämatologischem Automaten Cobra Mira. Mittelwert±SD.

\*: p<0.05 vs. gleiche Dosis Poly.

Bei Poly 16 mg/kg/Tag zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Leberenzyme (GOT 56,8 U/l; GPT 17,4 U/l) vs. NaCl (GOT 33,7 U/l; GPT 13,8 U/l). Nur NAB7061 16 mg/kg/Tag verursachte eine mäßige Leberenzymerrhöhung (GOT: 43,4 U/l; GPT: 15,3 U/l).

Poly verursachte eine Dosis-abhängige Albuminurie. Die NAB Antibiotika verursachten eine vorübergehende Albuminurie nur in höheren Dosen.

Tag	Albuminurie (µg/24h)	NaCl	Poly 4	Poly 8	NAB 4	NAB 8
3	Mittelwert	114,7±58,0	91,9±15,0	212,3±175,0 <sup>+</sup>	142,3±42,9	293,0±109,0
7	Mittelwert	47,9±25,8	214,4±99,2 <sup>+</sup>	802,4±472,0 <sup>+</sup>	182,8±60,7	205,0±121,1*
Harvest	Mittelwert	52,6±21,7	212,5±65,7 <sup>+</sup>	314,9±214,6 <sup>+</sup>	120,2±37,5*	208,2±144,1*

Albuminurie (ELISA): (4 = 4 mg/kg/Tag; 8 = 8 mg/kg/Tag). Mittelwert±SD. \*: p<0.05 vs. gleiche Dosis Poly. +: p<0.05 vs. NaCl

Bei der mit NAB behandelten Gruppe war der Anstieg des Blut Urea-Nitrogens geringer, gleichzeitig jedoch konnten wir bei jeder Gruppe nach vorübergehender Erhöhung eine fallende Tendenz feststellen.

**Zusammenfassung:** Unsere Ergebnisse zeigen eine geringere immunologische und Lebertoxizität bei NAB739 und NAB7061 als bei Polymyxin B.

**Themenleiter:** Révész Csaba, Hamar Péter

### A CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor intracelluláris transzportja agonista és antagonistá jelenlétében

A CB<sub>1</sub>-es kannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R) felelős a marihuánában lévő tetrahidrokannabinol hatásainak nagy részéért. A receptor a központi idegrendszerben és egyéb szervrendszerekben is megtalálható, és fontos élettani funkciókban játszik szerepet. A CB<sub>1</sub>R-nak van bazális aktivitása, és laborunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a bazális aktivitást a sejtekben felszabaduló endokannabinoidok okozzák (1). Az irodalomból ismert, hogy a CB<sub>1</sub>R konstitutívan internalizálódik, azonban nem tisztázott, hogy a konstitutív internalizáció receptoraktivitás függő-e. A sejt felszíni receptorszámot növelni lehet CB<sub>1</sub>R antagonistával, vagy a bazális endokannabinoid termelés gátlásával (1), azonban más irodalmi adatok alapján felmerül, hogy a konstitutív internalizáció antagonistá jelenlétében is létrejöhet. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolják a különböző ligandok a receptor internalizációját és intracelluláris transzportját. Kísérleteinkben a CB<sub>1</sub>R lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a receptor intracelluláris transzportjának kinetikáját pedig Biolumineszcens Rezonancia Energia Transzfer (BRET) segítségével követtük tranziensen transzfektált CHO (Chinese Hamster Ovarium) sejtekben. Konfokális mikroszkóppal megvizsgálva azt láttuk, hogy a zöld fluoreszcens proteinnel jelölt CB<sub>1</sub>R (CB<sub>1</sub>-GFP) a sejtmembránon kívül intracelluláris vezikulákban is jelen van, ami a receptor konstitutív internalizációjára utal. Az intracelluláris vezikulák azonosításához koexpresszáltunk CB<sub>1</sub>-GFP-vel piros fluoreszcens proteinnel jelzett Rab kis GTP-áz fehérjéket. A receptor kolokalizált a korai endoszómát jelző Rab5-el, a korai és késői reciklizáló endoszómákat jelölő Rab4-el és Rab11-el, valamint a késői endoszómális és lizoszómális kompartmentet jelölő Rab7-el. BRET mérést használtunk annak vizsgálatára, hogy agonista (WIN55,212-2) és antagonistá (AM251) hatására hogyan változik a receptor internalizációja és intracelluláris transzportja. CHO sejteket transzfektáltunk Renilla-Luciferázzal jelölt CB<sub>1</sub>R-al (CB<sub>1</sub>RLuc) és sárga fluoreszcens proteinnel jelölt Rab fehérjék valamelyikével (Rab5-YFP, Rab4-YFP, Rab7-YFP, Rab11-YFP), vagy a membránt jelölő ICAM integrinnel (ICAM-YFP). A CB<sub>1</sub>RLuc és a fluoreszcensen jelölt fehérjék között BRET jelet detektáltunk és segítségével agonista és antagonistá kezelése után követtük a receptor internalizációjának és intracelluláris transzportjának kinetikáját. Méréseink azt mutatják, hogy agonista stimulusra mind a négy Rab-al jelzett endoszómális kompartmentben megnő a receptorszám a nem stimulált sejtekhez képest, az ICAM felszíni adhéziós proteinnel pedig a BRET-jel csökkent, mutatva, hogy CB<sub>1</sub>R internalizált. Antagonista adására a Rab7-el jelzett késői endoszómális kompartmentben csökkent, a Rab5-el és a Rab11-el jelzett kompartmentekben pedig megnőtt a receptorszám. Eredményeink arra utalnak, hogy CB<sub>1</sub>R antagonistá AM251 hatására ugyan megnő a sejt felszíni receptorszám, azonban ez nem a konstitutív internalizáció gátlásának az eredménye. AM251 jelenlétében a CB<sub>1</sub>R intracelluláris transzportja az agonistával stimulált sejtektől eltérő endoszómális útvonalra terelődik.

