

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ ENZIM GÁTLÁS ÉS A TERMÉSZETES POLIFENOLOK HATÁSA A KARDIOVASZKULÁRIS REMODELLINGRE ÉS A SZÍVELÉGTELENSÉG KIALAKULÁSÁRA

Dr. Halmosi Róbert



Pécsi Tudományegyetem
Klinikai Központ
I. sz. Belgyógyászati Klinika

2018.

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS.....	6
1.1.	A DOKTORI MŰ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK	6
1.2.	TOVÁBBI, A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ, TELJES TERJEDELMŰ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	8
1.3.	SCIENTOMETRIAI ADATOK	12
1.4.	RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA	14
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	20
2.1.	SZÍVELÉGTENLSÉG.....	20
2.2.	A KOSZORÚÉRBETEGSÉG, MINT A SZÍVELÉGTENLSÉG RIZIKÓFAKTORA	21
2.2.1.	<i>A rezveratrol hatása a kardiovaszkuláris rendszerre.....</i>	<i>22</i>
2.3.	A HIPERTÓNIA, MINT A SZÍVELÉGTENLSÉG EGYIK LEGFONTOSABB PATHOGENETIKAI FAKTORA.....	23
2.4.	A HIPERTÓNIA KARDIO- ÉS CEREBROVASKULÁRIS KÖVETKEZMÉNYEI	24
2.5.	AZ OXIDATÍV STRESSZ JELENTŐSÉGE A KARDIOVASKULÁRIS RENDSZERBEN	26
2.5.1.	<i>Az oxidatív stressz szívizomzatra gyakorolt hatásai.....</i>	<i>27</i>
2.5.2.	<i>Az oxidatív stressz érrendszeri hatásai.....</i>	<i>31</i>
2.6.	A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ ENZIM JELENTŐSÉGE AZ OXIDATÍV SEJTKÁROSODÁS KIALAKULÁSÁBAN.....	32
2.7.	A JELÁTVITELI FAKTOROK SZEREPE AZ OXIDATÍV SEJTKÁROSODÁS FOLYAMATÁBAN ÉS A KARDIOVASKULÁRIS REMODELLINGBEN	34
2.8.	A MITOKONDRIUM SZEREPE A REMODELLING ÉS A SZÍVELÉGTENLSÉG KIALAKULÁSÁBAN	35
3.	CÉLKITŰZÉSEK.....	38
4.	MÓDSZEREK	40
4.1.	EX VIVO ÉS IN VIVO MIOKARDIÁLIS INFARKTUS MODELLEK	40
4.1.1.	<i>Langendorff szívperfúziós vizsgálatok (iszkémia-reperfúzió)</i>	<i>40</i>
4.1.2.	<i>In vivo miokardiális infarktus modell.....</i>	<i>41</i>
4.2.	KRÓNIKUS KÍSÉRLETES SZÍVELÉGTENLSÉG MODELLEK	41
4.2.1.	<i>Posztinfarktusos szívelégtelenség modell.....</i>	<i>41</i>
4.2.2.	<i>Hipertenzív szívelégtelenség modellek</i>	<i>42</i>
4.2.3.	<i>Toxikus szívelégtelenség modell.....</i>	<i>43</i>
4.2.4.	<i>Szövetminták kivétele, tartósítása</i>	<i>44</i>
4.3.	VÉRNYOMÁSMÉRÉS	44
4.4.	TRANSTHORACALIS ECHOCARDIOGRAPHIA	44
4.5.	VASKULÁRIS ULTRAHANG VIZSGÁLATOK.....	46
4.6.	SZÍV NMR VIZSGÁLATOK	46
4.7.	IZOMETRIÁS ÉR-MIOGRÁFIA.....	47
4.8.	PLAZMA BNP KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA	48
4.9.	SZÖVETTAN	48
4.10.	ELEKTRONMIKROSKÓPIA	49
4.11.	AZ INFARKTUS MÉRETÉNEK MEGHATÁROZÁSA	50
4.12.	SZÉRUM NEKROENZIMEK AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA	50
4.13.	A MITOKONDRIÁLIS ENZIMAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA	50
4.14.	A LIPID PEROXIDÁCIÓ ÉS A FEHÉRJE OXIDÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA	51
4.15.	IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS KONFOKÁLIS LÉZER-SCANNING FLUORESCENS MIKROSKÓPIA	51
4.16.	WESTERN-BLOT	52
4.17.	SEJTVIABILITÁSI VIZSGÁLATOK	53
4.18.	A REZVERATROL VIZSGÁLATA POSZTINFARKTUSOS, STABIL KORONÁRIA BETEGEK KÖRÉBEN. A HUMÁN KLINIKAI VIZSGÁLAT MÓDSZERTANA	54

4.18.1.	Betegek és módszerek	54
4.18.2.	Laboratóriumi paraméterek	55
4.18.3.	Hemoreológiai paraméterek	55
4.18.4.	Flow-mediálta vazodilatáció	56
4.18.5.	Echokardiográfia	56
4.19.	STATISZTIKAI ELEMZÉS	56
5.	EREDMÉNYEK	58
5.1.	L-2286-AL KIVÁLTOTT FARMAKOLÓGIAI PARP-GÁTLÁS HATÁSA AKUT STRESSZ SZITUÁCIÓK SORÁN. IN VITRO TESZTEKTŐL AZ IN VIVO SZÍVINFARTUS MODELLIG	58
5.1.1.	L-2286 kezelés hatása a hidrogén peroxid által kiváltott citotoxicitással szemben H9c2 sejtekben	58
5.1.2.	L-2286 kezelés elősegíti a miokardium posztisztkémiás energia homeosztázisának helyreállítását	59
5.1.3.	L-2286 csökkenti iszkémia-reperfúzió során a lipidek és fehérjék oxidatív károsodását ...	60
5.1.4.	L-2286 csökkenti az izoproterenol kezelés által kiváltott szívizomsejt vesztes mértékét ..	61
5.2.	PARP-GÁTLÁS HATÁSA KRÓNIKUS SZÍVELÉGTLENSÉG MODELLEKBEN	62
5.2.1.	PARP gátlás javítja a gravimetriás paramétereket ISO-indukálta szívelégtelenségben	62
5.2.2.	L-2286 mérsékli a posztinfarktusos szívelégtelenség során kialakuló EKG eltéréseket	62
5.2.3.	L-2286 kezelés csökkenti a plazma BNP szintet posztinfarktusos patkányokban	63
5.2.4.	L-2286 megakadályozza a légzési lánc funkciójának csökkenését posztinfarktusos szívelégtelenség modellben	63
5.2.5.	L-2286 csökkenti a szívizomsejt hipertrófia és az intersticiális fibrózis mértékét ISO- indukálta szívelégtelenségben	65
5.2.6.	L-2286 kezelés hatása a PKC izoenzyme aktivitására posztinfarktusos szívelégtelenségben	66
5.2.7.	PARP-gátlás és ACE-gátlás hatása a gravimetriás paraméterekre ISO-indukálta szívelégtelenségben	67
5.2.8.	Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a plazma BNP szintre ISO-indukálta szívelégtelenség modellben	68
5.2.9.	Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a szív struktúrájára és a szisztolés balkamra funkcióra	69
5.2.10.	Az L-2286 és enalapril kezelés hatása az Akt-1 ^{Ser473} és GSK-3 ^{Ser9} foszforiláció mértékére posztinfarktusos szívelégtelenség modellben	70
5.2.11.	Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a PKC izoformák foszforiláltságára ISO-indukálta szívelégtelenségben	71
5.2.12.	A PARP-gátló kezelés hatása hipertenzió indukálta szívelégtelenségben a gravimetriás paraméterekre	73
5.2.13.	L-2286 kezelés hatása hipertenzió indukálta szívelégtelenség modellben a plazma BNP szintre.	74
5.2.14.	L-2286 kezelés hatása az intersticiális kollagén lerakódás mértékére hipertenzió indukálta szívelégtelenségben	74
5.2.15.	L-2286 hatása krónikus hipertenzió által kiváltott szívelégtelenségben az Akt-1 ^{Ser473} /GSK- 3 ^{Ser9} foszforilációra és az ADP-ribosilációra	75
5.2.16.	L-2286 hatása az echocardiographiás paraméterekre időseknél spontán hipertenzív patkányokban	76
5.2.17.	A PARP-gátló hatású L-2286 véd a doxorubicin citotoxikus hatásaival szemben	80
5.2.18.	A PARP-gátlás és a TEMPOL kezelés hatása a gravimetriás paraméterekre, a plazma BNP szintre, valamint a túlélésre DOX-indukálta szívelégtelenség modellben	81
5.2.19.	A PARP-gátlás és a TEMPOL kezelés hatása az echocardiographiás paraméterekre doxorubicin kezelt állatokban	82
5.2.20.	A farmakológiai PARP-gátlás és a TEMPOL hatása az Akt-1/GSK-3 ^{Ser9} , illetve a FKHR foszforilációra, valamint a Hsp72 és 90 mennyiségére DOX-kezelt állatokban	84

5.3.	A PARP-GÁTLÁS HATÁSA A HIPERTENZÍV SZERVKÁROSODÁSOK KIALAKULÁSÁRA. VÉDELEM A KARDIOVASZKULÁRIS REMODELLINGGEL SZEMBEN	86
5.3.1.	A PARP-gátlás hatása fiatal spontán hipertenzív patkányokban a gravimetriás paraméterekre.....	86
5.3.2.	L-2286 kezelés nem befolyásolja a plazma BNP mennyiségét és a vérnyomást fiatal SHR állatokban.....	87
5.3.3.	L-2286 kezelés csökkenti a miokardiumban az intersticiális kollagén lerakódás mértékét	87
5.3.4.	A PARP-gátlás lassítja a hipertenzív kardiopáthia kialakulásának folyamatát spontán hipertenzív patkányokban	88
5.3.5.	Az L-2286 kezelés hatása a Hsp72 és 90 celluláris szintjére	90
5.3.6.	L-2286 kezelés hatása a poli(ADP-ribozil)ációra, valamint az Akt-1 ^{Ser473} /GSK-3β ^{Ser9} és FKHR ^{Ser256} foszforiláció mértékére fiatal SHR állatokban.....	91
5.3.7.	A szívizomsejtek interfibrilláris mitokondriumainak ultrastruktúrális változásai hipertónia és L-2286 kezelés hatására.....	92
5.3.8.	A mitokondriális dinamika vizsgálata hipertenzív állatokban	93
5.3.9.	Az L-2286 kezelés hatása a fúzió-fúzió regulátorainak celluláris mennyiségére és szubcelluláris eloszlására.....	95
5.3.10.	L-2286 kezelés hatása a szisztolés vérnyomásra fiatal SHR patkányokban	96
5.3.11.	Az L-2286 kezelés hatása az aortafal merevségére	97
5.3.12.	Az érfal kollagéntartalmának változása hipertenzió és PARP-gátló kezelés hatására.....	97
5.3.13.	Az aortafal ultrastruktúrális változásainak vizsgálata hipertenzív patkányokban.....	98
5.3.14.	Az L-2286 kezelés hatása az aorta falában a fehérjék poli(ADP-ribozil)ációjára	99
5.3.15.	Az L-2286 kezelés hatása az Akt-1 és a MAP kinázok foszforilációs státuszára SHR állatok aortájában.....	101
5.3.16.	PARP-gátlás hatása az oxidatív stressz markereire és az AIF nukleáris transzportjára SHR állatok aortájában.....	101
5.3.17.	A PARP-gátlás hatása az aortafalban az MKP-1 expresszió mértékére és az NF-κB aktivációra	103
5.3.18.	L-2286 kezelés csökkenti a carotisok struktúrális átépülését SHR patkányokban	105
5.3.19.	PARP-gátlás mérsékli az SHR állatok carotisaiban észlelt fokozott peroxinitrit képződést és az endotél diszfunkciót.....	106
5.3.20.	Hipertenzív állatok carotisaiban az L-2286 kezelés mérsékli az AIF és NF-κB transzlokációt, illetve módosítja az MKP-1 - MAPK jelátviteli út aktivitását.....	108
5.3.21.	A dorzális hippocampus struktúrális eltérései és az oxidatív stresszmarkerek változásai hipertenzív patkányokban	110
5.3.22.	Az L-2286 kezelés csökkentette az oxidatív sejtkárosodás mértékét SHR állatok dorzális hippocampusában	112
5.3.23.	Krónikus L-2286 kezelés csökkentette a hipertónia által indukálta piramis sejtszám csökkenést a hippocampus CA1 areájában	112
5.4.	REZVERATROL HATÁSA POSZTINFARKTUSOS SZÍVELÉGTELENSÉG MODELLBEN	115
5.4.1.	Rezveratrol kezelés javítja a gravimetriás paramétereket ISO-indukálta szívelégtelenség modellben.....	115
5.4.2.	Rezveratrol mérsékli a plazma BNP szintjét posztinfarktusos szívelégtelen állatokban..	116
5.4.3.	Rezveratrol javította a balkamra funkciót és mérsékelt a balkamra hipertrófiát ISO-kezelt állatokban	116
5.4.4.	Rezveratrol csökkenti az intersticiális kollagén lerakódás mértékét a szívizomzatban ...	118
5.4.5.	Rezveratrol hatása a fehérje nitroziláció mértékére	119
5.4.6.	Rezveratrol kedvezően befolyásolja az Akt-1 ^{Ser473} és GSK-3β ^{Ser9} foszforilációt az ISO kezelt állatokban.....	119
5.4.7.	Rezveratrol csökkenti a MAP kinázok foszforilációját és az MKP-1 mennyiségét izoproterenol kezelt állatok szívében.....	120
5.4.8.	Rezveratrol kezelés csökkenti a COX-2 és iNOS expresszióját.....	121

5.5.	A REZVERATROL KARDIOPROTEKTÍV HATÁSA POSZTINFARKTUSOS STABIL KOSZORÚÉR BETEGEKBN	123
5.5.1.	<i>A humán klinikai vizsgálatba bevont betegek demográfiai jellemzői és preventív gyógyszeres kezelése.</i>	123
5.5.2.	<i>A rezveratrol hatása a hemorheológiai és egyes laboratóriumi paraméterekre.....</i>	124
5.5.3.	<i>A rezveratrol hatása a flow-mediálta vazodilatációra</i>	125
5.5.4.	<i>A rezveratrol kezelés hatása a bal kamra funkcióra koszorúér betegekben</i>	126
6.	MEGBESZÉLÉS.....	127
6.1.	AZ L-2286 KÓDJELŰ PARP-GÁTLÓ TULAJDONSÁGAI ÉS JELLEMZÉSE IN VITRO ÉS IN VIVO AKUT STRESSZ MODELLEKBEN	127
6.2.	A PARP-GÁTLÁS HATÁSA KRÓNIKUS SZÍVELÉGTLENSÉG MODELLEKBEN	129
6.2.1.	<i>Posztinfarktusos szívelégtelenség</i>	130
6.2.2.	<i>Krónikus hipertenzió által indukált szívelégtelenség</i>	131
6.2.3.	<i>Antraciklin kezelés által kiváltott szívelégtelenség.....</i>	133
6.3.	A HIPERTÓNIA ÁLTAL KIVÁLTOTT KARDIOVASZKULÁRIS REMODELLING BEFOLYÁSOLÁSA PARP-GÁTLÓ KEZELÉSSSEL	135
6.3.1.	<i>A PARP-gátlás védő hatása a hipertenzió-kiváltotta nagyér átépüléssel szemben.....</i>	136
6.3.2.	<i>A PARP-gátlás hatása a hipertenzív szívbetegség kialakulására.....</i>	137
6.3.3.	<i>L-2286 kezelés védő hatása a magas vérnyomás okozta központi idegrendszeri károsodásokkal szemben.....</i>	138
6.4.	A FARMAKOLÓGIAI PARP-GÁTLÁSSAL KIVÁLTOTT KARDIOPROTEKCIÓ MÉRTÉKÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA MÁR IGAZOLT HATÁSÚ KOMPARÁTOR MOLEKULÁKKAL	140
6.4.1.	<i>Az enalapril és az L-2286 hatékonyságának összehasonlítása posztinfarktusos szívelégtelenség modellben</i>	141
6.4.2.	<i>A TEMPOL és az L-2286 hatékonyságának összehasonlítása antraciklin indukálta toxikus szívelégtelenség modellben</i>	141
6.5.	A PARP-GÁTLÁS KARDIOVASZKULÁRIS PROTEKTÍV HATÁSÁNAK MOLEKULÁRIS ÉS SZUBCELLULÁRIS ASPEKTUSAI	142
6.5.1.	<i>A PARilácó és az oxidatív stressz befolyásolása PARP-gátló kezeléssel.....</i>	142
6.5.2.	<i>Farmakológiai PARP-gátlás hatása a kötőszövetes átépülésre</i>	143
6.5.3.	<i>A remodellingben és a sejttúlélésben szerepet játszó intracelluláris jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitásának befolyásolása L-2286 kezeléssel</i>	145
6.5.4.	<i>PARP-gátlás hatása a hősokk fehérjék szintjére.....</i>	151
6.5.5.	<i>A PARP-gátlás hatása a sejt energetikai jellemzőire, valamint a mitokondrium funkcionális és struktúrális változásaira</i>	153
6.6.	REZVERATROL HATÁSA A POSZTINFARKTUSOS REMODELLING ÉS SZÍVELÉGTLENSÉG KIALAKULÁSÁRA	157
6.7.	A REZVERATROL HATÁSA POSZTINFARKTUSOS STABIL KORONÁRIA BETEGEK SZÍVFUNKCIÓJÁRA ÉS LABORPARAMÉTEREIRE	159
7.	KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	161
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	164
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	199

1. BEVEZETÉS

1.1. A doktori mű alapját képező publikációk

1. PALFI A, TOTH A, KULCSAR G, HANTO K, DERES P, BARTHA E, HALMOSI R, SZABADOS E, CZOPF L, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TOTH K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 315(1): 273-82.

Impakt faktor: 4.098

2. PALFI A, TOTH A, HANTO K, DERES P, SZABADOS E, SZEREDAY Z, KULCSAR GY, KALAI T, HIDEG K, GALLYAS F JR, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3 β pathway. J Mol Cell Cardiol. 2006; 41(1): 149-159.

Impakt faktor: 4.859

3. BARTHA E, KISS GYN, KALMAN E, KULCSAR GY, KALAI T, HIDEG K, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Effect of L-2286, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor and enalapril on myocardial remodeling and heart failure. J Cardiovasc Pharmacol. 2008; 52(3): 253-261.

Impakt faktor: 2.29

4. BARTHA E, SOLTI I, KERESKAI L, LANTOS J, PLOZER E, MAGYAR K, SZABADOS E, KALAI T, HIDEG K, HALMOSI R, SUMEGI B, TOTH K. PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Res. 2009; 83(3): 501-510.

Impakt faktor: 5.801

5. BARTHA E, SOLTI I, SZABO A, OLAH G, MAGYAR K, SZABADOS E, KALAI T, HIDEG K, TOTH K, GERO D, SZABO CS, SUMEGI B, HALMOSI R. Regulation of kinase cascade activation and heat shock protein expression by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in doxorubicin-induced heart failure. J Cardiovasc Pharmacol. 2011; 58(4): 380-391.

Impakt faktor: 2.287

6. MAGYAR K, HALMOSI R, PALFI A, FEHER G, CZOPF L, FULOP A, BATTYANY I, SUMEGI B, TOTH K, SZABADOS E. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients after myocardial infarction. Clin Hemorheol Microcirc. 2012; 50: 179-87.

7. DERES L, BARTHA E, PALFI A, EROS K, RIBA A, LANTOS J, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, GALLYAS F JR, TOTH K, HALMOSI R. PARP-inhibitor treatment prevents hypertension induced cardiac remodeling by favorable modulation of heat shock proteins, Akt-1/GSK-3 β and several PKC isoforms. PloS ONE. 2014; 9(7): e102148.

Impakt faktor: 3.234

8. MAGYAR K, DERES L, EROS K, BRUSZT K, SERESS L, HAMAR J, HIDEK K, BALOGH A, GALLYAS F JR, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. A quinazoline-derivative compound with PARP inhibitory effect suppresses hypertension-induced vascular alterations in spontaneously hypertensive rats. BBA-Molecular Basis of Disease. 2014; 1842(7): 935-944.

Impakt faktor: 4.882

9. HALMOSI R, DERES L, GAL R, EROS K, SUMEGI B, TOTH K. PARP inhibition and postinfarction myocardial remodeling. Int J Cardiol. 2016; 217: S52-9.

Impakt faktor: 6.189

10. EROS K, MAGYAR K, DERES L, SKAZEL A, RIBA A, VAMOS Z, KALAI T, GALLYAS F JR, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Chronic PARP-1 inhibition reduces carotid vessel remodeling and oxidative damage of the dorsal hippocampus in spontaneously hypertensive rats. PloS ONE. 2017; 12(3): e0174401.

Impakt faktor: 2.806

11. RIBA A, DERES L, SUMEGI B, TOTH K, SZABADOS E, HALMOSI R. Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017: 6819281.

Impakt faktor: 4.593

1.2. További, a dolgozat témájához nem kapcsolódó, teljes terjedelmű saját közlemények

1. HALMOSI R, CZOPF L, KÉSMÁRKY G, HABON T, TÓTH K, JURICKSKAY I, RÓTH E, MÓZSIK GY. A haemorheologiai paraméterek és antioxidáns mechanizmusok változása ischaemiás szívbeteggekben nitrát, illetve lovastatin kezelés hatására. Card Hung. 1999; 28: 53-59.

2. CZOPF L, HALMOSI R, KESMARKY G, HABON T, TOTH K, JURICKSKAY I, ROTH E, MOZSIK GY. Lovastatin and nitrate therapy induced changes in hemorheological parameters and in free radical mediated processes in patients with ischemic heart disease. Perfusion. 1999; 12: 50-58.

Impakt faktor: 0.91

3. TÓTH K, TÓTH A, MÁRTON ZS, CZOPF L, KÉSMÁRKY G, HALMOSI R, HABON T, JURICKSKAY I, MÓZSIK GY. A terheléses EKG vizsgálat során bekövetkező QRS amplitúdó változások értékelése ischaemiás szívbetegségben. Magyar Belorv Arch. 1999; 52: 73-80.

4. TOTH K, KESMARKY G, VEKASI J, NEMES J, CZOPF L, KAPRONCZAY P, HALMOSI R, PAPP E, JURICKSKAY I. Hemorheological and hemodynamic parameters in patients with essential hypertension and their modification by alpha-1 inhibitor drug treatment. Clin Hemorheol Microcirc. 1999; 21: 209-216.

Impakt faktor: 0.395

5. KESMARKY G, TOTH K, VAJDA G, HABON L, HALMOSI R, ROTH E. Hemorheological and oxygen free radical associated alterations during and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clin Hemorheol Microcirc. 2001; 24: 33-41.

Impakt faktor: 0.297

6. TOTH A, MARTON ZS, CZOPF L, KESMARKY G, HALMOSI R, JURICKSKAY I, HABON T, TOTH K. QRS score: a composite index of exercise-induced changes in the Q-, R- and S-waves during exercise stress testing in patients with ischemic heart disease. Ann Noninvasive Electrocardiol. 2001; 6: 310-318.

Impakt faktor: 0.989

7. HALMOSI R, BERENTE Z, OSZ E, TOTH K, LITERATI-NAGY P, SUMEGI B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. Mol Pharmacol. 2001; 59: 1497-1505.

Impakt faktor: 5.297

8. HABON T, SZABADOS E, KESMARKY G, HALMOSI R, PAST T, SUMEGI B, TOTH K. The effect of carvedilol on enhanced ADP-ribosylation and red blood cell membrane damage caused by free radicals. Cardiovasc Res, 2001; 52: 153-160.

Impakt faktor: 4.552

9. MARTON ZS, HALMOSI R, HORVATH B, ALEXI T, KESMARKY G, VEKASI J, BATTYANY I, HIDEK K, TOTH, K. Scavenger effect of experimental and clinically used cardiovascular drugs. J Cardiovasc Pharm. 2001; 38: 745-753.

Impakt faktor: 1.553

10. HABON T, SZABADOS E, KÉSMÁRKY G, HALMOSI R, PAST T, SÜMEGI B, TÓTH K. Carvedilol hatása a szabadgyök indukálta ADP-ribozilációra és vörösvértest membrán károsodásra. Acta Pharm Hung. 2001; 71: 1-8.

11. TÓTH A, HALMOSI R, HABON T, SZABADOS E, DERES P, SÜMEGI B, HIDEK K, TÓTH K. Az antioxidáns kezeléstől a poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlókig - a kardioprotekció lehetőségei ischaemia-reperfúzió során. Magyar Belorv Arch. 2001; 54: 107-111.

12. HORVÁTH B, MÁRTON ZS, HALMOSI R, ALEXI T, SZAPÁRY L, VÉKÁSI J, BÍRÓ ZS, HABON T, KÉSMÁRKY G, TÓTH K. Cerebrovascularis támadáspontú gyógyszerek szabadgyökfogó hatásának vizsgálata. Orv Hetil. 2002; 142: 13-17.

13. HORVATH B, MARTON ZS, HALMOSI R, ALEXI T, SZAPARY L, VEKASI J, BIRO ZS, HABON T, KESMARKY G, TOTH K. In vitro antioxidant properties of pentoxifylline, piracetam and vinpocetine. Clin Neuropharmacol. 2002; 25: 37-42.

Impakt faktor: 1.58

14. HALMOSI R, DERES P, BERENTE Z, SUMEGI B, HIDEK K, TOTH K. Pyrroline based compounds in the prevention of oxyradical induced myocardial damage. J Cardiovasc Pharmacol. 2002; 40: 854-867.

Impakt faktor: 1.602

15. MÁRTON ZS, HALMOSI R, HORVÁTH B, ALEXI T, KÉSMÁRKY G, VÉKÁSI J, BATTYÁNY I, HIDEK K, TÓTH K. Kísérleti stádiumban lévő és a klinikai gyakorlatban használt kardiovaszkuláris gyógyszerek antioxidáns hatásának vizsgálata. Card Hung. 2002; 32: 63-69.

16. TOTH A, HALMOSI R, KOVACS K, DERES P, KALAI T, HIDEK K, TOTH K, SUMEGI B. Akt activation induced by an antioxidant compound during ischemia-reperfusion. Free Radic Biol Med. 2003; 35: 1051-63.

Impakt faktor: 5.063

17. TOTH A, KOVACS K, DERES P, HALMOSI R, HANTO K, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, TOTH K. Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66: 2263-72.

Impakt faktor: 2.993

18. DERES P, HALMOSI R, TOTH A, KOVACS K, PALFI A, HABON T, CZOPF L, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, TOTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45: 36-43.

Impakt faktor: 1.313

19. PAPP E, CZOPF L, HABON T, HALMOSI R, HORVATH B, MARTON ZS, TAHIN T, KOMOCSI A, HORVATH I, MELEGH B, TOTH K. Drug-induced myocardial infarction in young patients. Report of two cases. *Int J Cardiol.* 2005; 98: 169-170.

Impakt faktor: 1.765

20. TÓTH K, HORVÁTH B, HALMOSI R, SÜMEGI B, HIDEK K. Vitaminok és antioxidánsok lehetséges szerepe a cardiovascularis betegségek prevenciójában. *Háziorv Továbbképző Szemle.* 2006; 11: 568-572.

21. KISS I, TIBOLD A, HALMOSI R, BARTHA E, KOLTAI K, ORSOS Z, BUJDOSO L, EMBER I. Enhancement of organ regeneration in animal models by a stem cell-stimulating Plant Mixture. *J Med Food.* 2010; 13: 599-604.

Impakt faktor: 1.461

22. MÁRTON L, HALMOSI R, TÓTH K. SHIFT ante portas. *Card Hung Suppl.* 2010; 40: M1-M4.

23. MÁRTON L, HALMOSI R, TÓTH K. Ivabradin a krónikus szívelégtelenség kezelésében: a SHIFT vizsgálat eredményei. *Medical Tribune.* 2010; 8(23): 12.

24. MÁRTON L, HALMOSI R, TÓTH A, TÓTH K. Ivabradin a krónikus szívelégtelenség kezelésében (SHIFT): randomizált, placebokontrollált, klinikai vizsgálat. *Card. Hung.* 2010; 40: 300-307.

25. MAGYAR K, HALMOSI R, PÁLFI A, FEHÉR G, CZOPF L, FÜLÖP A, BATTYÁNYI, SÜMEGI B, TÓTH K, SZABADOS E. A rezveratrol kardioprotektív hatása posztinfarktusos betegekben. *Kardiovaszk Prev Rehab.* 2010; 3: 23-27.

26. TIBOLD A, SZABO, L, BUJDOSO L, KOLTAI K, HALMOSI R, NAGY T, GOMBOS, K, FEHER G, HUSZAR A, KISS I, EMBER I. Protective effect of herbal mixture in isoproterenol induced myocardial injury. *J Proactive Med.* 2012; 1: 27-31.

27. GÁL R, HALMOSI R. A frekvenciakontroll szerepe a szívelégtelenség gyógyszeres kezelésében. 2013; 14(4): 5-7.

28. MAGYAR K, GAL R, RIBA A, HABON T, HALMOSI R, TOTH K. From hypertension to heart failure. World J Hypertens. 2015; 5(2): 85-92.

29. GÁL R, HALMOSI R. [The role of oxidative stress in heart failure]. Orv Hetil. 2015; 156(47): 1916-20.

Impakt faktor: 0.291

30. RIBA A, DERES L, EROS K, SZABO A, MAGYAR K, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R, SZABADOS E. Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISO-induced heart failure. PLoS One. 2017; 12(4): e0175195.

Impakt faktor: 2.806

31. VÖRÖS E, DERES L, HALMOSI R, VÁRADI E, TÓTH K, BATTYÁNI I. Interactions between iodinated contrast media and tissue plasminogen activator: In vitro comparison study. Clin Hemorheol Microcirc. 2017; 66(2): 167-174.

Impakt faktor: 1.815

32. KEMENY A, CSEKO K, SZITTER I, VARGA ZV, BENCSIK P, KISS K, HALMOSI R, DERES L, EROS K, PERKECZ A, KERESKAI L, LASZLO T, KISS T, FERDINANDY P, HELYES Z. Integrative characterization of chronic cigarette smoke-induced cardiopulmonary comorbidities in a mouse model. Environ Pollut. 2017; 229: 746-759.

Impakt faktor: 5.099

Összesített impakt faktor: 80.82

1.3. Scientometriai adatok

Halmosi Róbert tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2018.07.03.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	43	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	28	549	716
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	12	1	3
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	2	3	3
rövid közlemény	---	1	3	3
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	1	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	3	---	1	1
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		1	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)	---	47	557	726
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	48	---	557	726

V. További tudományos művek	4	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	4	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0

VI. Idézett absztraktok⁵	0	---	0	0
--	---	-----	---	---

Idézettség száma¹	---	---	557	726
Hirsch index⁶	15	---	---	---
g index⁶	28	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	4	129
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	9	100
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002-) teljes tudományos folyóiratcikkek	28	435
Az utolsó 10 év (2008-2018) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	18	250
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	133	18,32%
További, az MTMT-ben nyilvántartott idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS és/vagy Scopus rendszerben	97	
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	2	238

1.4. Rövidítések listája

3-AB	3-aminobenzamid
4-HNE	4-hidroxinonenal
4-HQ	4-hidrozikinazolin
4-MQ	4-merkaptokinazolin
8-OxG	8-oxoguanin
³¹ P-NMR	foszforspektrum meghatározása mágneses magrezonanciás vizsgálattal
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
ACEi	angiotenzin konvertáló enzim gátló gyógyszer
ACh	acetilkolin
AIF	apoptózis-indukáló faktor
Akt-1	protein kináz B
ALK-5	TGF-β 1 típusú receptor kináz
AMI	akut szívinfarktus
AMP	adenozin monofoszfát
AMPK	AMP-aktiválta protein kináz
AngII	angiotenzin II
ASI	aorta stiffness index
ASK1	Apoptózis szignál szabályozó kináz
ATF4	ciklikus AMP-dependens transzkripció faktor-4
ATP	adenozin trifoszfát
Bax	Bcl-2 asszociált X fehérje
BBB	vér-agy gát
Bcl-2	B-sejtes lymphoma 2 fehérje
BH ₄	tetrahidrobiopterin
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
BW	testtömeg
CA	cornu ammonis régió
CAMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependens protein kináz II
CCA	artéria carotis communis
CD1	általános használatú egértörzs

CFY	speciális Sprague-Dawley patkánytörzs
CK	kreatin kináz
CMP	kardiomiopátia
COX-2	ciklooxygenáz 2
CRM-1	chromosomal maintenance 1 (transzport fehérje)
CSF	agy-gerincvelői folyadék
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DBP	diasztolés vérnyomás
DD	diasztolés átmérő (aorta)
DMEM	Dulbecco szerint módosított Eagle médium
DOX	doxorubicin
dp/dt	kontraktilitási index
DRP-1	dynamin-related protein-1
DUSP-1	kettős specificitású (dual specificity) foszfatáz
EBM	evidence based medicine
ECM	extracelluláris mátrix
eCSCs	c-kit pozitív endogén kardiális őssejtek
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EF	ejekciós frakció
EKG	elektrokardiográfia
eNOS	endoteliális
ERK	extracelluláris szignál regulálta kináz
ESC	Európai Kardiológiai Társaság
ESR	elektron spin rezonancia
ET-1	endotelin-1
ETC	mitokondriális légzési lánc
FasL	Fas (CD95) ligand
FasR	Fas receptor v CD95
FBS	borjú szérum
FKHR (FOXO1)	Forkhead box fehérje O1
FMD	áramlásfüggő vazodilatáció
FS	frakcionális roströvidülés
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

Gαq	G protein alfa alegységének q altípusa
GD	girus dentatus
GFAP	savanyú fibrilláris gliafehérje
GOT	glutamát oxálacetát transzamináz
GPCR	G protein kötött receptorok
GPX	glutation peroxidáz
GSK-3β	glikogén szintáz kináz-3β
GTP	guanozin trifoszfát
H ₂ O ₂	hidrogén peroxid
HHD	hipertenzív szívbetegség
HFpEF	diasztolés szívelégtelenség (heart failure with preserved EF)
HFmrEF	enyhén csökkent szisztolés funkcióval járó szívelégtelenség (heart failure with midrange EF)
HFrEF	szisztolés szívelégtelenség (heart failure with reduced EF)
HIF-1α	hipoxia által indukált faktor 1α
HSF1	hősokk faktor 1
HSP	hősokk fehérjék
HtrA2	magas hőmérsékletigényű protein A 2
IFM	interfibrilláris mitokondrium
IL-1β	interleukin-1β
IL-6	interleukin-6
IMT	intima-media vastagság
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintáz
ip.	intraperitonealis
IR	iszkémia-reperfúzió
ISO	izoproterenol
IU	nemzetközi egység
IVCT	isovolumetriás kontrakciós idő
IVRT	isovolumetriás relaxációs idő
JNK	c-Jun N-terminal kináz
L-2286	quinazolin származék PARP enzim gátló molekula
LAD	bal elülső leszálló coronária ág
LDH	laktát dehidrogenáz
LVID	balkamrai átmérő

LVEDV	balkamrai végdiasztolés volumen
LVESV	balkamrai végszisztolés volumen
MAO	monoamino oxidáz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MDA	malondialdehid
Mfn	mitofuzin
MI	miokardiális infarktus
MKP-1	MAP kináz foszfátáz-1
MMP	mátrix metalloproteináz
MOMP	mitokondriális külső membrán permeabilizáció
MPO	mieloperoxidáz
MPI	miokardiális teljesítmény index (vagy Tei index)
mPTP	mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus
MRA	mineralokortikoid receptor antagonistá gyógyszer
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
mtDNS	mitokondriális DNS
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NA	nikotinamid
NAD ⁺	nikotinamid-adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B
NMNAT1	nikotinamid mononukleotid adenililtranszferáz 1
NO	nitrogén monoxid
NOXs	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát oxidázok
NT	nitrotirozin
O ₂ ⁻	szuperoxid anion
OH ⁻	hidroxil gyök
OMM	mitokondriális külső membrán
ONOO ⁻	peroxinitrit
OPA1	optikus atrófia fehérje-1
p38-MAPK	p38 mitogén aktiválta protein kináz
Pi	anorganikus foszfát
PAI	plazminogén aktivátor inhibitor

PAR	poli(ADP-ribóz) polimer
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz enzim
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim
PBS	foszfát pufferelte sóoldat
PCr	kreatin foszfát
PD	pulzatis Doppler
PDC	piruvát dehidrogenáz komplex
PGC-1 α	PPAR- γ koaktivator 1 α
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PFA	paraformaldehid
PI3K	foszfatidilinozitol-3 kináz
PKC	protein kináz C
PW	balkamra hátsó fala
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
Ras	rat sarcoma fehérje (GTPáz fehérjék)
RISK	„reperfusion injury salvage” kinázok
ROS	reaktív oxigén szabad gyökök
RWT	relatív falvastagság (balkamra)
RyR	rianodin receptor
S6K1	riboszómális S6 kináz beta-1 fehérje
SBP	szisztolés vérnyomás
sc.	szubkután
SD	szisztolés átmérő (aorta)
SDS	nátrium dodecil szulfát
SERCA	sarco/endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz
sGC	szolubilis guanilát cikláz
SHR	spontán hipertenzív patkány
Sirt	sirtuin (hiszton deacetiláz)
SMAC/DIABLO	kaspázok második mitokondriális aktivátora
Smad	„Mothers against decapentaplegic homolog” fehérjék
SNP	nitroprusszid nátrium
SOD	szuperoxid dizmutáz
TBA	tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav reaktív anyagok

TBS	Tris-pufferelte sóoldat
TBST	Tweent tartalmazó Tris-pufferelte sóoldat
TCA	trikloroacetát
TDI	szöveti Doppler képalkotási mód
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
TGF- β	transzformáló növekedési faktor
TL	tibia hossz
TNF- α	tumor nekrozis faktor α
TTC	trifenil tetrazolium klorid
TUNEL	terminális dezoxinukleotid-transzferáz mediálta dUTP láncvég jelölés
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
vSMC	érfali simaizomsejt
VW	kamra tömeg
WKY	Wistar-Kyoto patkány
XO	xanthin oxidáz

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Szívelégtelenség

A szívelégtelenség a szív olyan funkcionális vagy struktúrális károsodása, melynek következtében a szív képtelen a szöveti igényeknek megfelelő mennyiségű oxigén szállítására, illetve csak emelkedett töltőnyomás árán képes a szervezet igényeit kielégíteni [1]. A szívelégtelenség prevalenciája világszerte emelkedő tendenciát mutat. Emelkedik a szívelégtelenség miatti hospitalizációk száma, a szívelégtelenséggel összefüggő halálozás, illetve jelentősen nőnek a gyógyításnak a költségei. A fejlett országokban a felnőtt lakosság mintegy 2%-a szenved szívelégtelenségben, de a 70 év felettiekben a prevalencia elérheti a 10%-ot is [2].

A szívelégtelenség hátterében az egyén szintjén a legjelentősebb predisponáló tényező az iszkémiás szívbetegség, különösen egy korábbi szívinfarktus esetén. Populációs szinten azonban a nem megfelelően kezelt magas vérnyomás a legfontosabb etiológiai faktor [3]. Emellett billentyűbetegségek, kardiomiopátiák következtében is gyakran kialakul szívelégtelenség [2]. Egyes toxikus ágensek (alkohol, illetve néhány citosztatikus gyógyszer) szintén képesek direkt miokardiális hatásuknak köszönhetően szívelégtelenséget előidézni. Az onkoterápiás kezelések egyre szélesebb körben való alkalmazásának következtében a toxikus eredet szerepe is jelentősebbé vált az utóbbi időben [4].

A szívelégtelenségnek klinikailag is széles a spektruma, kezdve az aszimptomatikus balkamra hipertrófiától egészen a manifeszt betegségig, a jobb szívfél elégtelenségtől a bal szívfél elégtelenségéig. A bal szívfél elégtelenség két fő típusát a szisztolés funkciót jellemző ejekciós frakció alapján határozzuk meg. A csökkent szisztolés balkamra funkciójú betegek esetében szisztolés szívelégtelenségről (új nevezéktan alapján HFrEF), a megtartott/normális szisztolés funkciójú betegek esetében diasztolés szívelégtelenségről (új nevezéktan alapján HFpEF) beszélünk. A két entitás közötti szürke zóna (EF: 40-49 %) elnevezése az ESC újabb javaslata alapján HFmrEF [2].

A szívelégtelenség kezelésében a béta-blokkolók és a neurohumoralis aktiváció gátlás (ACEi, ill. MRA) bevezetése és elterjedése az elmúlt két évtizedben jelentősen javította

a betegek életkilátását. Ennek ellenére a betegség prognózisa még mindig rossz, a szívelégtelenség halálozása magasabb, mint a leggyakoribb daganatos megbetegedéseké [5]. A diasztolés szívelégtelenség kezelésében pedig még nem rendelkezünk a betegség lefolyását egyértelműen kedvezően befolyásoló gyógyszeres kezeléssel [2].

2.2. A koszorúérbetegség, mint a szívelégtelenség rizikófaktor

A WHO adatai szerint az utóbbi évtizedekben a fejlett országokban a kardiovaszkuláris betegségek álltak a mortalitási statisztikák élén. 2001-ben a világon több mint 16 millió ember halt meg kardiovaszkuláris betegségben, mely az összhalálozás 29 %-át jelentette. Számítások szerint 2020-ra ez az arány 37 %-ra fog emelkedni, mely elsősorban a fejlődő országokban bekövetkező rohamosan növekvő morbiditásnak és mortalitásnak köszönhető. Ugyanakkor ezen mutatók a gazdaságilag fejlett országokban már javuló tendenciát mutatnak [6, 7].

A kardiovaszkuláris betegségeken belül az iszkémiás szívbetegség (ISZB) különböző megjelenési formái a leggyakoribb halálokok [6]. A iszkémiás szívbetegség/koronária betegség azon túlmenően, hogy egy önálló entitás, az egyén szintjén a szívelégtelenség legfontosabb rizikótényezője is. Posztinfarktusos betegekben ugyanis a szívelégtelenség előfordulásának esélye mintegy 6x magasabb, mint a többi beteg esetén [8]. Az akut koronária szindrómák egyre javuló gyógyszeres és invazív (PCI és CABG) ellátási lehetőségei következtében pedig jelentősen csökkent a kórkép akut mortalitása és így egyre többen érik meg a késői következmények, így a szívelégtelenség kialakulását [2].

Ezért alapvetően fontos a szekunder prevenció, azaz egy újabb koronária történés kivédése. A szekunder prevenciónak az utóbbi két évtizedben széles körben elterjedt gyógyszerei közé tartozik a tct aggregáció gátlás, a statin és ACE-gátló kezelés. A prevenció leghatékonyabb módja azonban a primer prevenció, amely az első vaszkuláris esemény megakadályozását célozza meg. Ennek farmakológiai alapjai alapvetően megegyeznek a szekunder prevencióéval, azonban az életmódi faktoroknak itt talán még fontosabb szerepük van, mint a posztinfarktusos betegekben. A farmakológias és non-farmakológias preventív erőfeszítéseknek köszönhetően a koronáriabetegség morbiditása

és mortalitása az európai országok túlnyomó részében nagymértékben csökkent az elmúlt 30 évben [9].

Számos epidemiológiai tanulmány szerint egy európai ország, Franciaország még a többi országénál is lényegesen alacsonyabb kardiovaszkuláris mortalitási adatokkal bír annak ellenére, hogy az életmódi tényezők, a rizikófaktorok gyakorisága, illetve a bevitt koleszterin mennyisége nem különbözik érdemben. Ezt az ellentmondást a sajtó „Francia paradoxon”-nak nevezte el és a jelenséget a mértékletes vörösborfogyasztással hozták összefüggésbe [10].

2.2.1. A rezveratrol hatása a kardiovaszkuláris rendszerre

A vörösbor kardioprotektív hatása a szőlő héjában és magjában található fitoalexineknek, ezen belül is elsősorban a rezveratrolnak (transz-3,4,5-trihidroxistilbén) tulajdonítható. Számos irodalmi adat igazolta a rezveratrol antioxidáns és szérum lipidszint csökkentő hatását [11]. Javítja az endotél funkciót és kedvező hatása van a vaszkuláris tónusra. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy elősegíti a nitrogén-monoxid (NO) és a prosztaciklin (PGI) felszabadulást, melyek az endotél funkció megtartásában jelentős szerepet játszó faktorok [12]. Humán érmintákkal végzett in vitro kísérletekben a rezveratrol felerősítette az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) promóterének aktivitását [13], valamint NO függő relaxációt eredményezett [12]. Védő szerepe trombózis ellen is igazolódott [14]. Befolyásolja számos proszttaglandin szintézisét, valamint gátolja a thromboxán A₂ (TXA₂) hatását, és ezen keresztül gátolja a trombociták aggregációját is [15].

Állatkísérletekben igazolták, hogy rezveratrol kezelés hatására csökkent az ateroszklerotikus plakkok mérete és denzitása, csökkent az intima-média vastagság [16], valamint javult az endotélium-függő vazodilatáció [17].

2.3. A hipertónia, mint a szívelégtelenség egyik legfontosabb pathogenetikai faktora

Magas vérnyomás betegségről a jelenlegi európai irányelvek szerint akkor beszélhetünk, ha a nyugalmi vérnyomás tartósan 140/90 Hgmm feletti. A hipertónia prevalenciája világszerte növekszik, a fejlett országokban a teljes populáció 30-40%-át érinti a betegség, mely jelentős mortalitási és morbiditási rizikóval társul [18].

Epidemiológiai adatok szerint a tartósan magas vérnyomás következtében kialakuló egyik legjelentősebb célszervkárosodásnak a hipertenzív szívbetegség (HHD) tartható. A HHD fokozza a szívelégtelenség, iszkémiás szívbetegség és a kamrai ritmuszavarok kialakulását. A Framingham vizsgálat igazolta, hogy 20 Hgmm-es szisztolés vérnyomásemelkedés több mint 50%-al növeli a szívelégtelenség rizikóját [19].

Az előbbi tények ismeretében nem meglepő, hogy populációs szinten a magas vérnyomás betegség a szívelégtelenség legfontosabb etiológiai faktora [3]. A diasztolés szívelégtelenség (HFpEF) esetében ez még hangsúlyosabban igaz [20], ráadásul az irányelvek alapján ezekben a betegekben a legfontosabb terápiás cél a magas vérnyomás célértékre való csökkentése, amely azonban a betegek jelentős részében nem lehetséges [2].