1. Turu G, Simon A, Gyombolai P, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L.: The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor-stimulated cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor activity.

J Biol Chem. 2007 16;282(11):7753-7.

Témavezető: Dr. Hunyady László és Dr. Turu Gábor

**Nagy Jenő, AOK IV. évf.**

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerhatástani Intézet, Budapest

## **NIMODIPIN INDUKÁLT SZÉRUM-NOCICEPTIN SZINT MEGHATÁROZÁSA PATKÁNY MIGRÉN MODELLEN.**

A trigeminális ganglion kóros aktivációja feltételezhető az elsődleges-fejfájásbetegségek (migrén, cluster) pathomechanizmusában. A fájdalmas rohamok és a vaszkuláris változások háttérben perifériás és centrális szenzitizáció igazolt. Az ópiát-rendszer közelmúltban felismert nociceptin-receptora (NOP) és ennek endogén agonistája (nociceptin; NC) bizonyított szerepet játszik a fájdalom-érzékelésben. A ganglion trigeminale egyes neuronjai NC-immunopozitívak. Mind cluster-, mind migrén-betegek esetében bizonyítottuk, hogy a plazma NC szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint az egészséges személyeké és a NC-szint funkcionális kapcsolatban áll a fájdalommal.

A migrén modellezésére patkányon unilaterális elektromos ingerlést alkalmaztunk. Az intravénásan adott Evans-blue festéknek az agyi erekben át a *dura materbe* jutó mennyiségét spektrofotometriás módszerrel mértük. A plazma-minták NC-koncentrációjának meghatározása validált <sup>125</sup>I-RIA módszerrel történt.

Az elektromos ingerlés hatására ipsilaterálisan a plazma-protein extravazáció szignifikáns festék-mennyiséget okozott az ellenoldalhoz képest és a plazma-NC szintje szignifikánsan csökkent a sham-operált kontrollokhoz viszonyítva. A migrén profilaktikus kezelésében alkalmazott Ca<sup>2+</sup> csatorna gátló nimodipin megszüntette az ingerlést követő festék-koncentrációban tapasztalt különbséget, továbbá nagyfokú NC szint emelkedést idézett elő. Eredményeink arra utalnak, hogy trigeminovascularis migrén-modellünk alkalmas a nimodipin migrén-ellenes hatásának bizonyítására és a nimodipin intenzív NC-szintet növelő hatásának igazolására.