A tartósan fennálló magas vérnyomás változásokat hoz létre a balkamra struktúrájában, geometriájában, illetve funkciójában. Ezeket az elváltozásokat összefoglaló néven remodellingnek nevezzük. A szívizomzat tekintetében a remodelling következtében a balkamra falának megvastagodását látjuk [21, 22]. A balkamra hipertrófia kezdetben egy adaptív, kompenzatórikus mechanizmus, melynek hatására a nyomás- és (egyéb etiológiai tényezők esetén) a volumenterhelés által előidézett fokozott falfeszülés csökken és a szív teljesítménye megtartott marad (Laplace törvénye) [23]. Azonban egy határ felett ez az adaptívnak induló folyamat patológiássá válik az elégtelen vérrellátás miatt. Egyfelől a vaszkulátúra nem követi a miokardium vastagodását, másfelől a koronária rezisztencia erek szintén érintettek, az intramiokardiális artériák és arteriolák falának megvastagodása mellett perivaszkuláris fibrózis is jelen van, melyek mindegyike csökkenti a perfúzió hatékonyságát [24]. A patológiás remodelling már nem a szívizomsejtek hipertrófiájával, hanem sokkal inkább az intersticiális fibrózissal és a szívizomsejt halállal jellemezhető. Így végül a kompenzatórikusnak induló balkamrai

remodelling rontja a szív funkcióját és szívelégtelenséget okozhat. Ráadásul a balkamra funkció romlása tovább rontja a többi szerv vérellátását is. Ezen pathofiziológiai háttér ismeretében nem meglepő, hogy a balkamra hipertrófia kialakulása a legfontosabb predisponáló tényezője a manifeszt szívelégtelenség kialakulásának hipertóniás betegekben [25, 26].

A hipertenzív szívbetegség (HHD) spektruma klinikai megjelenés szempontjából igen széles, melybe az aszimptomatikus balkamra hipertrófia és a szívelégtelenség különféle fajtái is beletartoznak [27]. A HHD kialakulásának klasszikus lefolyása a balkamra ún. “kiégése”, mely során a hipertónia koncentrikus balkamra hipertrófiához vezet, melyet diasztolés (HFpEF), majd végül szisztolés (HFmrEF, HFrEF) balkamra elégtelenség követ. A hipertóniás betegek egy másik csoportjában a koszorúérbetegség, a szívinfarktus a balkamra hipertrófiától függetlenül, közvetlenül is vezethet a HFrEF kialakulásához [21].

2.4. A hipertónia kardio- és cerebrovaszkuláris következményei

A hipertónia a szívelégtelenség mellett a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségeknek is az egyik legjelentősebb rizikófaktora [18]. Az érrendszer a hipertenzió következtében folyamatosan a fiziológiásnál jelentősen nagyobb mechanikai erőknek van kitéve, melynek következtében sokféle struktúrális és funkcionális változás alakul ki. Ezen változások összefoglaló neve a vaszkuláris remodelling [28]. A remodelling legszembevetőbb jele az érfal megvastagodása, melyet a klinikumban a könnyű mérhetősége miatt az intima-media vastagsággal (IMT) jellemzünk. Ez az érték a carotisok esetében a normálisnak a 2-3x-ra is nőhet hipertenzív betegekben. Az IMT megvastagodása erős prediktora a jövőbeli kardiovaszkuláris eseményeknek [18]. Az érfal megvastagodása és kötőszövetes átépülése következtében az érfal elaszticitása is jelentősen csökken. A merev nagyerek miatt a centrális szisztolés vérnyomás emelkedik, a diasztolés vérnyomás pedig csökken, jelentősen nagyobb pulzusnyomást eredményezve, ami szintén jól jelzi előre a jövőbeli vaszkuláris történések (MI, stroke) előfordulását [18].

Az érrendszer struktúrális és funkcionális változásainak a lokális szöveti perfúziózavar, azaz az inadekvát oxigén és tápanyag ellátottság és az anyagcseretermékek felszaporodása a következménye. Ezáltal a krónikus magas vérnyomás kiváltotta érfa elváltozások a célszervek (szív, agy, vese) funkcionális és struktúrális károsodásához is vezethetnek [29].

A hipertenzió által mediált agyi elváltozások hátterében is a cerebrovaszkuláris eltérések az elsődlegesek. Ehhez járulnak a károsodott vér-agy gát (BBB) funkció, valamint a perfúziós zavar következtében kialakult oxidatív sejtkárosodás és gyulladásos folyamatok, melyek az idegsejtek számának csökkenéséhez vezetnek [30].

Az érfa vastagságának nagy részét kitevő media mellett az endotél is károsodhat a magas vérnyomás következtében, endotél diszfunkció alakulhat ki, mely egyben az ateroszklerózis kezdő lépése is [31]. Az ateroszklerózis, különösen az aterotrombotikus események pedig akut vaszkuláris katasztrófához vezethetnek, melyek mortalitása még ma is jelentős [32, 33].

A hipertónia tehát egy magas prevalenciájú betegség, mely jelentős morbiditási és mortalitási tényező világszerte. Ugyanakkor a klinikai gyakorlatban alkalmazott sokféle antihipertenzív gyógyszer ellenére a betegek jelentős részénél nem sikerül elérni a célvérnyomásértéket. Ennek hátterében lévő legjelentősebb tényezők a gyógyszer mellékhatások, intolerancia és a következményes csökkent gyógyszereszedési adherencia állnak. Az Egyesült Államokban a JNC 7 kritériumai szerint meghatározva mintegy 70 millió hipertóniás él. A legújabb ajánlások során bevezetett alacsonyabb vérnyomás normálérték (130/80 Hgmm) következtében pedig már több, mint 100 millió ember számít hipertóniásnak és közülük mintegy 54 millió betegnek a vérnyomása nem éri el a célvérnyomás értéket. Az ESC és az ESH irányelvei elismerik ugyan a vérnyomás és a kardiovaszkuláris rizikó közötti erős összefüggést, egyelőre mégis magasabb határértékeket határoznak meg, különösen idősek esetében (célvérnyomás: <150/90 Hgmm). Egyfelől azért, mert a betegek nagy részében nem érhető el ennél alacsonyabb érték, másfelől pedig a szigorúbb vérnyomáskontroll mellett megemelkedhet az esések és a törések száma [18, 34, 35]. Egy hemodinamikai hatásokkal nem rendelkező, azonban a hipertenzió kardiovaszkuláris szövődményeit kivédő gyógyszernek ezért klinikailag igen nagy jelentősége lenne, hiszen azon betegekben, akikben a célvérnyomásértékek nem

érhetők el antihipertenzív kezeléssel, az érrendszeri rizikó, illetve a szervkárosodások esélye csökkenthető lenne.

2.5. Az oxidatív stressz jelentősége a kardiovaszkuláris rendszerben

Az oxidatív stressz a szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns rendszerek közötti egyensúly megbomlása, melynek során a sejtek redox állapota az oxidáció irányába tolódik el. A szabadgyökök külső elektronhéjukon páratlan elektront tartalmazó molekulák, melyek ennek következtében igen reaktívak. A páros elektronállapot elérése érdekében a szabad gyökös molekulák a szervezetben a biomolekuláktól elektront vonnak el, oxidálják őket, ezzel károsítva a sejteket és a különböző sejtalkotóelemeket [36, 37].

Oxigén szabadgyökök (ROS) fiziológias körülmények között is termelődnek az aerob metabolizmus során [36] a mitokondriumban. A ROS termelődés egyéb forrásai a NADPH oxidázok (NOXs), a nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), a lipo- és ciklooxygenázok, a xantin oxidáz, a citokróm P450 enzimrendszer és a monoaminoxidázok (MAO) [38].

Az endogén szabadgyökök mellett megkülönböztetünk exogén szabadgyököket is, melyek külső noxa/behatás következtében alakulnak ki. Ismert, hogy az elektromágneses sugárzás (ultraibolya sugárzástól a gamma sugárzásig), a dohányzás, xenobiotikumok/toxinok (pesticidek, herbicidek), illetve egyes – elsősorban antineopláziás – gyógyszerek (bleomycin és antraciklin származékok) fokozott szabadgyök képződést indukálnak [39].

A szabadgyökös sejtkárosodással szembeni védelmet egy komplex antioxidáns védekező rendszer biztosítja. Az antioxidánsok saját elektronjaikat adják át a szabadgyök molekuláknak, így jelentősen mérséklék az eredeti szubsztrát (pl. fehérjék) oxidációját [36].

Mivel a szabad gyökös károsodások az összes szervet érinthetik, nem meglepő, hogy fontos patogenetikai tényezőként szerepelnek a legtöbb betegség kialakulásában. Az oxidatív stressz szerepét számos kórfolyamatban igazolták már, a kardiovaszkuláris

betegségekben a rizikófaktoroktól (hipertónia, diabetes) kezdve a tünetmentes ateroszklerózison át egészen az akut kardiológiai kórképekig. Emellett számos neurológiai betegség (Alzheimer-kór, stroke, vaszkuláris demencia), illetve az öregedés folyamatában is jelentős szereppel bírnak. Szívelégtelenségben azonban csak nemrégiben vált egyértelművé az oxidatív stressz centrális kóroki szerepe [40-44].

Az elmúlt évtizedekben kísérletes és klinikai vizsgálatok sora igazolta a ROS kiemelkedő szerepét a szívelégtelenség kialakulásában. Az oxigén szabad gyökök direkt módon károsítják a kontraktilitást, továbbá a hipertrófiában szerepet játszó jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitására is jelentős hatással bírnak, fokozzák az apoptózist. Emellett a növelik a fibroblasztok proliferációját és aktiválják a mátrix metalloproteinázokat. Mindezen mechanizmusok maladaptív hipertrófiához és szívelégtelenséghez vezetnek [45].

Számos vizsgálatban igazolták a ROS fokozott képződését a károsodott szívizomban [46-47]. Ennek kimutatására alkalmazott elektron spin rezonanciás (ESR) spektroszkópiás vizsgálatok direkt bizonyítékot nyújtottak az elégtelenül működő szívben a fokozott mennyiségű oxigén szabad gyök jelenlétére [48]. Ugyanakkor az antioxidáns enzimek mennyisége érdemben nem változik szívelégtelenségben, sőt a GPx aktivitása még fokozódik is, ezért egyértelműen a megnövekedett szabad gyök produkció felelős az oxidatív stressz kialakulásáért, nem pedig a csökkent antioxidáns védelem [49].

2.5.1. Az oxidatív stressz szívizomzatra gyakorolt hatásai

A szabadgyökök a szívizom szinte minden sejtjében képződhetnek. Termelődnének a kardiomiocitákban, az endoteliális sejtekben és fehérvérsejtekben egyaránt. A szívizomsejtekben a mitokondriumok tekinthetők a legfontosabb szabadgyök forrásnak, de szerepe van a NAD(P)H oxidáznak (NOX izoformák), a xantin oxidáznak, valamint a szétkapcsolt nitrogén oxid szintázoknak (NOS) is [50].

Fiziológiás körülmények az ETC-n szállított elektronok 98%-ából ATP termelődik a mitokondriumokban a mitokondriális légzési lánc enzimeit által és csupán 1-2%-a fordítódik ROS képződésére. Ezt a mennyiségű oxidánst azonban könnyedén semlegesítik az endogén scavenger mechanizmusok (pl. SOD). Ha azonban a

mitokondrium légzési aktivitását blokkolják a Komplex I és Komplex III szintjén, akkor jelentősen megemelkedik a mitokondriumban keletkezett szuperoxid anionok mennyisége [50]. A fenti jelenség szívelégtelenségben is észlelhető, mert ekkor jelentősen csökken a légzési lánc komplexeinek az aktivitása is [51]. A mitokondriumok funkciójának károsodása (megfelelő mennyiségű NADPH jelenlétében) tehát felelős lehet az oxigén szabad gyök produkció megemelkedéséért szívelégtelenségben [51].

A NADPH oxidázok azáltal termelnek szuperoxid aniont (O_2^-), hogy egy elektron transzfert hajtanak végre a felszínükön lévő Nox segítségével a NADPH-ról a molekuláris oxigénre. A NOX-ok 5 izoformája közül a szívben a 2-es és a 4-es játszik jelentős szerepet. A NADPH oxidázt számos olyan faktor aktiválja, mely a szívelégtelenség patogenezisében is esszenciális szerepet játszik. Ilyen például a mechanikai feszülés, angiotenzin II, endotelin-I és a TNF- α . A NOX4 egy mitokondriumban található izoforma, mely esetén igazolták, hogy a bal kamrai nyomásterhelés és az öregedés hatására jelentősen fokozódik az aktivációja [52-55].

A xantin oxidáz szintén ROS forrásnak tekinthető szívelégtelenségben. Állatkísérletekben kimutatták, hogy a xantin oxidáz gátló allopurinol kedvező hatást fejt ki szívelégtelenségben, mivel fokozza a kontraktilitást, illetve mérsékli a szívizom posztinfarktusos remodellingjét [56].

A szétkapcsolt NOS szabadgyök képző potenciálja is jól ismert, melyben elsősorban a NOS3-nak (eNOS - endoteliális NOS) van komoly szerepe. Fiziológiásan az eNOS NADPH felhasználásával L-argininből és O_2 -ből NO-t és L-citrulint képez. Azonban oxidatív stressz hatására, amennyiben a NOS-kofaktor tetrahydrobiopterin (BH4) mennyisége is csökken, akkor a NOS szétkapcsol, ilyenkor struktúrálisan instabillá válik, NO helyett ROS-t kezd el termelni [45, 57].

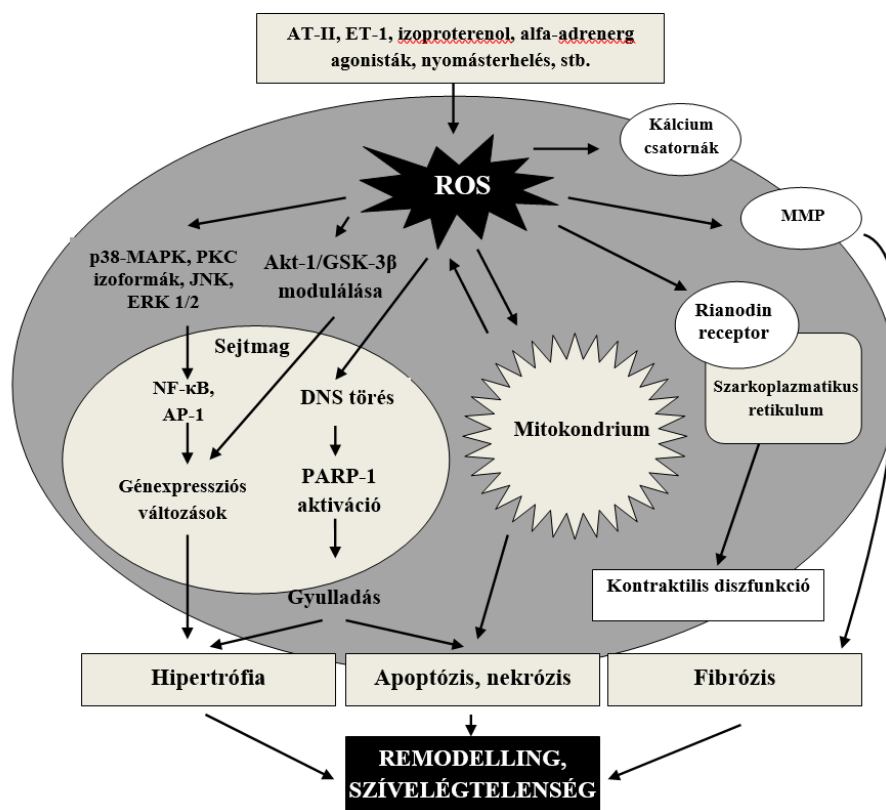
Az endotél sejtekben a reaktív oxigén szabad gyökök forrása elsősorban a NADPH oxidáz és a xantin oxidázok. A szívizomzatban lévő fehérvérsejtek is szerepet játszhatnak a ROS képzésben. Ez az megállapítás azokon az eredményeken alapul, hogy a leukocitákban termelt mieloperoxidáz (MPO) plazma koncentrációja egyenesen arányos a szívelégtelenség súlyosságával, emellett jól jelzi a beteg prognózisát is [58].

Az oxidatív stressz legfontosabb forrása a mitokondrium, mely azonban egyúttal célpontja is a szabad gyökös károsításnak. Mitokondriális szinten a károsodás elsősorban a membránt, a légzési lánc elemeit, a mitokondriális DNS-t (mtDNS), illetve a

transzkripciós faktorokat érinti. A mitokondriumok saját örökítő anyaga, mely a légzési lánc komplexeinek genetikai állományát kódolja [59] különösen sérülékeny, mivel nem rendelkezik komplex kromatin struktúrával, mely hatásos barriert képezne a ROS-al szemben. Emellett az mtDNS-nek a repair aktivitása is alacsony [60]. A DNS sérülés következtében károsodik a mitokondriális fehérje expresszió, így a légzési lánc komplexeinek mennyisége is csökkenni fog, amely a mitokondrium funkcióvesztését, energiadepléciót idéz elő. Szívelégtelenségben is igazolták a mitokondrium károsodását és diszfunkcióját, melyet csökkent mtDNS mennyiség, a lipidek peroxidációja, a transzkriptumok mennyiségének csökkenése és sérült oxidatív kapacitás is jellemzett [61]. A károsodott mitokondriumok aztán következményesen tovább fokozzák a ROS termelődést, melynek extramitokondriális következményei is vannak.

A ROS továbbá számos intracelluláris molekula modulálása, valamint jelátviteli utak módosítása révén fejt ki struktúráisan és funkcionálisan sejtkárosító hatását [62]. Az oxigén szabad gyökök direkt módon fokozzák a hipertrófiáért felelős jelátviteli utak és transzkripciós faktorok aktivitását. A sejtfelszíni GPCR (G-protein-kapcsolt receptor) agonisták, mint például AT-II, az ET-1, az izoproterenol, alfa-adrenerg agonisták ROS mediáltan a szívmuscle remodellingjét, hipertrófiáját idézik elő adaptációs, ún. stressz válaszként számos jelátviteli úton keresztül (pl. MAPKs, PKC több izoenzimje). A fenti jelátviteli utak az NF- κ B aktiválása révén a génexpressziót is befolyásolni képesek [63, 64]. Az angiotenzin II stimulus, továbbá a kalcium-kalmodulin kináz II (CaMKII) ROS függő aktiválásán keresztül szintén a szívmuscle károsodásához vezet [65]. További fontos szabadgyök hatás a hiszton deacetiláz III, a SIRT1-3 deacetiláz gátlása, amelynek alapvető szerepe van az NF- κ B/Bcl-2/Bax jelátvitel út gátlásában [66, 67].

Az oxidatív stressz emellett a nukleáris DNS károsodását okozva aktiválja a poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) enzimet is, mely jelentős aktiváció esetén a magas energiájú foszfátok mennyiségének csökkentésével programozott, vagy nekrotikus sejthalált okoz. A PARP-1 aktiváció további szerteágazó hatásai külön fejezetben kerülnek részletezésre (1. ábra).



1. ábra. Az oxidatív stressz celluláris hatásai szívelégtelenségben.

A szabad gyököknek direkt hatásuk is van a kontraktilis funkcióra azáltal, hogy módosítják a kontrakcióban szerepet játszó fehérjéket, ezáltal csökkentve azok funkcióját [68]. A ROS a kontraktilitást főként a szarkoplazmás retikulumban bekövetkezett változások révén befolyásolja. A NOX2 a rianodin receptorokhoz (RyR2) közel helyezkedik, melyek szerepe a kalcium felszabadulás szabályozásában van. Stressz hatására fokozódik a kalcium felszabadulás a szarkoplazmás retikulumból, ezáltal kezdetben fokozódik a kontraktilitás, azonban hosszú távon a folyamat a kalcium raktárak kiürüléséhez, ezáltal a kontraktilitás romlásához, valamint a citoplazmatikus kalcium

szint megemelkedésével fokozott aritmia hajlamhoz vezet [69, 70]. A szabad gyökök aktiválják továbbá a mátrix metalloproteinázokat (MMP), melyek fontos szerepet töltenek be a remodelling folyamatában, illetve végső soron a balkamrai dilatáció és a szisztolés funkciózavar kialakulásában is [71, 72].

2.5.2. Az oxidatív stressz érrendszeri hatásai

Az erek falában termelődő ROS forrása döntően ugyanazon enzimekhez kötött, mint a szívizomzat esetében. A legfontosabb forrásnak azonban a különböző NOX izoenzimek (nagyerek esetében NOX1 és NOX4), illetve a szétkapcsolt NO szintáz tekinthető [73, 74]. Hipertenzióban az emelkedett endotelin szint által kiváltott ROS termelésben emellett szerepet játszik a mitokondriális légzési láncból történő elektronszivárgás is [75]. A xantin oxidáz hipertenzió során szintén emelkedett aktivitást mutat mind a kis, mind a nagyerekben. XO inhibitorok alkalmazásával csökkenthető volt a ROS mennyisége és mérséklődött a következményes endotél diszfunkció is [76].

Humán vizsgálati eredmények szintén megerősítik az oxidatív sejtkárosodás meglétét magas vérnyomás esetén [77]. Rezisztenciaerek falából izolált humán érfali simaizomsejtekben fokozott ROS termelés észlelhető [78], emellett az antioxidáns védelem gyengülése is igazolható. Hipertenzív betegekben csökkent a glutation mennyisége és a SOD aktivitása is [79].

Nem minden hipertóniás betegben igazolható ugyanakkor az oxidatív stressz megléte. Egy humán vizsgálat alapján például enyhe-közepes vérnyomásemelkedés esetén az oxidatív sejtkárosodást jelző paraméterek (pl. TBARS) még nem mutattak emelkedést [80]. Azonban a hipertónia legtöbb kísérletes modellje, így az SHR esetében is egyértelmű a fokozott ROS termelés, valamint emelkedett NOX aktivitás szerepe a kórkép kialakulásában [81]. A szabad gyökök semlegesítése scavenger molekulák alkalmazásával azonban alapvetően nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket a hipertónia kezelésében [82-84].

A ROS alapvetően befolyásolja a vaszkuláris funkciót az endotél károsításán keresztül. Az endoteliális eNOS NO-t, egy potens vazodilatátor anyagot termel, mely részt vesz a vérnyomás szabályozásában. Hipertóniában, az oxidatív stressz során termelődő $O_2^{\cdot-}$

reakcióba lép az NO-val és igen reakcióképes peroxinitritet (ONOO^-) képez. Ezáltal csökken az NO hozzáférhetősége, mely az értónus növekedéséhez vezet. Emellett a peroxinitrit károsítja a lipoproteineket nitro tirozin adduktok képzésével, ami tovább rontja az erek struktúráját és funkcióját [73].

Ezen felül a hipertenzió kiváltotta ROS termelődés fokozódásának köszönhetően a MMP-ok aktivitása is emelkedik. Ennek következtében a vaszkuláris simaizomsejtek és fibroblasztok proliferációja fokozódik. Ennek eredményeképp az extracelluláris mátrix fehérjék termelődése is nő. Mindezen folyamatok tovább rontják az erek funkcióját és relaxációs képességét [85-86].

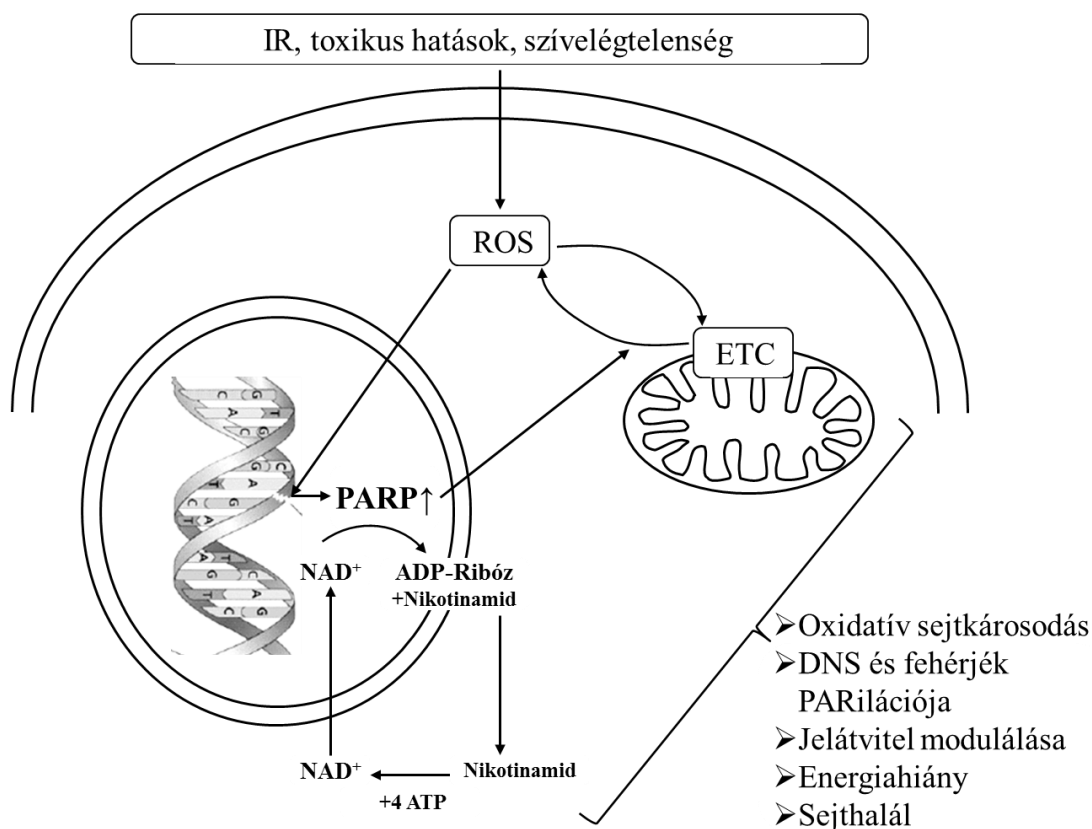
2.6. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim jelentősége az oxidatív sejt károsodás kialakulásában

A poli(ADP-ribóz) polimeráz aktivitással rendelkező enzimek a különféle noxák (pl. oxidatív sejt károsodás) által kiváltott egyes láncú DNS törések hatására aktiválódnak. Az aktiváció hatására a NAD^+ hasításával ADP-ribóz alegységeket képeznek, melyeket aztán polimer formájában a sérült DNS szakaszhoz kapcsolnak, ezzel segítve a DNS repair folyamatát [87]. A DNS-hez kapcsolt PAR lánc szignálként szolgál ugyanis egyes repair enzimek (DNS ligáz III és DNS polimeráz β), illetve scaffold fehérjék számára. A repairt követően a PAR lánc lebontását a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP-ribozil hidroláz végzi [88].

A PARP enzimcsaládnak 17 tagja ismert jelenleg. Ezek közül a PARP-1 a legrégebb óta ismert és a legkiterjedtebben vizsgált enzim. A PARP-1 jelentős mennyiségben található meg a sejtmagban és a sejtek PAR-ilációs képességének mintegy 85-90 %-áért felelős [89]. Nagy mennyiségének köszönhetően a PARP-1 oxidatív stressz hatására bekövetkező aktivációja programozott, vagy nekrotikus sejthalált okoz azáltal, hogy jelentős mennyiségű NAD^+ -ot használ fel működéses során [87]. A NAD^+ azonban központi szerepet játszik az anyagcsere folyamatokban, azon belül is az energiatermelés folyamatában. Ezért hiányában jelentősen károsodik az ATP termelődés. Ráadásul a NAD^+ pótlása is rendkívül energiaigényes folyamat, hiszen 1 Mól NAD^+ pótlása

nikotinamidból 4 Mól ATP-t igényel. A két folyamat eredményeként a PARP aktiváció a magas energiájú foszfátok szintjét jelentősen csökkenti [90].

A PARP-1 aktiváció során azonban nem csak a DNS, hanem nagyon sok fehérje is PAR-ilálódik, így PAR-ilálódnak a hiszton fehérjék, a transzkripcióban szerepet játszó faktorok és komplexek, illetve maga a PARP-1 enzim is [91]. Ez a poszttranszlációs módosulás jelentős struktúrális és funkcionális változásokat idéz elő az akceptor molekulákban, mivel a PAR polimer negatív töltéssel rendelkezik. Emellett megváltozhat ezen fehérjék sejtbeli lokalizációja is [92]. A PAR emellett leválhat ezen fehérjékről és szignál transzdukciós szerepet is játszhat más fehérjékhez kapcsolódva, melyek PAR felismerő/kötő doménnel rendelkeznek [93].



2. ábra. A PARP enzim aktiválódásának hatásai a sejtet érő stressz szituációk során.

A PARP-1 aktiváció emellett direkt mitokondriális hatással is bír, jelentősen rontja a légzési lánc tagjainak aktivitását, növelve ezzel a mitokondriális szabad gyök produkciót [94]. Az alacsony NAD⁺ szinten keresztül pedig gátolja a sirtuinok aktivitását is, mely

szintén az energia metabolizmus károsodásához vezet [95]. A PAR polimerek a mitokondriumba jutva az eddigi mechanizmusoktól eltérő módon is képesek apoptózist indukálni, mivel fokozzák a mitokondriális NADPH oxidáz és apoptózis indukáló faktor (AIF) kiszabadulását és nukleáris transzportját [96]. A PARP aktiváció az NF- κ B aktiválásával fokozza a gyulladásos faktorok termelődését, valamint a hipertrofia és a fibrózis kialakulásában szerepet játszó jelátviteli faktorok aktivitását (PKC α/β , PKC λ/ζ , MAPKs). Továbbá a szabadgyökök csökkenthetik a prosurvival jelátviteli faktorok aktivitását is [97, 98]. A ROS hatására aktiválódó redox szignalizációs útvonalak a sejtek diszfunkciója mellett végső soron fontos szerepet töltenek be a programozott sejthalál, az apoptózis kialakulásában is (2. ábra).

Hagyományosan a PARP-1 aktivációjának hatását akut stressz szituációkban vizsgálták (IR, irradiáció, szepszis). Újabban azonban a krónikus betegségek pathogenezisének a hátterében is egyre gyakrabban igazolódik az oxidatív stressz és a következményes PARP aktiváció (diabetes mellitus, hipertónia, szívelégtelenség) kóroki szerepe.

2.7. A jelátviteli faktorok szerepe az oxidatív sejtkárosodás folyamatában és a kardiovaszkuláris remodellingben

Hipoxia-reoxigenizáció, illetve egyéb oxidatív behatások a sejtek túlélését alapvetően befolyásolják az egyes jelátviteli útvonalak modulálásán keresztül. Oxidatív stressz hatására megváltozik a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) – Akt-1 – GSK-3 β útvonal és a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) aktivitása. Az Akt-1 és az ERK aktivitásának fokozódása a túlélést javítja (ún. prosurvival faktorok). A JNK és a p38-MAPK aktivációja azonban ezzel ellentétes hatású, és a sejthalál, elsősorban az apoptózis irányába tereli a sejteket [99, 100].

A szív remodellingje során - amely a károsító stresszfaktor krónikus fennállása esetén végül manifeszt szívelégtelenséghez vezet - szintén jelentős szerepet játszanak a jelátviteli faktorok. A remodelling kezdeti szakaszában a még fiziológiás adaptív folyamatok mediálása során a PI3K/Akt-1 upstream faktorok foszforilálása által gátlódik a glikogén szintáz kináz-3 β (GSK-3 β), illetve aktiválódik az ERK1/2. Ebben a

stádiumban elsősorban a kardiomiocita hipertrófia a domináns változás [101, 102]. A későbbi, már a szívelégtelenség irányába mutató ún. patológiás remodelling során inkább egyes protein kináz C (PKC) izoenzimek (elsősorban α/β és ζ/λ), az ERK (Thr188), a calcineurin/CaMKII, valamint a G-protein-kötött receptorok és a G α_q aktivitásának fokozódása jellemző [101, 103-105]. Ekkor már a szívizomsejt hipertrófia helyett a fokozatos sejtvesztés és a reaktív intersticiális kollagén felszaporodás a jellemző eltérés. Ebben a folyamatban a Thr188 pozícióban aktivált ERK1/2 mellett a MAP kináz család másik két tagja, a c-jun N-terminal kináz (JNKs) és a p38 MAPK is jelentős szereppel bír [105].

A balkamra hipertrófiából szívelégtelenségbe történő átmenetet jelentősen befolyásoló tényező a balkamrai kapilláris érhalózati denzitása. Amennyiben az érújdonképződés intenzitása nem megfelelő, nem követi a balkamrai izomtömeg növekedését, a szívelégtelenségbe történő átmenet esélye jelentősen fokozódik. Sok, a normális szívnövekedésben és a fizikai aktivitás által kiváltott hipertrófiában szerepet játszó faktor aktiválja a PI3K/Akt-1 útvonalat. Az Akt-1 azonban nemcsak a már említett GSK-3 β -t foszforilálja, hanem az mTOR-t is aktiválja és ezen keresztül fokozza az érújdonképződést, gátolva ezáltal az adaptív hipertrófia szívelégtelenségbe történő progresszióját [106].

A PARP enzimek aktivációja által okozott PAR képződés befolyásolja a fehérjék konformációját és ezáltal a funkcióját is. Fontos targetet jelentenek a jelátviteli faktorok is, melyek szintén PAR-ilálódhatnak [92]. Emellett a transzkripciós faktorok aktiválódásán keresztül potenciálisan a mennyiségük is megváltozhat. A kardiovaszkuláris patológiák mediálásában fontosnak tartott faktorok közül többnek (Akt-1, MAPK) is képes a funkcióját befolyásolni a PARP enzim aktivációja, melynek blokkolása ezáltal előnyös lehet [107].

2.8. A mitokondrium szerepe a remodelling és a szívelégtelenség kialakulásában

A mitokondrium a sejt központi energiatermelő organelle, mely a miokardiumban hatalmas mennyiségben található meg, a szívizomsejtek mintegy 25%-át foglalják el. A

szervezetben termelődő ATP mintegy 95%-a itt képződik [108]. Akut és krónikus stressz szituációk között, így szívelégtelenségben is csökken a magas energiájú foszfátok (ATP, CrP) és a NAD^+ koncentrációja. Ennek háttérében a mitokondriális elektron transzport lánc oxidatív stressz általi károsodása áll [109, 110]. Ismert, hogy a légzési lánc funkciójának gátlása/károsodása a Komplex I szintjén jelentősen csökkenti az ATP szintézist a transzmembrán protongrádiens összeomlása következtében [109]. Az energiahány következtében másodlagosan csökken a metabolizmus egyik legalapvetőbb kofaktorának, a NAD^+ -nak a koncentrációja is. A jól ismert redox szerep mellett a Komplex I a ROS termelés egyik kiemelt helyszíne is, elsősorban a fiziológias működés károsodásakor. Ilyenkor az elektronszivárgás következtében az oxigén redukálódik és szuperoxid anion keletkezik, tovább fokozva az oxidatív stresszt [111].

Az utóbbi évtizedekben kiterjedt kutatások folytak a mitokondriumok egyéb biológiai szerepének körvonalazására is. A mitokondriumok energetikai funkciójuk mellett központi szerepet töltenek be a sejtek sorsának szabályozásában is azáltal, hogy noxák hatására apoptózist, nekrozist, illetve nekroptózist képesek indukálni [112].

A miokardiumban a sejtek döntő többségét képező szívizomsejtek osztódásra, regenerációra alapvetően képtelen posztmitotikus sejtek. A szívben ugyan – elsősorban a pericardium közelében – léteznek c-kit pozitív endogén kardiális őssejtek (eCSCs), azonban ezek regeneratív képessége a kardiovaszkuláris rendszert érő akut és krónikus noxák által okozott jelentős sejtvesztést nem képesek ellensúlyozni, mivel igen alacsony megújulási rátát képesek csak biztosítani [113]. A szívizomzatot érintő patológias folyamatok, így a szívelégtelenség esetében ezért igen fontos a szívizomsejtek megőrzése, illetve a sejthalál mechanizmusainak blokkolása.

A mitokondriumok külső membránjának permeabilizációja (MOMP) az apoptózis intrinsic útjának aktivációját okozza. A permeabilizáció hatására az innen kijutó fehérjék (citokróóm c, SMAC/DIABLO, HtrA2, Endonukleáz G, AIF) apoptózist indukálnak [114]. Azonban remodelling során és szívelégtelenségben nem csak apoptotikus, hanem nekrotikus (illetve átmeneti nekroptotikus) sejthalál is észlelhető [115]. Nekrozisban egy mitokondriális belső membránban elhelyezkedő nem szelektív pórus, az ún. „mitochondrial permeability transition pore” (mPTP) megnyílásának van jelentős kóroki szerepe. Az mPTP megnyílásának triggere többek között a kalcium túltöltés, az oxidatív stressz, illetve alapvetően az energiahányos állapotok ($\text{ATP} \downarrow$, $\text{Pi} \uparrow$). mPTP nyílás hatására

összeomlik a mitokondriális transzmembrán grádiens és megszűnik az ATP termelés, valamint degradáló enzimek (proteázok, lipázok) szabadulnak ki a mitokondriumból, melyek a kaszpázoktól független sejthalált okoznak [116].

Korábban a mitokondriumokat statikus sejtorganellumként tekintették. Újabban igazolódott, hogy annak érdekében, hogy adekvát módon lássák alapvető energetikai funkciójukat, számos folyamat befolyásolja számukat, méretüket és elhelyezkedésüket. Ezen folyamatokat összefoglaló néven mitokondriális dinamikának nevezzük [117].

A minőségkontrollban, illetve a sejt energetikai igényeihez való alkalmazkodásban a mitokondriális fúzió és hasadás (fisszió) fontos szerepet tölt be. A mitokondriális fúzióhoz szükséges lépések megindítására a mitofuzinok homo- és heterodimerjei (Mfn1-Mfn1, Mfn2-Mfn2, Mfn1-Mfn2) képesek. A külső membrán összeolvadását követően a belső membrán fúziójához az OPA1 fehérje jelenlétére is szükség van, mely a mitokondriális kriszták integritását is megóvjá [117, 118].

A hasadási folyamatok legfontosabb mediátorai a dinamin-related protein-1 (DRP1), mely egy nagy GTP-áz hatású fehérje. A fisszió elindításához a DRP1 az OMM-hez kapcsolódik, majd a DRP1 molekulák polimerizációt követően gyűrűszerű struktúrát hoznak létre a mitokondrium körül. Ez a gyűrűstruktúra GTP-t hasítva kontrahál, így okozza a mitokondrium kettéhasadását.

Korábban kételyek merültek fel, hogy a kontraktilis apparátust energiával ellátó interfibrilláris mitokondriumok (IFM) vajon képesek-e résztvenni ilyen folyamatokban, azonban ma már igazolódott, hogy ezen mitokondriális szubpopulációban is igazolható a fúzió és fisszió közötti normális egyensúlyi állapot felborulás. Sőt ennek a különböző kardiomiopátiák progressziójában betöltött szerepe is igazolódott [117, 119, 120].

A mitokondriumok tehát szerteágazó szerepet töltenek be a szívizomzat fiziológiás és patológiás folyamataiban. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a farmakológiai PARP-1 enzim gátlás megőrizte ennek a sejtorganellumnak a funkcióját iszkémia-reperfúzió, illetve exogén oxidatív stressz kiváltotta szívkárosodásban. Ugyan a PARP egy nukleáris enzim, a mitokondriumra gyakorolt befolyása nem csak másodlagos, hiszen izolált mitokondriumokon is igazolható volt [94].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink fő célja az volt, hogy a PARP enzim farmakológiai gátlásának hatásait vizsgáljuk különféle krónikus szív-érrendszeri patológiás folyamatokban. Célunk volt továbbá a háttérben álló molekuláris/celluláris folyamatok azonosítása. Vizsgálatainkhoz a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében kifejlesztésre került PARP-gátlót, az L-2286-ot használtuk [121, 122].

Emellett a rezveratrol kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatását vizsgáltuk állatkísérletes modellben és humán klinikai vizsgálatban.

Részletezett célkitűzések:

1. Az L-2286 hatásának in vitro és ex vivo karakterizálása.
2. Különböző etiológiai faktorok által kiváltott krónikus szívelégtelenség modellekben a PARP-gátló L-2286 hatásainak vizsgálata.
 - a. Posztinfarktusos szívelégtelenség
 - b. Tartósan emelkedett utóterhelés (hipertónia) által kiváltott szívelégtelenség
 - c. Toxikus (antraciklin-indukálta) szívelégtelenség
3. A hipertónia által kiváltott kardiovaszkuláris remodelling befolyásolása PARP-gátló kezeléssel.
 - a. Nagyerekre (aorta/carotis) gyakorolt hatás
 - b. Miokardiális hatás
 - c. Központi idegrendszerre gyakorolt hatás
4. A vizsgálati szerrel (L-2286) kiváltott kardioprotekció mértékének összehasonlítása már igazolt hatású komparátor molekulákkal (pl. ACE-gátló, antioxidáns).
5. Vizsgálni kívántuk a kardioprotekció háttérében álló molekuláris/celluláris folyamatokat és változásokat:
 - a. A PARP-gátló és az oxidatív stressz mértékének meghatározása.
 - b. Kötőszövetes átépülés fokának jellemzése.
 - c. A remodellingben és a sejttúlélésben szerepet játszó intracelluláris jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitásának nyomon követése.
 - d. Hő sokk fehérjék mennyiségi változásai

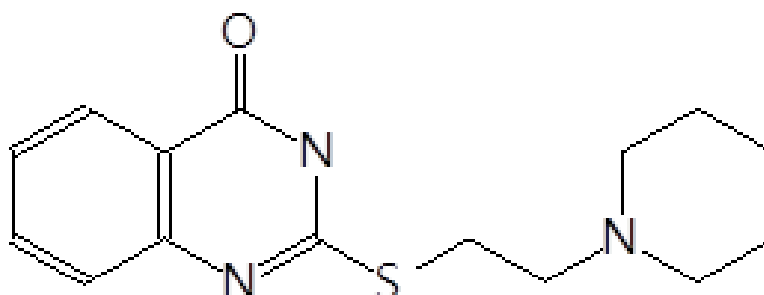
- e. A sejt energetikai jellemzőit, valamint a mitokondrium funkcionális és struktúrális változásainak azonosítása.
6. Vizsgálni kívántuk továbbá a rezveratrol hatását posztinfarktusos szívelégtelenségben:
- a. a szív struktúrális átépülésének és a következményes funkcionális változásoknak a jellemzésével,
 - b. az intersticiális fibrózis és az oxidatív stressz mértékének meghatározásával,
 - c. egyes jelátviteli faktorok és gyulladásos markerek szintjének a megméréseével.
7. Emellett humán klinikai vizsgálatban kerestük a választ arra a kérdésre, hogy vajon a rezveratrol az EBM terápia mellett alkalmazva rendelkezik-e addicionális pozitív hatással posztinfarktusos stabil koronária betegekben a rutin labor és hemoreológiai paraméterekre, az endotél funkcióra, valamint a szisztolés és diasztolés balkamra funkcióra.

4. MÓDSZEREK

4.1. Ex vivo és in vivo miokardiális infarktus modellek

4.1.1. Langendorff szívperfúziós vizsgálatok (iszkémia-reperfúzió)

Langendorff szívperfúziós kísérleteinkhez 300-350 g súlyú hím Wistar patkányok szívét használtuk. Vizsgálatainkat az aktuális állatetikai előírásoknak megfelelően végeztük. Az állatokat leölésük előtt ketamin (200 mg/kg, ip) adásával altattuk és nátrium heparinnal (100 IU/állat i.p.) antikoaguláltuk. A szíveket Langendorff módszere szerint perfundáltuk 70 Hgmm-es konstans nyomáson, 37°C-on. A perfúziós oldat módosított foszfátmentes Krebs-Henseleit puffer volt, mely az alábbiakat tartalmazta: 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glükóz és 0.6 mM oktánsav. A perfúziós oldat a kezelt állatok esetében L-2286 kódjelű PARP-gátlót is tartalmazott (10, illetve 20 µM koncentrációban) (3. ábra). A perfuzátumot oxigenáltuk 95% O₂, 5% CO₂ tartamú gázelegy átbuborékoltatásával, majd az oldat pH-ját 7.4-re állítottuk be. Egy 10 perc hosszúságú kimosási (recirkuláció nélküli) periódust követően a szíveket vagy normoxiás körülmények között perfundáltuk, vagy 30 perces globális iszkémiának vetettük alá az aortán keresztüli folyadékáramlás megszüntetésével. Az iszkémiát 15 perc hosszúságú reperfúzió követte. A kísérlet végén a szíveket gyorsfagyasztottuk [94].



3. ábra. Az L-2286 kémiai szerkezete: 2-[(2-Piperidin-1-ylethyl)thio]quinazolin-4(3H)-one.

4.1.2. In vivo miokardiális infarktus modell

Kontroll állatok 1 ml/kg fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan. Miokardiális infarktust 80 mg/kg dózisú izoproterenol hidroklorid adásával idéztünk elő (ISO) (Sigma-Aldrich). Az ISO oldatot steril desztillált víz felhasználásával közvetlenül az injekció beadása előtt készítettük el. Az ISO-kezelt állatokat két csoportba osztottuk: az ISO csoport csupán sóoldatot kapott, az ISO+L-2286 csoport pedig 10 perccel az ISO alkalmazása előtt (10 mg/kg), illetve 5 alkalommal óránként 3 mg/kg L-2286-ot is kapott. EKG-t a vizsgálat előtt, majd az ISO adását követően óránként készítettünk az 5. óráig egy 3 csatornás Schiller EKG készülék segítségével (Schiller AG Baar, Svájc).

4.2. Krónikus kísérletes szívelégtelenség modellek

4.2.1. Posztinfarktusos szívelégtelenség modell

350 g súlyú Sprague-Dawley (CFY törzs) hím patkányokat (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) használtunk kísérleteink során. Két alkalommal sc. adott 120 mg/kg/nap dózisú izoproterenol (ISO, Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) injekcióval miokardiális infarktust (MI) váltottunk ki [123]. A kontroll állatoknak sc. fiziológiás sóoldatot (1 ml/kg) adtunk. Az ISO oldatot steril desztillált víz felhasználásával közvetlenül az injekció beadása előtt készítettük el. A túlélő állatokat véletlenszerűen három csoportra osztottuk és 12 hetes kezelésben részesültek. A kezelést az utolsó ISO injekció beadása után több, mint 24 órával indítottuk, hogy az esetleges infarktusméret csökkentő hatást elkerüljük. Csoportok: 1. ISO+L (n=8): 5 mg/kg/nap adagban egy vízőldékony PARP-gátlót, L-2286-ot (3. ábra) adtunk [109, 110], 2. ISO+E (n=8): 10 mg/kg/nap enalapril maleátot (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) alkalmaztunk, 3. ISO (n=8): fiziológiás sóoldat adása. A 4. csoport (Kontroll, n=8) egy kortárs kontroll csoport volt.

Az L-2286 dózisát korábbi munkáink alapján határoztuk meg [121, 122, 124]. Ezen eredmények szerint az L-2286 kódjelű molekula szignifikáns kardioprotektív hatással rendelkezik oxidatív sejtkárosodásokkal szemben már 10 μ M koncentráció esetén is. Az L-2286 alkalmazott napi dózisával (5 mg/kg/nap) a becsült szérum koncentráció átlagos biohasznosulást feltételezve 10 μ M körüli patkányban.

Két másik kísérletsorozatban (L-2286 vs. placebo, illetve rezveratrol vs. placebo) az izoproterenol dózisa kissé alacsonyabb (80 mg/kg/nap), a kezelési idő is rövidebb (8 hét), azonban az esetszám magasabb volt (n=12-15/csoport). Csoportok: Kontroll, ISO, ISO+L.

A rezveratrol hatását vizsgáló tanulmányban 4 csoport volt: Kontroll, RES (15 mg/kg/nap), ISO, ISO+RES.

Az állatokat leölésük előtt ketamin (200 mg/kg, ip) adásával altattuk és nátrium heparinnal (100 IU/állat i.p.) antikoaguláltuk.