Témavezető: dr. Tekes Kornélia



**Deprenyl és származékai kemotaktikus és adhéziós hatásának vizsgálata *Tetrahymena pyriformis* és humán monocita (Mono Mac 6) sejteken**

Az L-Deprenyl a MAO-B (monoamino-oxidáz-B) enzim szelektív és irreverzibilis gátlószere, továbbá dopaminfelszabadító, uptake-gátló, antioxidáns és antiapoptotikus hatását is kimutatták. Ennek következménye az a neuroprotektív hatás, melynek révén a Parkinson-kór profilaxisának és terápiájának is része lehet. Széles farmakológiai hatásspektruma révén egyéb, nem idegrendszeri betegségek, mint például atherosclerosis és daganatok megelőzéséhez is hozzájárulhat. A sejtadhézió és a migráció fontos elemének, a sejtvezetnek a károsodását kimutatták a neurodegeneratív betegségek patogenezisében. A tumor- és a metasztázis-képzésben szintén kiemelt jelentősége van a sejtek kitapadásának és migrációjának.

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy (i) az L-Deprenyl és származékai milyen kemotaktikus hatással rendelkeznek csillós protozoon és magasabbrendű, monocita sejteken, (ii) hogyan befolyásolják a monocita sejtek letapadási képességét, (iii) megfigyelhető-e összefüggés a molekulák szerkezete és kemotaktikus, adhézióra kifejtett hatása között.

Vizsgált ligandjaink között szerepelt az L-Deprenyl, a MAO-B enzimet gyakorlatilag nem gátló enantiomer párja, a D-Deprenyl; a racém Deprenyl; a TZ-2599a3, TZ-3321-1, (+)para-fluoro-Deprenyl, (-)para-fluoro-Deprenyl, racém para-fluoro-Deprenyl, JATE-501, JATE-502 analógok; továbbá az L-Deprenyl három metabolitja, az L-amfetamin, az L-metamfetamin, és a Deprenyl-N-oxid.

*Tetrahymena pyriformis* modell-sejtünk kemotaktikus aktivitását két-kamrás kapilláris kemotaxis assay-vel; míg Mono Mac 6 sejteket (humán monocita sejt vonal) módosított Boyden-kamrás (multiwell assay) módszerrel vizsgáltuk. A Mono Mac 6 sejtek adhéziójára gyakorolt hatását impedanciaméréseken alapuló módszerrel (xCELLigence®) határoztuk meg. E mérés során a szigetelő objektumoknak tekinthető sejtek letapadásuk következtében impedanciaemelkedést okoznak, ezt mértük valós idejű követéssel, 24 órán keresztül.

*Tetrahymena pyriformis* sejteken kapott eredményeink szerint az L-Deprenyl  $10^{-11}$  M koncentrációban attraktáns hatású volt, míg a MAO-B enzimet nem gátló izomer párja, a D-Deprenyl gyenge repellens hatást mutatott. A Deprenyl fő metabolitja, a metamfetamin neutrális volt a Deprenyl hatásos koncentrációján, és kemorepellensnek bizonyult – hasonlóan a másik két metabolithoz – nagy koncentrációban ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M). A vizsgált Deprenyl származékok közül a TZ-2599a3 esetén kaptunk szignifikáns attraktáns hatást  $10^{-11}$  és  $10^{-7}$  M koncentrációkon (170% és 165%). Az L-Deprenyl para fluorozott származéka a vizsgált koncentráció tartományban neutrális hatásúnak bizonyult.

Mono Mac 6 sejteken is igazoltuk az L-Deprenyl attraktáns hatását; e detektált hatás lényegesen nagyobb volt (400%), mint a csillós modell-sejt esetén tapasztalt, szintén attraktáns hatás (175%). A sejtadhézióra gyakorolt hatás vizsgálata során a D-Deprenyl  $10^{-9}$  és  $10^{-6}$  M-on is fokozta a Mono Mac 6 sejtek letapadását, szemben izomer párjával, mely rövid távon – 1-8 óra – leghatásosabban  $10^{-12}$  M-on fejtette ki hatását. A Deprenyl metabolitok közül a Deprenyl-N-oxid és a metamfetamin a koncentrációval fordított arányban csökkentették a Mono Mac 6 sejtek adhézióját.

Összefoglalás: a Deprenyl származékok kemotaktikus karaktere és adhézióra kifejtett hatása igazolható volt, továbbá bizonyítottuk, hogy modell-sejtjeink érzékenyen reagálnak már kis szerkezeti módosításokra is. Feltételezhető hogy a Deprenyl és egyes származékainak pozitív hatása a sejtek letapadására és kemotaxisára hozzájárul a neurodegeneratív kórképekben kifejtett kedvező terápiás hatásukhoz és az áttétképződés gátlásához.

Témavezető: Lajkó Eszter, Dr. Köhidai László

## Sas Balázs ÁOK IV.

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest

### **Gyógyszer kötőhelyek vizsgálata nátriumcsatornákon különböző kötési kinetikájú vegyületek segítségével.**

A nátriumcsatorna gátlókat széles körben alkalmazzák mint helyi érzéstelenítő, I. osztályú antiarrhythmikum, antiepileptikum, központi izomlazító, neuroprotektív, stb. vegyületeket. Jelenleg is intenzíven kutatják alkalmazásukat az említett, és más indikációkban is (pl. fájdalomcsillapítóként, affektív zavarok ellen).

A nátriumcsatornáknak (kilenc részletesen karakterizált toxin-kötőhely mellett) egyetlen jól leírt gyógyszer-kötőhelye ismert, az ún. helyi érzéstelenítő kötőhely. Feltételezik, hogy ide kötnek a fent említett, klinikumban használt nátriumcsatorna gátló gyógyszerek (Ragsdale és mtsai, 1996), és hogy hatásukat az inaktivált állapot stabilizálásával fejtik ki. Kimutatták ugyanakkor, hogy a nátriumcsatorna gátló tulajdonsággal bíró vegyületek kémiaiailag rendkívül heterogének (egy ~400 gyógyszer-molekulára kiterjedő vizsgálatban a vegyületek ~1/4-ét találták hatékonynak – Huang és mtsai, 2006). Nem valószínű, hogy mindezek a vegyületek ugyanahhoz a kötőhelyhez kötődjenek. Fontos lenne tehát a kötőhelyeket azonosítani; első lépésben tisztázni, hány kötőhely van, és az egyes nátriumcsatorna gátló vegyületek kémiai természete, hatásmechanizmusa jellemző-e egy adott kötőhelyre.

A kötőhelyek vizsgálatát elektrofiziológiai módszerrel közelítettem meg, rNav 1.2 csatornákat expresszázó HEK 293 sejteken végeztem méréseimet, hagyományos manuális patch-clampet, ill. kísérletek egy részében a QPatch automata patch-clamp rendszert használva. A kísérletekben azt használtam ki, hogy a különböző nátriumcsatorna gátlóknak több nagyságrenddel is eltér a disszociációs kinetikája. A flunarizine gyakorlatilag irreverzibilisen gátol, igen lassú (>1000 s) disszociációt mutat a clobenetine, közepesen lassút (~100 s) a fluoxetine, és gyorsat (<20 s) a lidocaine.

Ha egy gyorsan disszociáló gyógyszer egy lassan disszociálóhoz keverve gyorsítja a gátlásból való visszatérést a kimosás alatt, akkor a két gyógyszernek vagy közös kötőhelye van, amiért versengenek; vagy külön kötőhelyük van, de az egyik bekötése módosítja a másik affinitását. Ha azonban két eltérő kinetikájú gyógyszer egymás kimosódását nem befolyásolja, akkor egészen biztosan külön kötőhelyük van a nátriumcsatornán.

Eredményeim alapján kimondható, hogy a flunarizin kötőhelye különbözik a helyi érzéstelenítő kötőhelytől, de a flunarizin és fluoxetine, a clobenetine és fluoxetine ill. a fluoxetine és lidocaine kötőhelyei között kölcsönhatás áll fenn.