4.2.2. Hipertenzív szívelégtelenség modellek

A. A kardiovaszkuláris remodelling vizsgálata (korai következmények)

10 hetes hím spontán magas vérnyomásos patkányokat (SHR) (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) véletlenszerűen 2 csoportra osztottunk. Az egyik csoport 32 hétig 5 mg/ttkg/nap L-2286 vízdoldékony PARP-1 enzim gátló kezelésben részesült ad libitum per os (SHR-L, n=15), a másik csoport nem kapott PARP-1 enzim gátló szert (SHR-C, n=15). Normotenzív kontrollként Wistar-Kyoto patkányokat használtunk (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország), L-2286 kezeléssel (WKY-L, n=15), illetve anélkül (WKY-C, n=15). Egy másik kísérletsorozatban a kezdés az állatok 6 hetes korában volt, a kezelés hossza pedig 24 hét volt. Az L-2286-ot az állatok ivóvizében oldottuk fel, a patkányok várható napi vízfogyasztásának megfelelően. A 24 vagy 32 hét letelte után az állatokat intraperitoneális ketamin-hidroklorid túladagolásával eutanizáltuk és 100 IU Na-heparinnal heparinizáltuk (Biochemie GmbH, Kundl, Ausztria).

B. Manifeszt szívelégtelenség kialakulása hipertenzív kardiopátiás állatokban

30 hetes hím SHR állatok (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) kerültek a vizsgálatba bevonásra. Az SHR állatok ebben a korban már markáns balkamra

hipertrófiát mutattak. Az állatokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az egyik csoport nem részesült kezelésben (n=47, SHR-C), míg a másik csoportban PARP-gátló hatású L-2286 kezelést (5 mg/kg/nap) alkalmaztunk 46 hétig (SHR-L, n=47). A harmadik csoport egy kortárs normotenzív (SD, CFY törzs) kontroll csoport volt (Kontroll, n=22, Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország). Az L-2286 az ivóvízben volt feloldva olyan koncentrációban, hogy az állatok előzetesen meghatározott folyadékfogyasztásával a meghatározott mennyiség kerüljön bevitelre. SHR állatokat naponta megfigyeltük, meghatározásra kerültek a következő jelek/paraméterek: aktivitás, manipulációkra adott válaszok, testtömeg, légzésszám és általános küllem. Több állaton megfigyelhetők voltak a következő tünetek: letargia, szubkután oedema és emelkedett légzésszám [125]. Az elhullást naponta rögzítettük.

4.2.3. Toxikus szívelégtelenség modell

Hím, 10-12 hetes CD1 egereket (Charles River Laboratories Hungary, Budapest, Magyarország), használtunk a vizsgálatunk során. Az egereket 5 csoportba osztottuk: 1. Kontroll csoport (Kontroll, n = 7): fiziológiás sóoldat ip. injekciója; 2. DOX csoport: doxorubicin-kezelt állatok (3 mg/kg, ip, hetente 2 dózis, 4 hétig (kumulatív összdózis: 24 mg/kg) (DOX, n = 30); 3. DOX + L csoport: DOX és L-2286 kezelt állatok (L-2286: 5 mg/kg/nap, per os, n = 29). Az L-2286 az ivóvízben volt feloldva olyan koncentrációban, hogy az állatok előzetesen meghatározott folyadékfogyasztásával a meghatározott mennyiség kerüljön bevitelre. 4. DOX és TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin) csoport (DOX+T: 20 mg/kg/nap per os, n = 26). A TEMPOL az ivóvízben volt feloldva olyan koncentrációban, hogy az állatok előzetesen meghatározott folyadékfogyasztásával a meghatározott mennyiség kerüljön bevitelre. 5. L csoport: L-2286-kezelt állatok DOX kezelés nélkül (L, n = 7). A TEMPOL, illetve L-2286 adása egy héttel a DOX kezelés megkezdése előtt kezdődött.

Az állatkísérleteket mind a PTE Munkahelyi Állatvédelmi Bizottságtól (MÁB), mind pedig az ÁNTSZ-től megkapott hivatalos engedélyek birtokában végeztük.

4.2.4. Szövetminták kivétele, tartósítása

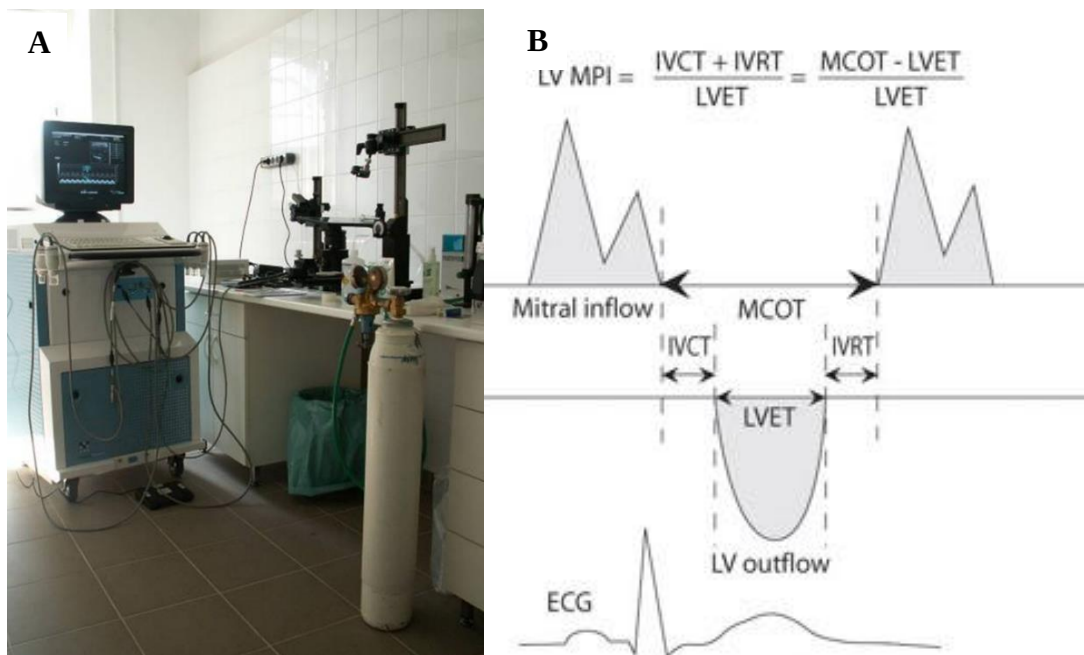
Az állatok leölése során vérvétel történt a plazma B-típusú natriuretikus peptid szint meghatározásához. Az állatok szíve kivételre került, majd a pitvarok és nagyerek eltávolításra kerültek a kamrákról. Ezt követően a kamrasúlyt meghatároztuk, melyet aztán a testtömegre, illetve a tibia hossza normalizáltuk (balkamra hipertrofiára utaló markerek). A nedves/száraz tüdő arány (pulmonális pangás markere) szintén meghatározásra került [47]. A szövettani/biokémiai meghatározásokra használt szíveket vagy gyorsfagyasztást követően -70°C -on tároltuk, vagy 10%-os formalinnal fixáltuk. A nagyereket Olympus operációs mikroszkóp segítségével távolítottuk el, gyorsfagyasztottuk és -70°C -on tároltuk vagy 4%-os pufferezt paraformaldehid oldatban fixáltuk. Hisztokémiai vizsgálatokhoz az agyakat in vivo transzkardiálisan fiziológias sóoldattal, majd formalinnal perfundáltuk, ezután eltávolítottuk és 4%-os paraformaldehid pufferben tároltuk.

4.3. Vérnyomásmérés

A hipertenzív állatokkal (SHR) végzett kísérletsorozatokban a patkányok vérnyomását 4 hetente, non-invazív farokmandzsettás módszerrel (Hatteras SC 1000 Single Channel System, Hatteras Instruments, Cary, NC, USA) mértük a kísérlet kezdetétől [126]. Invazív vérnyomásmérés történt a vizsgálat elején, közepén és végén néhány állaton, hogy a non-invazív vérnyomásmérési módszer eredményeit ellenőrizhessük [127].

4.4. Transthoracalis echocardiographia

A kísérlet kezdetekor minden állat ultrahang vizsgálaton esett át az esetlegesen előforduló abnormalitások kizárása végett. Az egereket, illetve patkányokat 1.5% izoflurán és 98.5% oxigén keverékével felületesen altattuk és 2D ultrahang vizsgálatot végeztünk. Az állatok mellkasát szőrtelenítettük, fűtött padra helyeztük őket a normotermia fenntartása érdekében és VisualSonics VEVO 770-es (VisualSonics, Toronto, Kanada)



4. ábra. A kisállat ultrahangos vizsgálatokhoz használt echocardiographiás berendezés (A) és a Tei-index kiszámításának módja. MCOT: mitrális billentyű záródásától nyitásig eltelt idő, IVCT: isovolumetriás kontrakciós idő, IVRT isovolumetriás relaxációs idő, LVET bal kamrai ejekciós idő.

nagyfelbontású ultrahangos berendezéssel határoztuk meg a szív struktúrális és funkcionális tulajdonságait (4. ábra A). Egerek vizsgálatára 37.5 MHz-es, patkányok vizsgálatára 25 MHz-es vizsgálófejet használtunk. Az állatok félig bal oldalfekvő helyzetben voltak a vizsgálat során. A balkamrai dimenziók és a szisztolés balkamra funkció a parasternalis rövid és hossz tengelyi metszetekből lettek meghatározva a papilláris izom szintjében. A balkamrai (LV) frakcionális roströvidülést (FS), ejekciós frakciót (EF), balkamrai végdiasztolés átmérőt (LVID_d) és volument (LVEDV), balkamrai végszisztolés átmérőt (LVID_s) és volument (LVESV), valamint a septum és hátsó fal vastagságát (PW) mértük meg a vizsgálatok döntő részében. FS (%) számítása: $100 \times [(LVID_d - LVID_s)/LVID_d]$, EF (%) számítása: $100 \times [(LVEDV - LVESV)/LVEDV]$. Egyes vizsgálatokban további mérések történtek és egyéb paraméterek is meghatározásra kerültek. Relatív falvastagság (RWT) számítása: $RWT = (PW \text{ vastagság} + \text{septális falvastagság}) / LVID_d$. A csúcsi 4 üregű nézetből a következő paramétereket határoztuk meg: Korai (E) és késői (A) diasztolés sebesség, valamint az isovolumetriás relaxációs idő (IVRT) és isovolumetriás kontrakciós idő

(IVCT) a mitrális billentyűn keresztüli beáramlási görbék vizsgálatával kerültek meghatározásra. A szívizomzat teljesítmény indexének meghatározására az alábbi képletet alkalmaztuk (MPI, vagy Tei index): $MPI = (IVRT + IVCT)/LVET$ (4. ábra B). A szöveti Doppler mérések során a mitrális annulus szeptális részén határoztuk meg az E' és A' hullámokat és ennek segítségével határoztuk meg az E/E' hányadost is. Az echocardiographiás vizsgálatokat, illetve a vizsgálatok kiértékelését egy kutató végezte, aki „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira [128].

4.5. Vaszkuláris ultrahang vizsgálatok

A patkányokat 1.5% izoflurán és 98.5% oxigén keverékével felületesen altattuk. Az állatok nyakát és mellkasát szőrtelenítettük, fűtött padra helyeztük őket a normotermia fenntartása érdekében. Az aorta stiffness indexet (ASI) és a carotis artéria falának intima-media vastagságát (IMT) VisualSonics VEVO 770-es ultrahangos berendezésével határoztuk meg (VisualSonics, Toronto, Kanada). Méréseinkhez egy 40 MHz-es vizsgálófejet használtunk. Az aorta elasztikus tulajdonságát jellemző ASI meghatározásához használt formula [129]: $(ASI) = \ln(SBP/DBP) \times DD/(SD - DD)$. A vaszkuláris ultrahangos vizsgálatokat, illetve a vizsgálatok kiértékelését egy kutató végezte, aki „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira.

4.6. Szív NMR vizsgálatok

Az NMR spektumokat egy Varian ^{UNITY} INOVA 400 WB berendezéssel vettük fel. A perfundált patkányszívekről ³¹P spektumokat (161.90 MHz) 37°C-on egy Z•SPEC® 20 mm „broadband” mintavételi fejjel nyertünk (Nalorac Co., Martinez, CA, USA) WALTZ-16 proton lecsatolást alkalmazva az adatgyűjtés ideje alatt ($\gamma B_2 = 1,2$ kHz). A mágneses mező homogenitását a ¹H jel rendszeres ellenőrzése segítségével állítottuk be ($w_{1/2} = 10-15$ Hz). A ³¹P spektumokat 3 perces időközönként vettük fel a következő paramétereket alkalmazva: 120 tranziens/FID, 1.25 s várakozási idő, 45 fokos kitérítési szögű impulzus, 10 kHz spektrális ablak, 0.25 s adatgyűjtési idő. Ezen kísérleti

körülmények között az impulzusok közötti késés nagyobb a vizsgált metabolitok T1 értékének ötszörösénél, és a különféle molekulák relatív koncentrációi arányosak a jel alatti terület nagyságával. A foszfátot tartalmazó molekulák (kreatin foszfát, ATP, anorganikus foszfát) mennyiségét a szívperfúziók foszforspektrumaiban az adott molekulát reprezentáló görbe alatti terület nagyságából számítottuk ki. A perfúzió kezdetén az így kiszámított mennyiségeket 100%-nak vettük, és a perfúzió alatt a molekulák mennyiségét a perfúzió kezdetén mért értékekhez viszonyítva százalékosan adtuk meg (az anorganikus foszfátnál önkényes mértékegységet választottunk).

A miokardiális intracelluláris pH érték az anorganikus foszfát kreatin foszfáthoz viszonyított kémiai eltolódásából (δ) számítható ki az alábbi képlet alapján: $\text{pH} = 6.77 + \log [(\delta - 3.23)/(5.70 - \delta)]$.

4.7. Izometriás ér-miográfia

Standard protokollt alkalmazva vizsgáltuk csoportonként 4 állat carotis artériáját [130]. Ketamin-xilazin anesztézia alatt a carotis artériákat eltávolítottuk és azonnal jéghideg (4°C), oxigenizált (95% O₂, 5% CO₂) fiziológiás Krebs oldatba helyeztük (mMol mértékegységben: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 1.2 Mg₂SO₄, 11.1 glükóz és 1.6 CaCl₂), majd 5 mm-es gyűrűkre vágtuk. Minden egyes gyűrűt két rozsdamentes acél drót közé helyeztünk (átmérő: 0.0394 mm) 5 ml mennyiségű szövetfürdőben az ér-miográfból (Small Vessel Myograph, DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia). Normalizációs eljárást végeztünk, hogy elérjük az 1.0 g (13.34 mN) bazális tónust, majd az artéria darabokat 60 percig hagytuk stabilizálódni a mérések előtt. Az adatok összegyűjtéséhez és megjelenítéséhez Myodaq 2.01 M610+ szoftvert használtunk. A szövetfürdőt folyamatosan 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével oxigenizáltuk és a hőmérsékletet 36.8 °C-on tartottuk (pH 7.4). A kumulatív válaszgörbéket acetil kolin (ACh) (10⁻⁹ M – 10⁻⁵ M) és nitroprusszid-Na (SNP) (10⁻⁹ M – 10⁻⁵ M) emelkedő dózisainak jelenlétében állítottuk fel. Az endotéliumot intaktnak tekintettük azon gyűrűknél, amelyek acetil-kolin jelenlétére 30%-nál jobban relaxálódtak. A kísérlet végén 60 mM KCl hozzáadásával győződünk meg a carotis artériák épségéről. Minden mérést különböző patkányokból vett artéria gyűrűkön végeztünk.

4.8. Plazma BNP koncentráció meghatározása

A vérmintákat EDTA-t és aprotinint (0.6 IU/mL) tartalmazó Lavender Vacutainer csövekbe gyűjtöttük. A csöveket ezt követően hűtve (4°C) 1600 x g-n centrifigáltuk 15 percig, hogy a plazmát külön válasszuk. A felülúszót -70°C-on tároltuk. A plazma B-típusú nátriuretikus peptid-45 szintet (BNP-45) enzim immunoassay módszerrel határoztuk meg a gyártó előírásai szerint (BNP-45, Rat EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA).

4.9. Szövettan

A formalinban fixált balkamrákból 5 mm vastag szeleteket vágunk le, majd paraffinba ágyasztuk őket. A paraffinos blokkból aztán 5 µm vastag metszeteket készítettünk. Az intersticiális fibrózis fokának meghatározásához a Masson's trikróm festést használtuk. Az adatok kvantifikálására az NIH ImageJ képanalizáló szoftverét használtuk. A színek szétbontására képes dekonvolúciós program segítségével a kék festődés mértékét mértük meg, mely a kollagén tartalommal arányos. Minden szövettani mintát egy kutató értékelt, aki „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira [131].

A szívizomsejtek méretének meghatározásához a metszeteket hematoxin-eozin (HE) módszer szerint festettük meg. 400x nagyításon fényképdokumentáció készült. Az szívizomsejtek átmérőjének a meghatározása a sejtmag régiójában történt. Az átlagos sejtmag átmérő meghatározásához 100 sejt esetében végeztünk méréseket. A mérésekhez a TelPath analízáló rendszert használtuk (Bollman.com, 2000).

Az agyi minták vizsgálatához ketamin/xilazin anaesthesiát követően thoracotomia történt. Ennek során az aortagyököt kanüláltuk és a jobb artéria femorálist bemetszettük, hogy az effluens távozhasson. Az állatokat fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, hogy a vért eltávolítsuk az érrendszerből, majd pufferezt PFA-t használtunk. Decapitációt követően az agyat eltávolítottuk, majd 4°C-on egy éjszakán át posztfixáltuk PFA-ban. Paraffinba ágyazást követően koronális metszeteket készítettünk a bregma pozíciójához

viszonyított (-4.3) – (-3.8) pozíciók között (Paxinos&Watson). A metszeteket PAS vagy krezil ibolya festéssel festettük meg. A hippocampalis piramis sejtek számolását a CA1-CA2 határ és a CA1-entorhinális kéreg átmenet között végeztük el krezil ibolya festett metszeteken. TUNEL tesztet (R&D Systems, 4810-30-K) a beágyazott agyi mintákon végeztük el a gyártó előírása szerint. A sejt számolást több vizsgáló végezte el, mindegyikük „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira.

4.10. Elektronmikroszkópia

Az aorta és a carotis elektronmikroszkópos vizsgálatához ugyanazokat a szegmentumokat használtuk, mint a fénymikroszkópos vizsgálatokhoz. Az aorta falából 1 mm hosszú blokkokat vágunk, melyeket 4%-os pufferolt formaldehid oldat és 2,5%-os glutáraldehid oldat keverékébe helyeztük 4°C-on 24 órára. Foszfát pufferrel történő mosást követően a mintákat 1% osmium tetroxid használatával fixáltuk (0.1 M PBS-ben 35 percig). Pufferrel történt többszöri mosást követően felszálló alkoholsorban dehidráltuk. Uranil acetátos (1%) oldattal növeltük a kontrasztot. Dehidráltat követően a beágyazáshoz Durcupan gyantát (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) használtunk, a metszeteket Leica ultramikrotómmal metszettük. Az ultravékony metszeteket rácsos rézgridekre vettük fel, majd az uranil acetáttal és ólom citráttal végzett kontrasztosítás után Jeol 1200EX-II típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A szívizomzat vizsgálatához ketamin/xilazin anaesthesiát követő mellkas megnyitás során a szívet retrográd módon perfundáltuk az aorta gyökön keresztül jéghideg PBS-el a vér alakos elemeinek eltávolítása céljából. Ezt követően módosított Kranovsky fixálóoldatot alkalmaztunk a perfúzió során (2% PFA, 2,5 % glutáraldehid, 0,1 M Na-kakodilát puffer, pH 7.4 kiegészítve 3 mM CaCl₂-al). 1 mm vastag szeleteket metszettünk a bal kamra szabad falából. Foszfát pufferrel történő mosást követően a mintákat 1% osmium tetroxid használatával fixáltuk (0.1 M PBS-ben 35 percig). A mintákat pufferrel történt többszöri mosást követően felszálló alkoholsorban dehidráltuk. Dehidráltat követően a beágyazáshoz Durcupan gyantát (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) használtunk, a metszeteket Leica ultramikrotómmal metszettük. 1 µm vastagságú félvékony és ultravékony metszeteket (70 nm) készítettünk, melyeket

collodion-bevont (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) rézrácsra vettük fel. Uranil acetátos (1%) oldattal növeltük a kontrasztot. A mintákat Jeol 1200EX-II típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az interfibrilláris mitokondriumok mérését és a krisztadenzitás meghatározását ImageJ szoftver segítségével végeztük el [132].

4.11. Az infarktus méretének meghatározása

ISO adása után 24 órával az állatok leölésre kerültek, szívüket kivettük és egy éjszakán át -20°C-on tartottuk. A megfagyott kamrákból 2-3 mm vastag szeleteket vágunk, melyeket 1%-os trifeniltetrazolium klorid oldattal (TTC) (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) kezeltünk 37°C-on 0.2 M Tris pufferben (pH 7.4), 30 percig. A normál szívizomzat téglavörösen festődött, az elhalt terület azonban festődésmentes maradt [133].

4.12. Szérum nekroenzimek aktivitásának meghatározása

A szérum laktát dehidrogenáz (LDH) és kreatin kináz (CK) szinteket a 24 órával az ISO alkalmazását követően levett vérmintákból mértük meg. Az enzimaktivitások meghatározása a korábban már leírt standard módszerek szerint történt [134, 135].

4.13. A mitokondriális enzimaktivitás meghatározása

A NADH:citokrómmal c oxidoreduktáz aktivitását a korábbiakban leírt módszer szerint mértük [81]. Az enzimaktivitást a citokrómmal c redukció ütemének meghatározásával

mértük 550 nm-en. Az inkubációs médium jellemzői: 50 mmol/l nátrium-foszfát, 1 mmol/l Na-azid, 1.5 mM NADH és 50–75 µg mitokondriális fehérje/ml, pH 7.5. A reakciót 40 µl citokróm c hozzáadásával indítottuk el.

4.14. A lipid peroxidáció és a fehérje oxidáció meghatározása

A lipid peroxidáció mértékét a tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) mennyiségének megméréseivel jellemeztük. A szívizom szövetet 6.5% TCA-ban homogenizáltunk, majd 15% TCA-t, 0.375% TBA-t és 0.25% HCl-t tartalmazó reagenst adtunk hozzá, forrásban lévő vízfürdőbe helyeztük 15 percre, majd lehűtöttük. Centrifugálást követően a felülúszó abszorbanciáját 535 nm-en mértük. Malondialdehid (MDA) standardot használva a TBARS mennyiséget nmol/g nedves szövetben adtuk meg [136].

A fehérjeoxidáció kimutatására 50 mg fagyasztott szívizom mintát 1 ml 4%-os perklorosavban homogenizáltunk. Az oldat fehérje tartalmát centrifugálással gyűjtöttük össze. A fehérjék karbonil csoport tartalmát 2,4-dinitrofenil hidrazinnal határoztuk meg [137].

4.15. Immunhisztokémia és konfokális lézer-scanning fluoreszcens mikroszkópia

Az immunhisztokémiára és immunfluoreszcenciára szánt aorta, artéria carotis és agyi mintákat az eltávolításuk után azonnal pufferelt, 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 1 napig. Az aortából és a carotisokból 5 µm, az agyakból 10 µm vastag mintákat metszettünk.