Eredményeim segítik a kötőhelyek azonosítását, és következtetéseket lehet levonni belőlük a kötőhelyek kémiai természetéről is. Ezek az információk a célzott gyógyszer-fejlesztésekben, molekuláris modellezésben hasznosíthatók.

Témavezető: Dr. Mike Árpád

**Teubner, Daniel, DM VI**

Semmelweis University, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Budapest

### **Modulation of glutamate release by capsaicin in different brain regions**

**Introduction.** Capsaicin, a neurotoxin derived from the chili pepper plant, selectively activates vanilloid-gated nonselective cation channels (TRPV<sub>1</sub> receptors). TRPV<sub>1</sub> receptors show rapid desensitization and it may be regarded as a protective mechanism against potential excitotoxicity induced by prolonged exposure with high doses of capsaicin. TRPV<sub>1</sub> receptors are present mainly in nociceptive sensory neurons and are involved in pain sensation, but they are also expressed in neurons of several brain regions, including cerebral and cerebellar cortex, hippocampus, striatum, substantia nigra and locus coeruleus. In most of these brain regions capsaicin, via activating presynaptic TRPV<sub>1</sub> receptors, increases glutamate release. The aim of the present study was to characterize the effect of capsaicin on the glutamatergic transmission in two brain regions: locus coeruleus and striatum.

**Methods.** 200 µm thick coronal slices, containing either the striatum or the locus coeruleus, respectively, were prepared by a tissue slicer from the brain of young rats (8-14 days old). Single slices placed in a recording chamber were superfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Medium spiny interneurons of the striatum or noradrenergic neurons of the locus coeruleus were visualized with an upright microscope and patch-clamp recordings were carried out on these cells. Patch pipettes (resistance: 3-7 MΩ) filled with standard intracellular solution were used to achieve whole-cell patch-clamp configuration, membrane properties were detected and controlled by a patch clamp amplifier. Drugs were applied by slow superfusion. In the presence of bicuculline in the external medium, in order to exclude GABAergic inhibitory currents, spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) were recorded in voltage-clamp configuration from the tested neurons held at a potential of -70 mV. After a 5-min control recording, capsaicin was included in the bath solution for 5 minutes, followed by a 10-min washout-period.

**Results.** Capsaicin (10 µM), caused a robust, significant increase in the frequency of the sEPSCs in the locus coeruleus neurons. This effect was maintained during the whole period of the capsaicin administration. In contrast, 10 µM capsaicin failed to influence the frequency of the sEPSCs in the striatal interneurons. However, at lower concentration (1 µM), capsaicin induced a slight, but significant increase in the frequency of the EPSCs in the striatum as well. However, in contrast to the locus coeruleus, the effect of 1 µM capsaicin disappeared by the third minute of the capsaicin application in the striatum, probably reflecting the rapid desensitization of the presynaptic capsaicin-sensitive receptors. All capsaicin effects could be reversed by the selective TRPV<sub>1</sub> receptor antagonist capsazepine. The amplitude and the half-width of the EPSCs was influenced by capsaicin neither in the striatum nor in the locus coeruleus, suggesting that postsynaptic interactions do not exist between capsaicin and the ionotropic glutamate receptors in these cell types.

**Conclusions.** Our results demonstrate the role of capsaicin in the regulation of the glutamate release in both investigated brain areas. Nevertheless, they also indicate significant differences in this modulatory action of capsaicin in these brain regions. It might reflect expression of different capsaicin-sensitive receptor subtypes and/or distinct functional characteristics of the capsaicin-sensitive receptors (for instance due to splice variants, heteromerization, phosphorylation state of the receptors). It may be resulted in different desensitization properties of the native capsaicin-sensitive receptors in the investigated brain regions of young rats.

Tutors: Dr. Zádori Zoltán, Dr. Köles László

### **Az endocitózis folyamatának térbeli és időbeli felbontása élő sejtekben**

A sejtek receptoraik endocitózisával, internalizációjával képesek változtatni a sejt felszíni receptorszámot, ami alapvetően meghatározza egy adott ligand iránti érzékenységüket. Több endocitózis mechanizmus létezik, ezek egyike a G-fehérjéhez kötött receptorok (GPCR) esetében is végbemenő, úgynevezett klatrin-mediált endocitózis. Napjainkra számos fehérjét azonosítottak, melyek szereppel bírnak az endocitózis folyamatának létrejöttében. Ezek többsége képes a sejtmembránban található inozitol lipidek kötésére, ami ezen lipidek szabályozó szerepét veti fel. Ugyancsak ismert a receptor internalizáció mechanizmusának alapvető folyamata (foszforiláció,  $\beta$ -arresztin kötés, a receptor eljutása a klatrin burkos vezikulába, lefűződés, korai endoszómákba kerülés); azonban e folyamat számos lépéséről, illetve a benne részt vevő fehérjék pontos szerepéről, a lipid reguláció részleteiről ma még igen hiányos a tudásunk. Tekintettel arra, hogy munkacsoportunk kidolgozott egy olyan módszert, ami alkalmas a sejtmembrán inozitol tartalmának, pontosabban a legfontosabbnak tűnő foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát mennyiségének változtatására (1), a módszer felhasználásával megnyílt az út a lipid reguláció részleteinek tisztázására. Mivel az inozitol lipidek több fehérjéhez is képesek kötődni, annak vizsgálatára, hogy az endocitózis melyik pontján fejtenek ki élettanilag fontos hatást, szükségessé vált olyan módszer kidolgozása, amely alkalmas a folyamat lépéseinek térben és időben való jobb felbontására.

Kísérleteink során az 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT1R) internalizációját vizsgáltuk olyan emlős sejt vonalakban (HEK), amelyek stabilan expresszálják a vad típusú, bizonyos esetekben zöld fluoreszcens fehérjével is jelölt humán AT1-es receptort. Ugyancsak rendelkezésünkre állt számos, szintén fluoreszcensen jelölt fehérje ( $\beta$ -arresztin-2,  $\beta$ -adaptin-2, klatrin, Rab5), melyekről ismert, hogy az internalizációs folyamat más-más pontjain játszanak szerepet. Az internalizáció folyamatát a receptor és az említett fehérjék közötti kapcsolat kimutatásával igyekeztünk követni élő sejtben. Ehhez egyrészt konfokális mikroszkópiát, és kolokalizációs méréseket, másrészt az ugyancsak molekuláris kölcsönhatások kimutatására alkalmas Biolumineszcens Rezonancia Energia Transzfer (BRET) technikát alkalmaztuk. Ahogy azt munkacsoportunk egyéb sejtekben korábban kimutatta, a BRET technikával HEK sejtekben is sikerült kimérnünk a  $\beta$ -arresztin-2 angiotenzin II adást követő, receptorhoz való kötődését. Ezen túlmenően, tovább vizsgálva az internalizáció folyamatát egy, a plazmamembrán citoplazmatikus felszínéhez irányított fluoreszcens fehérje felhasználásával sikerült kimutatnunk a receptor plazmamembránból való lefűződését. A Rab5 fehérjével való interakció vizsgálata során szignifikáns BRET érték emelkedést kaptunk, ami viszont megfelel a receptor korai endoszómába való érkezésének. Meglepő módon, bár a konfokális mérésekből egyértelműen látszik a receptor klatrin burokba jutása, BRET méréssel sem az adaptinnal, sem a klatrinnal való interakciót nem sikerült észlelnünk, aminek oka nagy valószínűséggel az, hogy a receptor más fehérjéket is köthet, ami akadályozhatja a molekuláris közelség kialakulását. Ezt a problémát további molekulapárok vizsgálatával kívánjuk megoldani, ugyanakkor eredményeink már ezen a szinten is lehetővé teszik az inozitol lipidek regulációs hatásaira irányuló vizsgálatok elkezdését.

1. P. Varnai, B. Thyagarajan, T. Rohacs, T. Balla (2006). Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol.* 175(3); 377-82.

Témavezető: Dr. Várnai Péter