Az immunhisztokémiai festést nitrotirozin (NT) és 4-hidroxinonenal (4-HNE) elleni antitestekkel végeztük. Primer antitestnek anti-nitrotirozint (Millipor #06-284, nyúl poliklonális, 1:100), 4-HNE-t (Immunológia és Biotechnológia Intézet, Pécs,

Magyarország 1:200), poli(ADP-ribóz)-polimert (PAR) (Abcam ab14459, egér monoklonális, 1:500), 8-oxoguanine/8-OxG (Abcam ab64548, 1:500) és gliális fibrilláris savas proteint (GFAP) (1 Degree Bio #Z0334, nyúl poliklonális, 1:500) használtunk. A primer immunreakciót biotinilált szekunder antitesttel tettük láthatóvá avidin-biotin-peroxidáz erősítő rendszer segítségével (PK-6200 Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Kromogénnek 3,3'-diaminobenzidin-t (DAB) használtunk. Az immunreakciót fénymikroszkóp alatt követtük, és a felesleges DAB óvatos lemosásával állítottuk meg. Az agyi metszeteken Cresyl-viola és PAS (perjódsv-Schiff-reagens), míg a verőér metszeteken Masson's-trikróm festést alkalmaztunk.

Az apoptózis indukáló faktort (AIF) (Cell Signaling Technology #4642, nyúl poliklonális, 1:100), NF-kappa-B-t (NF- κ B) (Cell Signaling Technology #13586, nyúl monoklonális, 1:200) és az MKP-1-et (MAP-kináz foszfatáz-1) (Santa Cruz Biotechnology sc-370, nyúl poliklonális, 1:100) fluoreszcens immunhisztokémiával vizsgáltuk az aortában és a carotisokban. Szekunder antitestnek számár-anti-nyúl antitestet (Northern Lights, fluorokróm jelölt antitest, R&D Systems NL004, 1:200) használtunk.

Gyártói protokoll szerint TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-end Labeling) tesztet (R&D Systems, 4810-30-K) végeztünk agyi metszeteken, hogy kimutassuk az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát a piramissejtekhez viszonyítva.

4.16. Western-blot

A szív, illetve nagyér mintákat 50 mM, jéghideg pH 8.0 Tris-pufferben homogenizáltuk (ami tartalmazott 1:100 proteáz és 1:100 foszfatáz gátló koktélt és 50 mM nátrium-vanadátot (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország), a fehérjéket 2x mintapufferbe vettük fel, majd 7-12 %-os SDS-poliakrilamid gélen szétválasztottuk. A fehérjéket méret alapján elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, 2 óra blokkolás után (3%-os nem zsíros tejjel Tris-pufferelt sóoldatban) a membránokat 4 °C-on egy éjszakán át a következő antigéneket felismerő antitestekkel reagáltattuk: foszfo-specifikus AKT-

1/fehérje kináz B-alfa^{Ser473} (AF887, 1:1000), anti-aktin (A2228, 1:10000), foszfo-specifikus ERK1^{Thr202/Tyr204}/ERK2^{Thr185/Tyr187} (AF1018, 1:1000), foszforilált p38 MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} (AF869, 1:1000), foszfo-specifikus JNK^{Thr183/Tyr185} (AF1205, 1:1000), anti-MKP-1 (sc-370), foszfo-specifikus protein kináz C (PKC) (pan) β II Ser⁶⁶⁰ (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C α/β II (PKC α/β II) Thr^{638/641} (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C δ (PKC δ) Thr⁵⁰⁵ (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C δ (PKC δ) Thr⁶⁴³ (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz ξ/λ (PKC ξ/λ) Thr^{410/403} (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C ϵ (PKC ϵ) Ser⁷²⁹ (1:10000), és nemfoszforilált PKC ϵ (1:15000), anti-poli(ADP-ribóz) (anti-PAR) (Abcam ab14459, 1:5000).), foszfo-Foxo1A^{Ser256} (forkhead transzkripció faktor, FKHR^{Ser256}, 1:1000), Hősök fehérje (Hsp) 72, (1:20,000), Hsp90 (1:1000), COX-2 (1:1000) és iNOS (1:1000). Minden antitestet az R&D Systems, Biomedica Kft-től (Magyarország) vásároltunk, kivéve az anti-aktint (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország), az anti-MKP-1-et, Hsp90-et (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA.), a Hsp72-t (Calbiochem, Merck Kft, Budapest, Magyarország), a DRP1-et, OPA1-et (mindkettő Cell Signaling Technology, 1:1000) és az anti-PAR-t (Alexis Biotechnology, London, Egyesült Királyság). A membránokat 6x5 percig mostuk Tris-puffer oldatban (pH 7.5), ami tartalmazott 0.1% Tween 20 detergenst (TBST), mielőtt hozzáadtuk a kecske-anti-nyúl torma peroxidáz konjugált szekunder antitestet (1:30000 hígítás, Bio-Rad, Budapest, Magyarország). Az antigén-antitest komplexeket kemilumineszcenciával tettük láthatóvá. Az eredményeket NIH ImageJ szoftver használatával számszerűsítettük.

4.17. Sejtviabilitási vizsgálatok

H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteket (European Collection of Cell Cultures - ECACC) 10 % borjú szérumot (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartalmazó DMEM-ben tartottuk. A médium emellett 4 mM glutamint, 100 IU/ml penicillint és 100 ug/ml streptomycint is tartalmazott. A doxorubicin (DOX) és a PARP-gátló L-2286 sejtviabilitásra gyakorolt hatását egy diazo festék (3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) segítségével, illetve a laktát dehidrogenáz (LDH) kiáramlásával határoztuk meg. Az MTT teszt a mitokondriális légzést – sejt

életképességének egy jellemzőjét – határozza meg. Az LDH kiáramlása pedig a sejtmembrán integritását jelzi. H9c2 sejteket 96-lyukú plate-en tartottuk párásított 95% O₂/5% CO₂ légkörben 37°C-on. A sejteket 4 órán keresztül 0.3 mM H₂O₂-vel kezeltük 1-10 µM L-2286 jelenlétében és MTT teszttel jellemeztük a sejtek életképességét.

Egy másik vizsgálatban a H9c2 sejteket DOX különböző koncentrációival (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 µM) kezeltük 24 órán keresztül, majd az L-2286 előkezelés hatását (30 perc, 1-10 µM) határoztuk meg az MTT teszt segítségével 1 µM DOX jelenlétében.

A médium eltávolítása után MTT-t adtunk (0.1 mg/ml) a sejtekhez. 1 órás inkubációt követően a reakciót dimetil szulfoxid tartalmú oldattal állítottuk le. A kék kristályokat egy éjszakán keresztül oldottuk fel, az abszorbanciát 570-nm hullámhosszon spektrofotométerrel mértük meg. A sejtvitalitást a kontrollhoz viszonyított abszorbanciával határoztuk meg.

Az LDH release meghatározásához speciális LDH mérőoldatot (Sigma-Aldrich Ltd, Budapest, Magyarország) adtunk a médiumhoz. 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten tartottuk a plate-eket. A minták abszorbanciáját 490-nm hullámhosszon spektrofotométerrel mértük meg. Az LDH release-t a kontrollhoz viszonyított abszorbanciával határoztuk meg.

4.18. A rezveratrol vizsgálata posztinfarktusos, stabil koronária betegek körében. A humán klinikai vizsgálat módszertana

4.18.1. Betegek és módszerek

Vizsgálatunk során 40 ismert posztinfarktusos beteget randomizáltunk két csoportba (42-80 év, átlagéletkor 66.3±8.9 év, 26 férfi, 14 nő). Mindegyik beteg anamnézisében lezajlott miokardiális infarktus (legalább 6 hónappal a randomizálás előtt), valamint coronarographiával igazolt, revaszkularizációra nem alkalmas háromérbetegség szerepelt. A bevételi kritériumok fontos eleme volt, hogy a betegek a nemzetközi irányelveknek megfelelő szekunder prevenciós gyógyszeres kezelésben részesüljenek. A vizsgálat során 20 beteg napi 10 mg rezveratrol (Admarc Med Diagnostics & Nutraceuticals, Fót, Magyarország), 20 beteg pedig placebo kezelésben részesült 3

hónapon keresztül. A betegek gyógyszeres kezelése a vizsgálati periódus alatt nem változott. A vizsgálat előtt és a harmadik hónap végén fizikális vizsgálat, vérnyomásmérés, vérvétel, EKG, echocardiographia és flow-mediálta vazodilatáció mérése történt.

4.18.2. Laboratóriumi paraméterek

A kubitális punkcióval nyert vérmintákból meghatároztuk a vérképet (fehérvérsejtszám, hemoglobint), a C-reaktív proteint, a TNF- α és a vércukor szintjét, valamint a lipidprofilot (összkoleszterin, triglicerid, HDL és LDL-koleszterin szint).

4.18.3. Hemoreológiai paraméterek

A vizsgálatainkhoz szükséges vérmintákat könyökvénából vettük, a hemoreológiai paraméterek közül a hematokritot, plazma fibrinogén-koncentrációt, plazma és teljes vér viszkozitást, vörösvértest (RBC) deformabilitást, aggregációt és a vérlemezke aggregációt tanulmányoztuk. A hematokritot mikrohematokrit centrifuga (Hemofuge, Heraeus Instr., Németország), a plazma fibrinogén koncentrációt a Clauss módszer segítségével határoztuk meg. A plazma- és teljesvér-viszkozitást Hevimet 40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Magyarország) mértük. A vérviszkozitás értékeit 90 1/s nyírási sebességnél adtuk meg. A vörösvértest-aggregáció mérése Myrenne MA-1 aggregométerrel történt (Myrenne GmbH, Németország) történt Schmid-Schönbein fény-transzmissziós módszerét alkalmazva. A módszer a vörösvértest-szuszpenzió fényáteresztő képességének változásán alapul, az aggregáció mértékét az aggregációs indexekkel jellemezzük (AI). A vörösvérsejt filterabilitást, amely a sejt deformabilitására utaló paraméter, Carat FT-1 filtrométerben mértük (Carat Kft, Magyarország) a St George's technikát alkalmazva. A készülékben a vörösvértest-szuszpenzió 5 μ m pórusátmérőjű Nucleopore membránon áramlik keresztül. Kísérleteinkben az átáramlást biztosító filtrációs nyomást 4 vízcm nagyságúra állítottuk be. Trombocita aggregometriás méréseinket Carat TX-4 típusú trombocita aggregométerrel végeztük (Carat Kft, Magyarország) [138].

4.18.4. Flow-mediálta vazodilatáció

A flow-mediálta dilatációt (FMD) Celermajer módszerével mértük [139]. Tíz perc ágynyugalom után, fekvő helyzetben lévő beteg jobb artéria brachiálisáról 10 MHz-s transducerrel (Technus MPX, ESAOTE, Olaszország) hosszanti képet nyertünk. Nyugalmi állapotban az artéria átmérőjét és az áramlást detektáltuk, majd az alkaron a vérnyomásmérő mandzsettáját 250 Hgmm-re felfűjtük 4 percig. A felengedést követően 15 másodpercig regisztráltuk a centrális áramlást majd 90 másodperc után megmértük az ér átmérőjét. Az FMD értéket a nyugalmi és a felengedés után 90 másodperccel mért értékek százalékos különbségében adtuk meg [139, 140].

4.18.5. Echocardiographia

A betegek transthoracalis echocardiographiás vizsgálatát GE Vivid 7 Pro (GE Healthcare, Egyesült Királyság) készülékkel végeztük. A balkamrai dimenziók, a szisztolés és diasztolés funkció meghatározása a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően történt [141].

4.19. Statisztikai elemzés

A csoportok adatainak normál eloszlását Shapiro-Wilk, míg a variancia homogenitást Levene-teszt segítségével ellenőriztük. Csoportok közötti eltéréseket egy-utas ANOVA használatával vizsgáltuk, melyet Bonferroni post-hoc összehasonlítás követett. Önkontrollos vizsgálatok során páros mintás t-próbát használtunk. Kiindulási állapotban a törzsek adatai független mintás t-próbával lettek összevetve. Minden más összehasonlítás törzs x kezelés két-utas ANOVA segítségével történt. A faktorok közti interakció esetén a kezelés által okozott különbség szignifikanciáját független mintás t-próbával ellenőriztük vissza adott kontrollhoz viszonyítva. A mitokondriumok vizsgálata során egy-utas ANOVA-t használtunk Welch korrekcióval, melyet Dunnet post hoc teszt

követett, hogy a statisztikai különbségeket tisztázzuk az SHR-C csoporttal való összehasonlítás során. Mivel a mitokondriumok területi és hossz tengelyi mérései során nyert adatok nem mutattak normál eloszlást, ezért ezen eredményeket Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk páros összehasonlítás során.

A rezveratrollal végzett humán klinikai vizsgálat esetében a kezelés következtében létrejövő változásokat páros mintás t-próbával határoztuk meg. A csoportok közötti különbséget pedig Pearson-féle khi-négyzet próbával jellemztük.

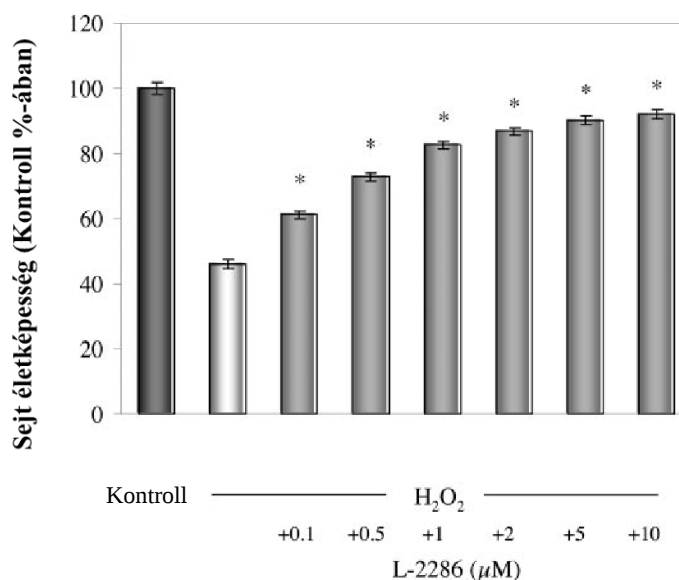
Az analízisek az IBM SPSS programnak az aktuálisan elérhető legfrissebb verziójával történtek. Minden adat $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ ábrázolva. Az összehasonlításokat $p < 0.05$ határ alatt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. L-2286-al kiváltott farmakológiai PARP-gátlás hatása akut stressz szituációk során. In vitro tesztekől az in vivo szívinfarktus modellig

5.1.1. L-2286 kezelés hatása a hidrogén peroxid által kiváltott citotoxicitással szemben H9c2 sejtekben

Az MTT teszt azt igazolta, hogy az L-2286 dózis dependens módon nyújtott védelmet a H_2O_2 által kiváltott citotoxicitásra H9c2 sejteken, már $0.1 \mu\text{M}$ koncentrációtól kezdve (5. ábra). Ezen kísérletes körülmények között az L-2286 hatékonysága (EC_{50} és maximális hatékonyság) meghaladta az egyéb quinazolinokét, mint a 4-hidroxiquinazolin és 2-merkaptó-4(3H)-quinazolin (1. táblázat).



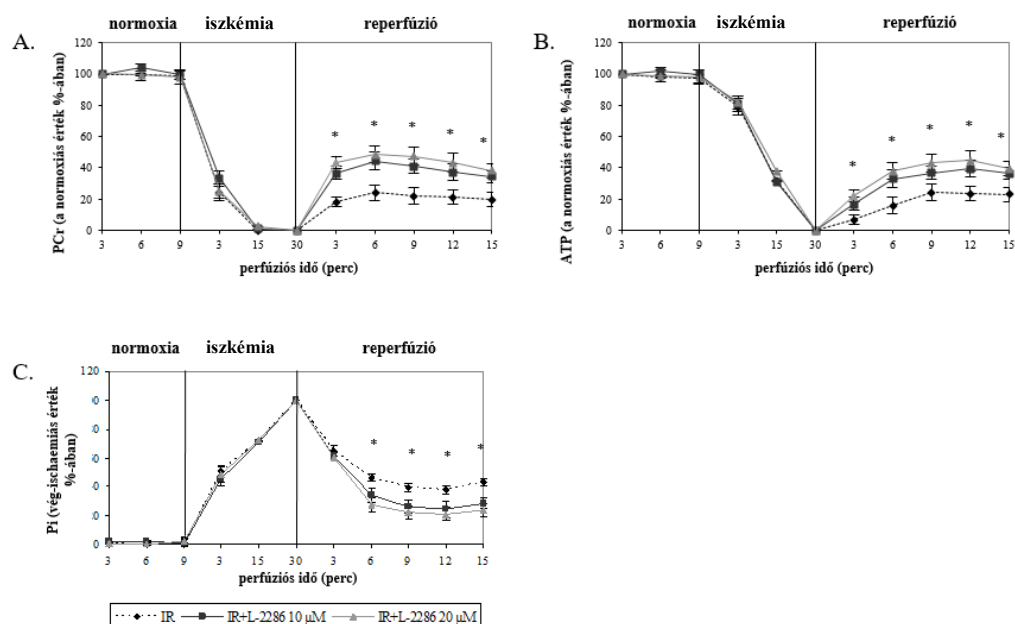
5. ábra. L-2286 védő hatása H9c2 sejteket ért oxidatív stresszel szemben. A sejtek $0.3 \text{ mM } \text{H}_2\text{O}_2$ és/vagy L-2286 kezelésben részesültek 4 órán keresztül. A citotoxicitást MTT tesztel határoztuk meg és az értékeket a kontroll mintákhoz viszonyítottuk. Az értékek átlag $\pm$ SEM formában kerültek megadásra ($n \geq 4$). *Szigorú különbség a csak H_2O_2 -vel kezelt csoporthoz képest ($p < 0.01$).

Hatóanyag	HQ	MQ	L-2286
EC ₅₀ (μM)	211.6±3.2*	178.6±6.9*	0.41±0.03
Maximális védelem (%)	55.7±2.6*	76.2±4.9*	85.7±3.7

1. táblázat. Az L-2286, a HQ és a MQ hatása a hidrogén peroxid indukálta citotoxicitásra H9c2 sejteken. Az értékek átlag±SEM formában kerültek megadásra (n≥4). * Szignifikáns különbség az L-2286-kezelt csoporthoz képest (p<0.01).

5.1.2. L-2286 kezelés elősegíti a miokardium posztisztkémiás energia homeosztázisának helyreállítását

A Langendorff módszer szerint perfundált szívek energia metabolizmusát ³¹P NMR spektroszkópia segítségével monitoroztuk. Iszkémia a magas energiájú foszfát szintek gyors csökkenését okozta. Ezzel párhuzamosan az anorganikus foszfátok mennyisége jelentősen megemelkedett (6. ábra A-C). Az általunk alkalmazott kísérletes körülmények között a magas energiájú foszfát szintek csak mérsékelt visszatérést mutattak a kezeletlen szívekben a 15 perces reperfúziós fázis során. L-2286 kezelés azonban mind 10, mind 20 μM-os koncentrációban elősegítette a kreatin foszfát és ATP szintek emelkedését (6. ábra A-B). Ennek megfelelően az L-2286 gyorsabb és jelentősebb anorganikus foszfát reutilizációt okozott reperfúzió során (6. ábra C).



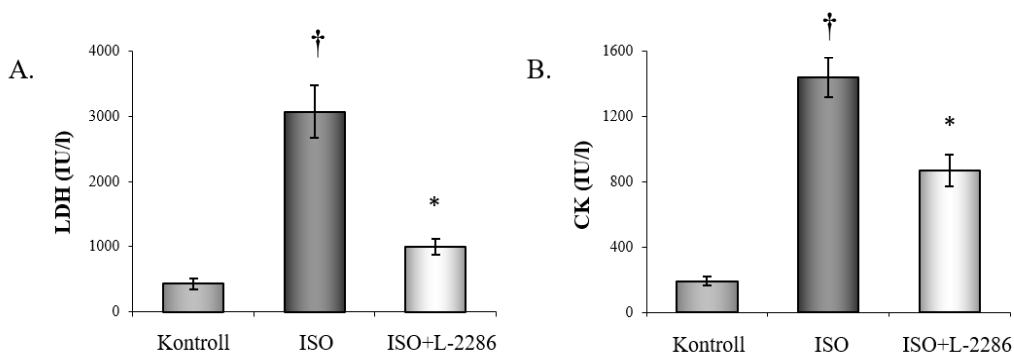
6. ábra. Az L-2286 mérsékli az iszkémia-reperfúzió okozta károsodást izolált perfundált szívekben. A kreatin foszfát - PCr (A), az ATP (B) és az anorganikus foszfát szintek - Pi (C) időbeli változásának meghatározása ^{31}P NMR spektroszkópia segítségével történt. Az értékek átlag $\pm$ SEM formában kerültek megadásra (n=5). IR: ischaemia-reperfusio. *Szignyifikáns különbség a kontroll, nem kezelt mintáktól (p<0.01 vs. IR).

5.1.3. L-2286 csökkenti iszkémia-reperfúzió során a lipidek és fehérjék oxidatív károsodását

Iszkémia-reperfúzió hatására a lipidperoxidáció mértékét jelző thiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) jelentős emelkedést mutatnak a normoxiás szívekhez képest (24.4 ± 1.1 nmol/g-ról 43.2 ± 1.25 nmol/g-ra, p<0.001). L-2286 alkalmazása 10 μM koncentrációban jelentősen csökkentette a TBARS mennyiségét (30.2 ± 1.7 nmol/g-ra, p<0.01 vs. IR) a kezeletlen szívekhez viszonyítva, amely arra utal, hogy az L-2286 csökkenti az IR kiváltotta lipid peroxidáció mértékét. IR emellett a fehérje oxidációra jellemző paramétereket (fehérje karboniláció) is jelentősen emelte (1.2 ± 0.05 $\mu\text{mol/g}$ -ról 2.2 ± 0.1 $\mu\text{mol/g}$ -ra, p<0.001), L-2286 kezelés azonban jelentősen mérsékelte a fehérjekárosodás mértékét (1.5 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$ -ra, p<0.01 vs. IR).

5.1.4. L-2286 csökkenti az izoproterenol kezelés által kiváltott szívizomsejt vesztés mértékét

ISO kezelés által kiváltott sejtkárosodás hatására a szívizomsejtek sejtmembránjának integritása is károsodik, melynek hatására nekroenzimek áramlanak ki a sejtéből. A nem kezelt kontroll állatokhoz viszonyítva ISO alkalmazása jelentősen fokozta a CK és LDH kiáramlás mértékét a károsodott szívizomsejtekből ($p < 0.01$ vs. Kontroll). EKG monitorozás emellett azt igazolta, hogy a PARP-gátló kezelés nem befolyásolta a jatrogén szívinfarktus kiváltásában központi szereppel bíró tachycardiát, ennek ellenére az L-2286 kezelés jelentősen csökkentette a szérumban mérhető CK és LDH aktivitást ($p < 0.05$ vs. ISO) (7. ábra).



7. ábra. L-2286 kezelés csökkenti az izoproterenol kiváltotta *in vivo* szívizom károsodás mértékét. A szérum LDH (A) és CK (B) aktivitásokat 24 órával az ISO adása után határoztuk meg. Az értékek átlag $\pm$ SEM formában kerültek megadásra ($n=5$). * $p < 0.05$ vs. ISO, $^{\dagger}p < 0.01$ vs. ISO).

A nekroenzimekhez hasonlóan a TTC festés ($n=5$) is igazolta, hogy ISO adása mellett jelentős méretű - elsősorban szubendokardiális lokalizációjú - miokardiális infarktus (a balkamra területének $21.1 \pm 2\%$ -a) alakult ki. L-2286 kezelés mellett a kialakult infarktus mérete jelentősen csökkent ($8.9 \pm 1\%$ -ra, $p < 0.05$ vs. ISO).

5.2. PARP-gátlás hatása krónikus szívelégtelenség modellekben

5.2.1. PARP gátlás javítja a gravimetriás paramétereket ISO-indukálta szívelégtelenségben

Szívinfarktust követően a kezdeti szívizomsejt veszteség progresszív balkamra hipertrófiához vezet. A túlélő szívizomsejtek hipertrofizálnak, átmérőjük és hosszuk megnő. A szívek gravimetriás vizsgálata során szignifikánsan nőtt az ISO-kezelt patkányok szívtömege ($p < 0.05$), emelkedett a kamratömeg testtömegre ($p < 0.01$) és tibia hossza normalizált érték is ($p < 0.001$). L-2286 kezelés azonban megakadályozta ezen paraméterek kedvezőtlen változását. Ezen felül az ISO-indukálta testsúly növekedés, mely az oedema jele lehet, szintén csökkent PARP-gátló kezelés hatására (2. táblázat).

	Kontroll	ISO	ISO+L-2286
BW (g)	403 ± 53.7	431.3 ± 28.6	$397.2 \pm 22.3^{**}$
VW (g)	$1.02 \pm 0.078^{*}$	1.132 ± 0.123	$0.977 \pm 0.074^{***}$
VW/BW (g/kg)	$2.51 \pm 0.14^{**}$	2.62 ± 0.19	$2.53 \pm 0.15^{*}$
VW/TL (g/mm)	$0.022 \pm 0.001^{***}$	0.025 ± 0.0025	$0.023 \pm 0.0013^{***}$

2. táblázat. PARP gátlás javítja a gravimetriás paramétereket ISO-indukálta szívelégtelenségben. A gravimetria részleteit illetően utalunk a Módszerek fejezetre. BW: testtömeg, VW: kamratömeg, TL: jobb tibia hossza, VW/BW: kamratömeg/testtömeg, VW/TL: kamratömeg/tibiahossz, ISO: posztinfarktusos állatok, 8 héttel az ISO alkalmazása után; ISO+L-2286: L-2286 kezelt posztinfarktusos állatok. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ (vs. ISO csoport).

5.2.2. L-2286 mérsékli a posztinfarktusos szívelégtelenség során kialakuló EKG eltéréseket

Az R hullám amplitúdójának csökkenése (0.18 ± 0.02 mV vs. 0.59 ± 0.03 mV, $p < 0.01$ vs. Kontroll) mellett J-pont depresszió (-0.04 ± 0.04 mV vs. 0.12 ± 0.01 mV) volt megfigyelhető az ISO csoport állatairól készült EKG-kon. Ezen elektrokardiographiás

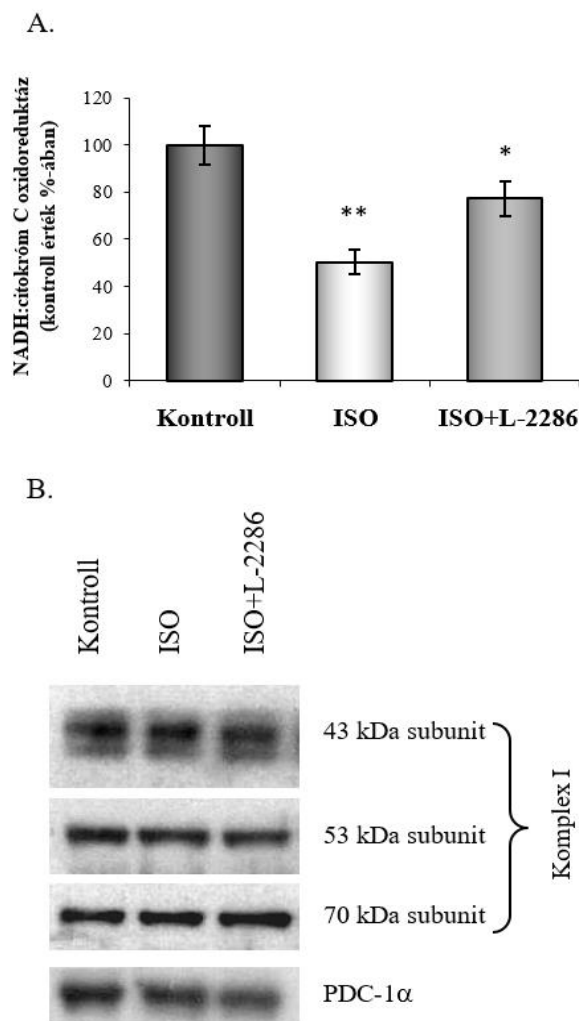
változások szignifikánsan javultak (R hullám amplitúdó 0.4 ± 0.03 mV, J-pont 0.05 ± 0.02 mV, $p < 0.05$ vs. ISO) L-2286 kezelés hatására.

5.2.3. L-2286 kezelés csökkenti a plazma BNP szintet posztinfarktusos patkányokban

A BNP koncentráció arányos a szívelégtelenség súlyosságával [2]. A plazmában mérhető BNP mennyisége jelentősen emelkedett az ISO csoportban (3.5 ± 0.22 ng/ml) a Kontroll csoporthoz képest (2.2 ± 0.18 ng/ml, $p < 0.01$). PARP-gátló kezelés (L-2286) mellett szignifikánsan alacsonyabb a plazma BNP szint (2.56 ± 0.16 ng/ml, $p < 0.05$ vs. ISO), mely a szívelégtelenség súlyosságának mérséklődésére utal.

5.2.4. L-2286 megakadályozza a légzési lánc funkciójának csökkenését posztinfarktusos szívelégtelenség modellben

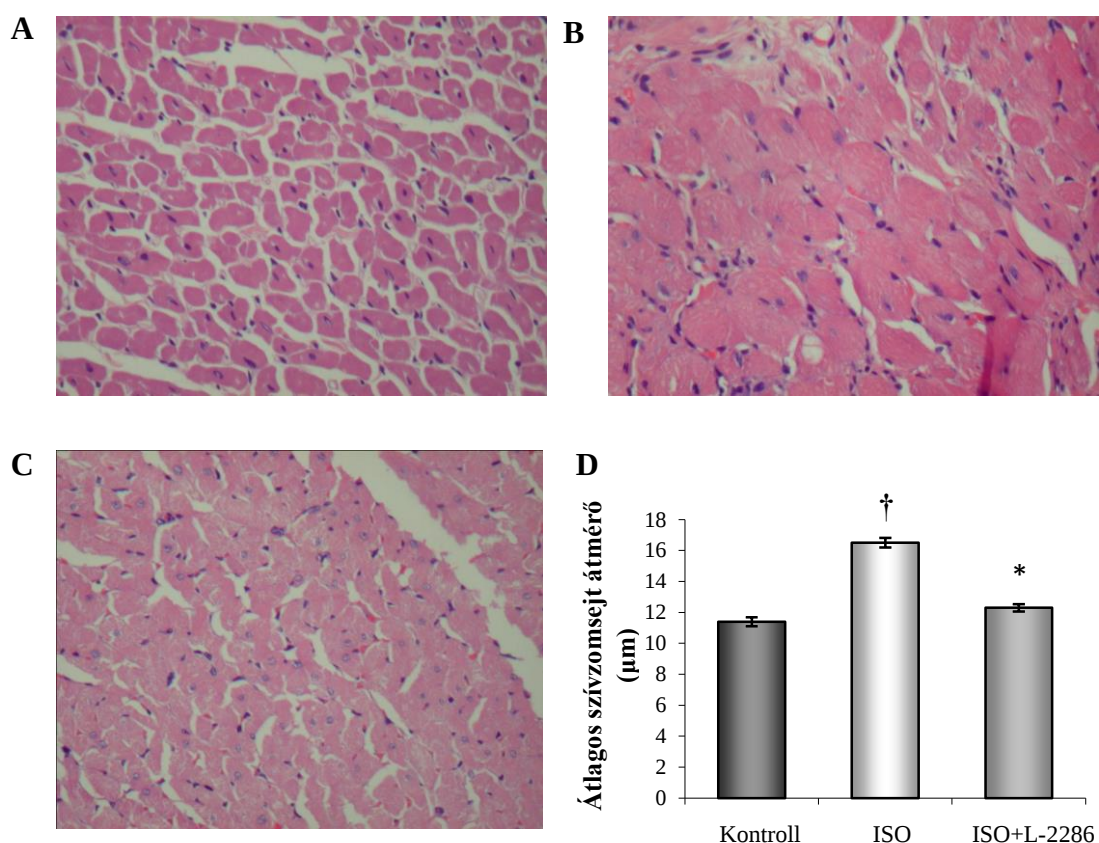
A bal kamrai remodelling megváltozott mitokondriális energia metabolizmussal jár együtt. Posztinfarktusos szívelégtelenség modellünkben jelentősen csökkent a légzési lánc funkciója, melyet a NADH:citokróm c oxidoreduktáz aktivitással (Komplex I-III) határoztuk meg ($p < 0.01$ vs. Kontroll) (8. ábra A). Ezzel szemben az L-2286 kezelésben is részesült állatok mitokondriumaiból izolált légzési komplexek aktivitása szignifikánsan ($p < 0.05$ vs. ISO) jobb volt a kezelésben nem részesülő szívelégtelen állatokéhoz viszonyítva. Fontos megjegyezni, hogy a mitokondriális metabolizmusban szerepet játszó fehérjék mennyisége, így a - NADH dehidrogenáz (Komplex I) 43, 53, 70 alegységei és a piruvát dehidrogenáz komplex-1 α (PDC-1 α) mennyisége nem mutatott érdemi különbséget a különböző csoportok között. Ezért a megfigyelt aktivitásbeli változások elsősorban a poszttranszlációs oxidatív módosulásoknak tulajdonítható (8. ábra B).



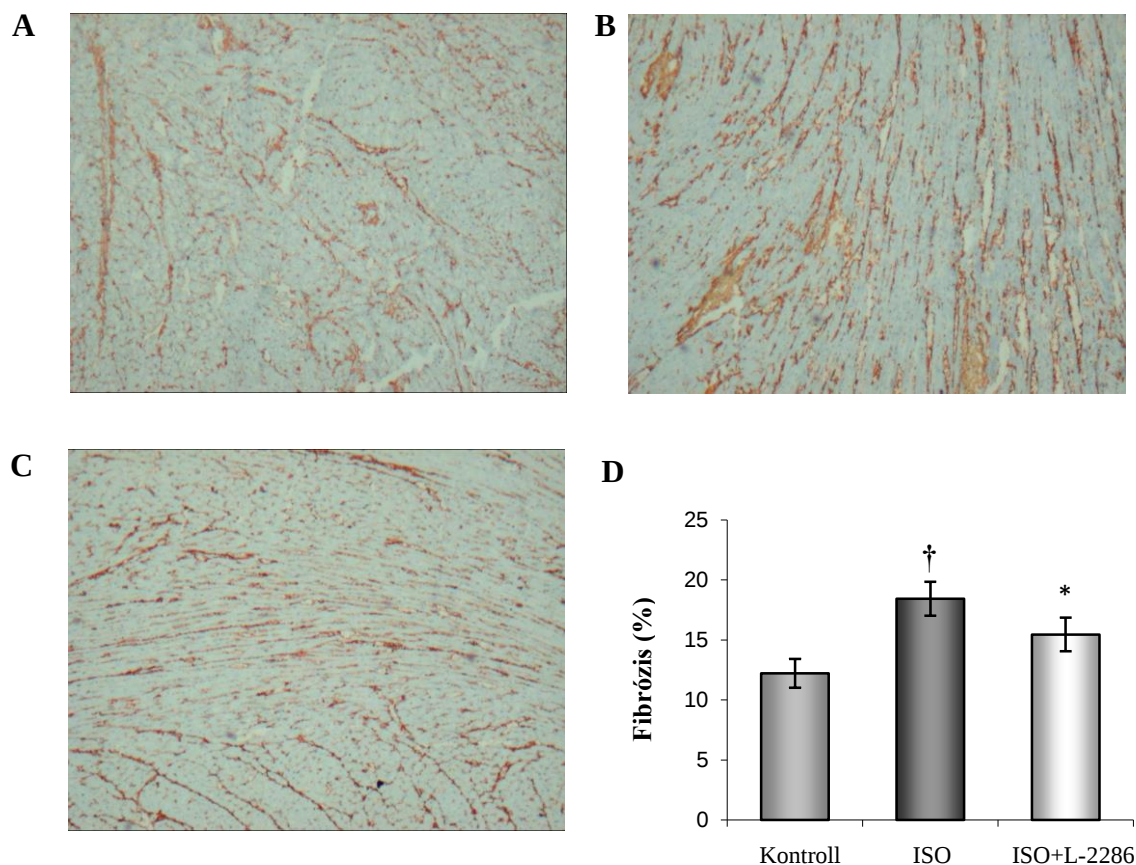
8. ábra. L-2286 javította posztinfarktusos szívelégtelenségben a légzési lánc fehérjéinek aktivitását.
A. NADH:citokróom c oxidoreduktáz aktivitása izolált mitokondriumokban. ISO: 8 héttel az izoproterenol kezelés után; ISO+L-2286: L-2286-al kezelt állatok 8 héttel az ISO adását követően. Az adatok a kontroll százalékában kerültek megadásra (átlag±SEM), * $p < 0.05$ (vs. ISO csoport), ** $p < 0.01$ (vs. Kontroll csoport).
B. A mitokondriális fehérjék (NADH dehidrogenáz komplex (Komplex I) - 43, 53, 70 kDa alegység és a piruvát dehidrogenáz komplex-1α) expressziójának vizsgálata szívelégtelen patkányokban (n=5). A Western blot részletes leírása a Módszerek fejezetben található. Reprezentatív immunoblottokat mutat az ábra. PDC-1α: piruvát dehidrogenáz komplex-1α; ISO: 8 héttel az izoproterenol kezelés után; ISO+L-2286: L-2286-al kezelt állatok 8 héttel az ISO adását követően.

5.2.5. L-2286 csökkenti a szívizomsejt hipertrófia és az intersticiális fibrózis mértékét ISO-indukálta szívelégtelenségben

Szívelégtelen patkányok szívének szövettani feldolgozása során jelentős fokú szívizomsejt hipertrófia volt észlelhető a kontroll egészséges állatokéhoz viszonyítva ($p < 0.001$ vs. Kontroll). Emellett a kollagén III intersticiális depozíciójának mértéke is jelentősen emelkedett $12.2 \pm 1.2\%$ -ról (Kontroll) $18.4 \pm 1.4\%$ -ra (ISO) ($p < 0.001$ vs. Kontroll). L-2286 kezelésben részesülő szívelégtelen állatokban (ISO+L-2286) mind az átlagos szívizomsejt átmérő ($p < 0.01$ vs. ISO), mind az intersticiális fibrózis mértéke (kollagén III lerakódás $15.4 \pm 1.4\%$) ($p < 0.01$ vs. ISO) kisebb volt a kezeletlen állatok megfelelő értékeinél (9. és 10. ábra).



9. ábra. L-2286 csökkenti az izoproterenol kiváltotta szívizomsejt hipertrófiát. Kontroll (A), ISO kezelt (B), valamint ISO+L-2286 kezelt (C) állatok szívéből származó metszeteket hematoxin-eozinnal festettük és az átlagos szívizomsejt átmérőket meghatároztuk (D). Részletes metodikai leírás a Módszerek fejezetben látható. ISO: 8 héttel az izoproterenol kezelés után; ISO+L-2286: L-2286-al kezelt állatok 8 héttel az ISO adását követően. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, * $p < 0.01$ (vs. ISO csoport), † $p < 0.001$ (vs. Kontroll csoport).

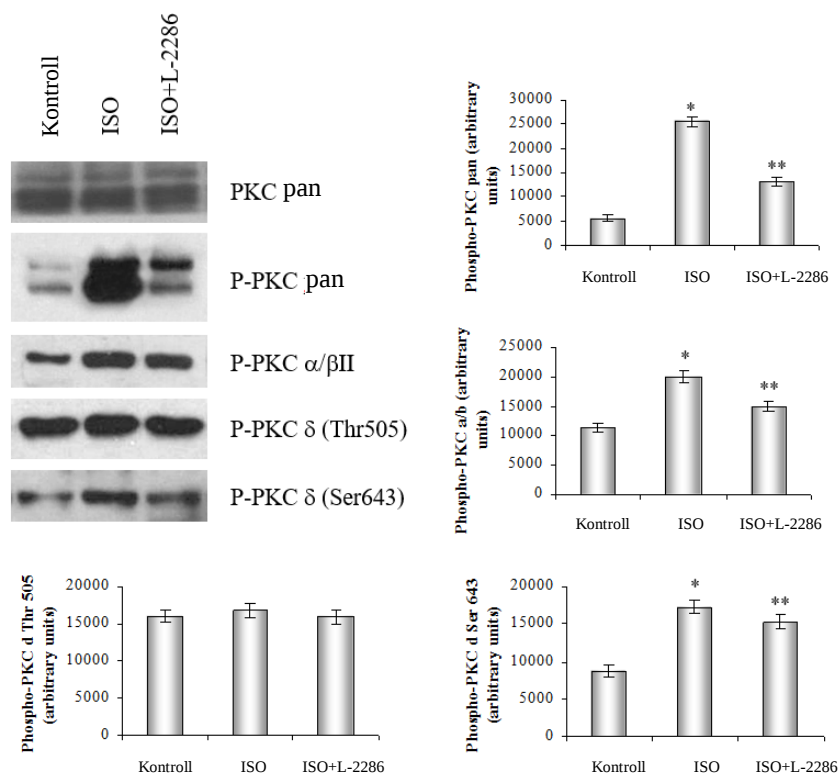


10. ábra. L-2286 kezelés mérsékli az ISO-indukálta intersticiális kollagén lerakódás mértékét. Kontroll (A), ISO kezelt (B), valamint ISO+L-2286 kezelt (C) állatok szívéből származó metszeteket kollagén III ellenes antitesttel kezeltük. Reprezentatív metszetek, illetve denzitometriás meghatározás (D) látható az ábrán. Immunohisztokémia részletes leírása a Módszerek fejezetben látható. ISO: 8 héttel az izoproterenol kezelés után; ISO+L-2286: L-2286-al kezelt állatok 8 héttel az ISO adását követően. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg, * $p < 0.01$ (vs. ISO csoport), $^{\dagger}p < 0.001$ (vs. Kontroll csoport).

5.2.6. L-2286 kezelés hatása a PKC izoenzimek aktivitására posztinfarktusos szívelégtelenségben

A protein kináz C jelátviteli molekula össz (pan) foszforilációs szintje alacsony volt a kontroll állatokban, azonban az ISO adása által kiváltott infarktus után 8 héttel a foszforiláció mértéke jelentősen megemelkedett (* $p < 0.001$ vs. Kontroll csoport) anélkül, hogy a PKC expressziója (11. ábra) változást mutatott volna. A PKC izoformok közül elsősorban a PKC α/β II és PKC δ (Ser⁶⁴³) tűnt felelősnek a szívelégtelenség során a pan PKC-ban mutatkozó foszforiláltsági eltérésekért (11. ábra). Mindezen változások (pan PKC, PKC α/β II és PKC δ (Ser⁶⁴³) emelkedett foszforiláció) jelentősen mérséklődtek

PARP-gátló kezelés hatására. A PKC δ (Thr⁵⁰⁵) foszforilációja nem mutatott változást a különböző csoportokhoz tartozó állatokban (11. ábra).



11. ábra. L-2286 kezelés hatása a különböző PKC izoenzimek aktivitására krónikus szívelégtelenségben. Pan PKC, PKC α/β , PKC δ (Thr505) és PKC δ (Ser643) foszforiláció változása Western blot segítségével meghatározva (n=5). ISO: 8 héttel az izoproterenol kezelés után; ISO+L-2286: L-2286-al kezelt állatok 8 héttel az ISO adását követően. Reprezentatív immunoblottokat mutat az ábra. *p<0.001 (vs. Kontroll csoport), **p<0.001 (vs. ISO csoport).

5.2.7. PARP-gátlás és ACE-gátlás hatása a gravimetriás paraméterekre ISO-indukálta szívelégtelenségben

Posztinfarktusos szívelégtelenség modellben 12 héttel az infarktus után végzett gravimetriás mérések azt mutatták, hogy a szív tömege jelentősen megnőtt (p<0.05), emellett a szívtömeg testsúlyra való normalizálása (p<0.01) és a tibia hossza való normalizálása során is jelentősen magasabb (p<0.05) értékeket kaptunk a kontroll csoporthoz viszonyítva. Mind az L-2286 (ISO+L), mind az enalapril (ISO+E) jelentősen csökkentette a balkamra hipertrofiára jellemző indexeket [142] (3. táblázat).

	Kontroll	ISO	ISO+L	ISO+E
BW (g)	378.75±11.09	441±9.81 ^a	399±9.762 ^b	397.5±11.87 ^b
WV (g)	0.90±0.012	1.15 ±0.019 ^a	0.95±0.029 ^b	0.96±0.019 ^b
WV/BW (mg/g)	2.31 ±0.16	2.79 ±0.27 ^c	2.35±0.21 ^d	2.37±0.23 ^d
WV/TL (mg/mm)	20.68 ±1.12	26.64 ±1.35 ^c	21.52±1.19 ^b	21.60±1.14 ^b
Plazma BNP (ng/ml)	2.23±0.88	2.85±0.041 ^c	2.56±0.042 ^b	2.56±0.055 ^b

3. táblázat. Az L-2286 és az enalapril hatása a gravimetriás paraméterekre és a plazma BNP szintjére posztinfarktusos szívelégtelenségben. 12 héttel az izoproterenol adásával kiváltott szívinfarktus után (n=8). BW: testtömeg, WV: kamratömeg, TL: jobb tibia hossza, WV/BW: kamratömeg/testtömeg, WV/TL: kamratömeg/tibiahossz. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ISO: patkányok 12 héttel az ISO alkalmazását követően; ISO+L: L-2286-al kezelt állatok, héttel az ISO alkalmazását követően ISO+E: enalapril-al kezelt állatok héttel az ISO alkalmazását követően. ^ap<0.05 (vs. Kontroll csoport), ^bp<0.05 (vs. ISO), ^cp<0.01 (vs. Kontroll csoport), ^dp<0.01 (vs. ISO csoport).

5.2.8. Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a plazma BNP szintre ISO-indukálta szívelégtelenség modellben

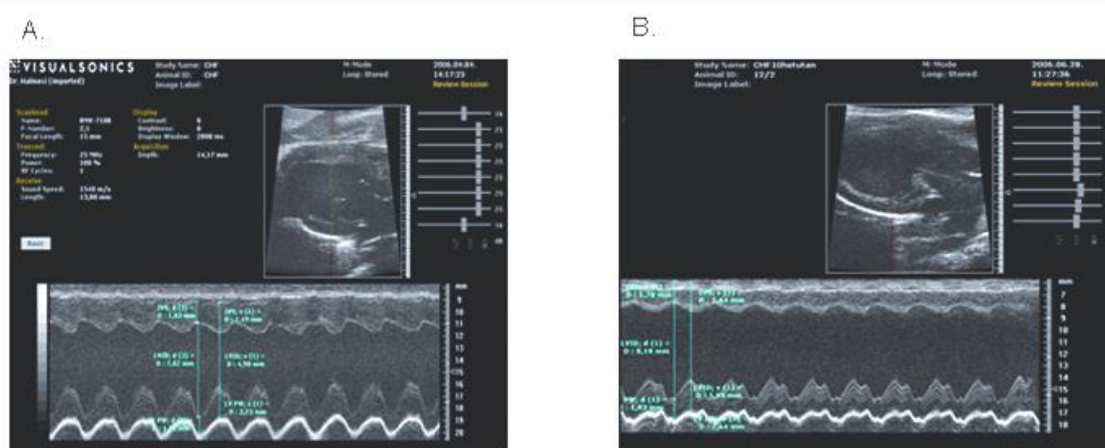
Posztinfarktusos szívelégtelenség modellben, 12 héttel az ISO alkalmazását követően, a plazma BNP szintje szignifikánsan emelkedett az ISO csoportban a Kontroll csoporthoz képest (p<0.01). Eredményeinkben észlelt nátriuretikus peptid szint emelkedés mértéke ugyan elmarad az emberi szívelégtelenség esetén látott emelkedéstől, azonban más munkacsoportok eredményei is azt mutatják, hogy rágcsálókban indukált szívelégtelenség modellekben jóval kisebb nátriuretikus peptid emelkedés észlelhető [143, 144]. Mind az ACE, mind a PARP-gátlás szignifikánsan csökkentette ezt az emelkedést (p<0.05 vs. ISO), amely arra utal, hogy mindkettő hatékonyan mérsékli a szívelégtelenség súlyosságát (3. táblázat).

5.2.9. Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a szív struktúrájára és a szisztolés balkamra funkcióra

Posztinfarktusos szívelégtelenség modellünkben a 12 hetes kezelést követően, a szisztolés balkamra funkciót jelző paraméterek (EF és FS) jelentősen csökkentek az ISO csoportban az egészséges állatokhoz képest ($p < 0.01$ vs. Kontroll csoport). Ezen kedvezőtlen változások azonban L-2286 kezeléssel jelentősen mérséklődtek (EF és FS; $p < 0.01$ vs ISO csoport). Az ACE-gátló enalapril védő hatása a balkamra funkció csökkenésével szemben szintén szignifikáns volt, azonban ez a védő hatás jelentősen elmaradt ($p < 0.05$ vs. ISO+L) az L-2286 adásával elért védelemtől.

A LVEDV minden infarktust elszenvedett csoportban (ISO, ISO+L, ISO+E) szignifikáns módon megemelkedett ($p < 0.01$ vs. Kontroll). Ezt a változást azonban egyik kezelés sem befolyásolta érdemben.

Az ISO csoportban mindezek mellett jelentős koncentrikus balkamra funkció alakult ki, melyet megnövekedett septális és PW vastagságok jellemeznek ($p < 0.05$ vs. Kontroll). Mind az ACE-gátlás, mind a PARP-gátlás mérsékelte a bal kamra hipertrófia mértékét ($p < 0.05$ vs. ISO) (4. táblázat, 12. ábra).



12. ábra. Kontroll (A, n=8) és ISO kezelt (B, n=8) patkányok echocardiographiás vizsgálatából származó reprezentatív képek. IVS (d), (s): septum vastagsága diasztolében és szisztolében. LVID (d): bal kamrai végdiasztolés átmérő, LVID (s): balkamrai végszisztolés átmérő. LV PW (d), (s): hátsó fal vastagsága diasztolében és szisztolében. ISO: 12 héttel az ISO kezelés után.

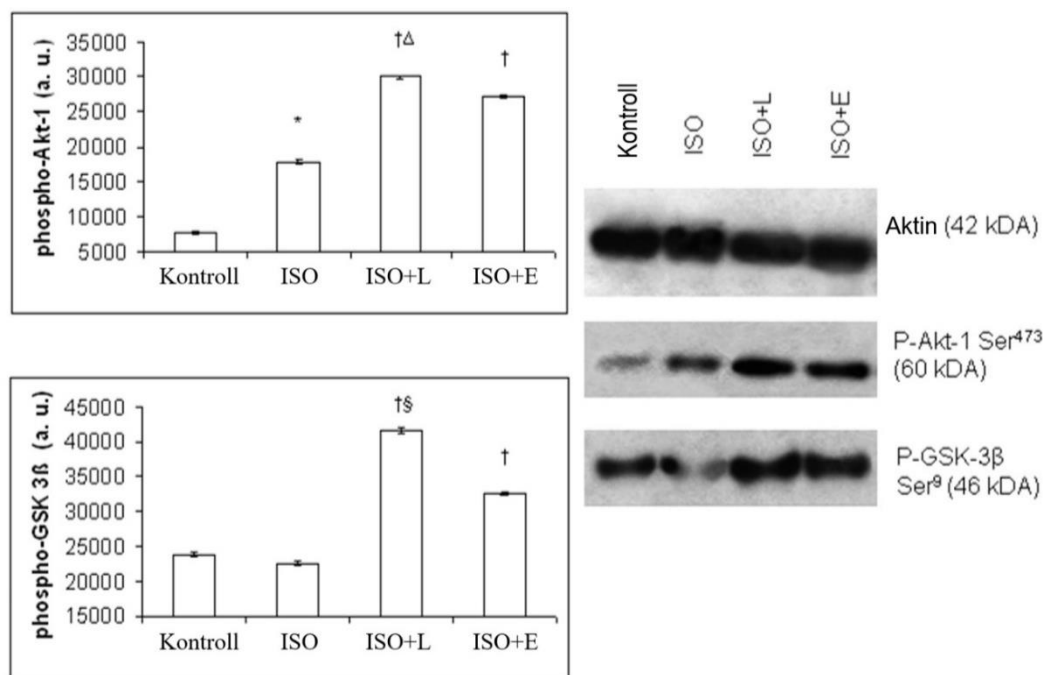
	Kontroll	ISO	ISO+L	ISO+E
EF (%)	68.9±1.8	53.01±0.99 ^c	70.41±2.56 ^d	60.08±1.63 ^{b,e}
FS	40.05±1.55	28.37±0.62 ^c	42.35±1.81 ^d	33±1.33 ^{b,e}
LVEDV	283.13±6.73	363.46±6.54 ^c	365.6±13.47 ^b	385.31±7.31 ^b
LVESV	86.23±6.23	164.85±7.85 ^c	98.59±4 ^d	157.14±4.89 ^b
Septum (mm)	1.75±0.041	1.95±0.067 ^a	1.62±0.062 ^b	1.63±0.061 ^b
PW (mm)	1.76±0.039	1.93±0.068 ^a	1.68±0.072 ^b	1.59±0.041 ^b

4. táblázat. L-2286 és enalapril kezelés jelentősen javítja az echocardiographiás paramétereket ISO kezelés által kiváltott szívelégtelenségben. Az echocardiographiás mérés részletei a Módszerek fejezetben kerülnek ismertetésre. EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális roströvidülés, LVEDV: bal kamrai végdiasztolés térfogat, LVESV: bal kamrai végszisztolés térfogat, Septum: septum vastagsága, PW: hátsó fal vastagsága. ISO: patkányok 12 héttel az ISO kezelés után; ISO+L: L-2286 kezelt patkányok 12 héttel az ISO kezelés után; ISO+E: enalapril kezelt patkányok 12 héttel az ISO kezelés után. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^ap<0.05 (vs. Kontroll csoport), ^bp<0.05 (vs. ISO), ^cp<0.01 (vs. Kontroll csoport), ^dp<0.01 (vs. ISO csoport), ^ep<0.05 (vs ISO+L csoport)

5.2.10. Az L-2286 és enalapril kezelés hatása az Akt-1^{Ser473} és GSK-3β^{Ser9} foszforiláció mértékére posztinfarktusos szívelégtelenség modellben

A kezeletlen kontroll csoportban az Akt-1^{Ser473} csak igen alacsony foszforilációt mutatott. Az ISO csoportban azonban a foszforiláció mértéke jelentősen magasabb volt (p<0.01 vs Kontroll). Mindkét kezelt posztinfarktusos csoportban (ISO+L és ISO+E) tovább emelkedett az Akt-1^{Ser473} foszforiláció foka (p<0.01 vs. ISO csoport). A két kezelt csoport közül azonban a PARP-gátlóval kezeltben jelentősebb emelkedést (p<0.05 vs ISO+E) észleltünk, mint az ACE-gátló enalaprillal kezelt csoportban. Az Akt-1, melyet a Ser473 pozícióban történt foszforiláció aktivál, a GSK-3β egyik legjelentősebb upstream kináza, melyet a Ser9 pozícióban foszforilálva inaktivál (13. ábra).

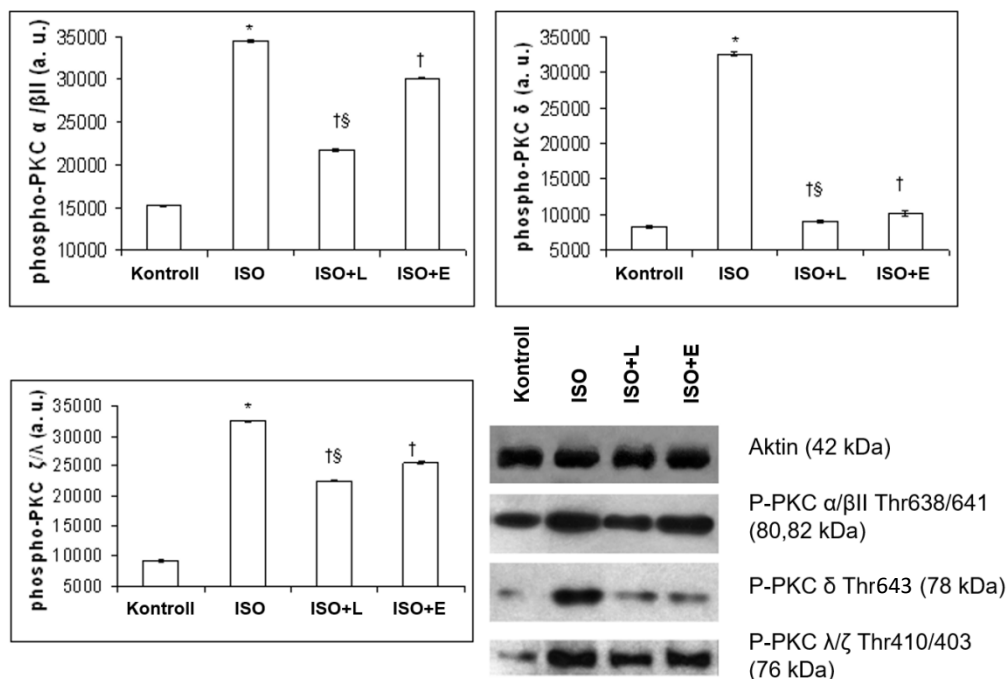
A GSK-3β^{Ser9} foszforiláció a Kontroll és az ISO-kezelt csoportban volt a legalacsonyabb (NS Kontroll vs ISO csoport). Mind az L-2286 (ISO+L), mind az enalapril (ISO+E) kezelés jelentősen növelte a GSK-3β^{Ser9} foszforiláció mértékét (p<0.01 vs Kontroll és ISO csoportok), azonban a legjelentősebb foszforilációt és ezáltal legjelentősebb GSK-3β gátlást az L-2286 kódjelű PARP-gátlóval sikerült elérni (p<0.01 vs. ISO+E csoport) (13. ábra).



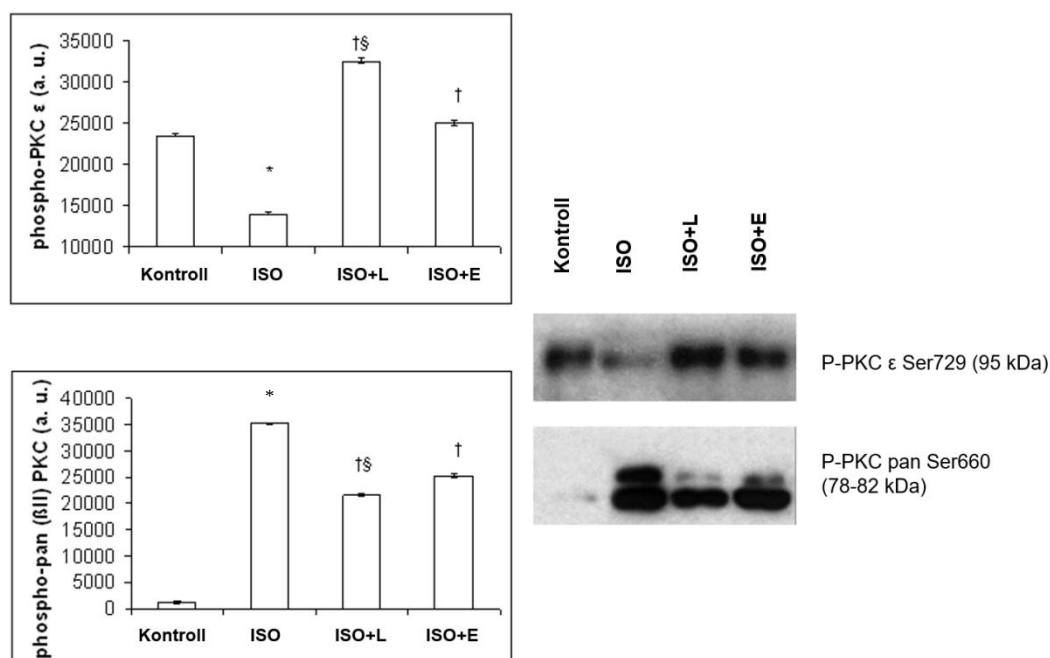
13. ábra. L-2286 és enalapril hatása az Akt-1 és GSK-3β jelátviteli faktorok foszforilációjára. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=4). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. *p<0.01 (vs. Kontroll), §p<0.05 (vs. Kontroll). †p<0.01 (vs. ISO csoport). Δp<0.05 (vs. ISO+E csoport). §p<0.01 (vs. ISO+E csoport). ISO: állatok 12 héttel az ISO injekció után, ISO+L: ISO injekciót követően 12 hétig L-2286-vel kezelt állatok, ISO+E: ISO injekciót követően 12 hétig enalaprillal kezelt állatok.

5.2.11. Az L-2286 és enalapril kezelés hatása a PKC izoformák foszforiláltságára ISO-indukálta szívelégtelenségben

A posztinfarktusos szívelégtelenség modellünkben, panPKC $\beta\text{II}^{\text{Ser660}}$ foszforiláció mértéke jelentősen emelkedett az ISO csoportban ($p<0.01$ vs. Kontroll) a kontroll állatokhoz képest. Mindkét kezelés (L-2286 és enalapril) jelentősen mérsékelte ezt a növekedést ($p<0.01$ vs. ISO csoport). A legalacsonyabb foszforilációs szintet az ISO+L csoportban észleltük ($p<0.01$ vs. ISO+E) (14. ábra). Hasonló eredményt észleltünk a PKC $\alpha/\beta\text{II}^{\text{Thr638/641}}$, PKC δ^{Thr643} és PKC $\zeta/\lambda^{\text{Thr410/403}}$ izoformák esetében is (14. ábra). A PKC ϵ^{Ser729} foszforiláció esetében azonban pontosan ellentétes változások voltak észlelhetők. A posztinfarktusos állatokban a PKC ϵ aktivitása jelentősen csökkent volt a kontroll állatokhoz képest ($p<0.01$ ISO vs. Kontroll). A kezelések (L-2286 és enalapril) jelentősen fokozták a PKC ϵ^{Ser729} foszforiláció mértékét ($p<0.01$ vs. ISO). A PARP-gátlás jelentősebb hatást gyakorolt erre a folyamatra, mint az ACE-gátlás ($p<0.01$ ISO+L vs. ISO+E) (15. ábra).



14. ábra. Az L-2286 és az enalapril kezelés hatása a PKC α/β , PKC δ és PKC ζ/λ izoformák foszforiláltságára. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=4). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. *p<0.01 (vs. Kontroll), †p<0.01 (vs. ISO csoport). §p<0.05 (vs. ISO+E csoport). ISO: állatok 12 héttel az ISO injekció után, ISO+L: ISO injekciót követően 12 hétig L-2286-val kezelt állatok, ISO+E: ISO injekciót követően 12 hétig enalaprilal kezelt állatok.



15. ábra. L-2286 és enalapril kezelés hatása a PKC ϵ és a panPKC foszforiláltságára. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=4). Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. *p<0.01 (vs. Kontroll), †p<0.01 (vs. ISO csoport). §p<0.05 (vs. ISO+E csoport). ISO: állatok 12 héttel az ISO injekció után, ISO+L: ISO injekciót követően 12 hétig L-2286-val kezelt állatok, ISO+E: ISO injekciót követően 12 hétig enalaprilal kezelt állatok.

5.2.12. A PARP-gátló kezelés hatása hipertenzió indukálta szívelégtelenségben a gravimetriás paraméterekre

A krónikusan fennálló hipertenzió által indukált szívelégtelenség vizsgálatakor a gravimetriás paraméterek meghatározásakor azt találtuk, hogy a vizsgálat elején a normotenzív állatok testtömege jelentősen magasabb volt, mint az SHR állatoké ($p < 0.05$, 30 hetes állatok) (5. táblázat). A vizsgálat végeztével hasonló eredményeket észleltünk ($p < 0.05$ Kontroll vs. SHR csoportok, 76 hetes állatok). PARP-gátló kezelés mellett hipertenzív állatokban a testtömeg valamelyest magasabb volt, de a különbség nem érte el a szignifikáns mértéket. A vizsgálat végén, 76 hetes életkorban a szívtömeg (HW) és a kamratömeg (VW) jelentősen magasabb volt az SHR csoportokban, mint a normotenzív csoportban ($p < 0.01$ SHR-C vs. Kontroll, $p < 0.05$ SHR-L vs. Kontroll) (5. táblázat).

	Kontroll	SHR-C	SHR-L
BW^{30w} (g)	387.5±4.78	345.25±8.71 ^b	334.44±8.67 ^b
BW^{76w} (g)	408.75±6.14	356.8±5.61 ^b	367.67±9.7 ^b
HW^{76w} (g)	1.22±0.04	1.61±0.05 ^a	1.41±0.03 ^{b,c}
VW^{76w} (g)	1.11±0.03	1.43±0.04 ^a	1.29±0.03 ^{b,c}
VW/BW^{76w} (g/g)	2.71±0.09	3.99±0.06 ^a	3.52±0.09 ^{a,c}
VW/TL^{76w} (mg/mm)	23.53±0.77	31.16±0.68 ^a	28.26±0.65 ^{a,c}
Tüdő nedves/száraz tömeg^{76w} (g/g)	4.65±0.1	5.25±0.07 ^a	5.03±0.04 ^{a,c}
plazma BNP^{76w} (ng/ml)	2.03±0.06	2.71±0.07 ^a	2.21±0.06 ^{a,d}

5. táblázat. L-2286 kezelés hatása a gravimetriás paraméterekre és a plazma BNP szintre normotenzív és szívelégtelen hipertenzív patkányokban. Kontroll: életkor egyezett normotenzív CFY patkányok, $n=7$, SHR-C: 76 hetes spontán hipertenzív patkányok (SHR), $n=7$, SHR-L: 76 hetes SHR állatok 46 hetes L-2286 kezeléssel, $n=26$. BW^{30w, 76w}: 30 és 76 hetes patkányok testtömege, HW^{76w}: 76 hetes patkányok szívtömege, VW^{76w}: 76 hetes patkányok kamratömege, TL^{76w}: 76 hetes állatok jobb oldali tibia hossza, p-BNP^{76w}: plazma BNP szint a vizsgálat végén. . Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^a<0.01 (vs. Kontroll csoport), ^b<0.05 (vs. Kontroll csoport), ^c<0.05 (vs. SHR-C csoport), ^d<0.01 (vs. SHR-C csoport).

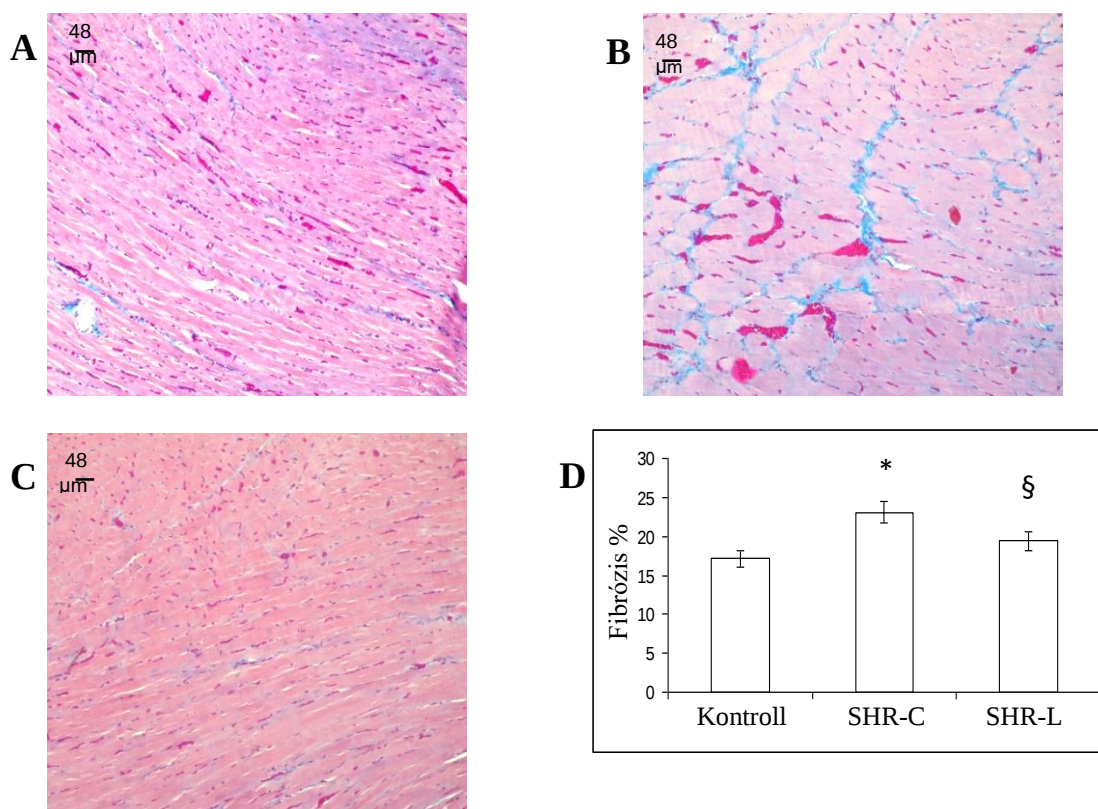
Mindkét érték csökkent a kezelt SHR állatokban a kezeletlenekhez viszonyítva ($p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C). A kamratömegnek a testtömegre (VW/BW), valamint tibiahosszra (VW/TL) normalizálásakor is hasonló eredményeket kaptunk ($p < 0.01$ SHR-C vs. Kontroll, $p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C). A nedves/száraz tüdő arány mindkét SHR csoportban nőtt a normotenzív állatokhoz képest ($p < 0.01$ SHR-C és SHR-L vs. Kontroll). L-2286 kezelés csökkentette ennek az indexnek az értékét a kezeletlen állatokéhoz képest ($p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C) (5. táblázat). Ezen paraméterek az SHR csoportokban nemcsak a hipertrófia meglétét, hanem a szívelégtelenség kialakulását is igazolják. PARP-gátló kezelés L-2286-al azonban mindezen kedvezőtlen eltéréseket jelentős módon képes volt csökkenteni [145]. Az állatok leölése során aztán az SHR-C csoportban észlelt pangásos szervek, hepatomegália, ascites és pleurális folyadékgyülem [145] szintén megerősítette a szívelégtelenség meglétét.

5.2.13. L-2286 kezelés hatása hipertenzió indukálta szívelégtelenség modellben a plazma BNP szintre.

Hipertenzív szívelégtelenség modellünkben a plazmában mérhető BNP szintje jelentősen magasabb volt az SHR csoportokban ($p < 0.01$ SHR vs. Kontroll csoport), mint a normotenzív csoportban. Ez az emelkedés azonban L-2286 kezelés mellett jóval kisebb volt, mint kezelés nélkül ($p < 0.01$ SHR-L vs. SHR-C csoport) (5. táblázat).

5.2.14. L-2286 kezelés hatása az intersticiális kollagén lerakódás mértékére hipertenzió indukálta szívelégtelenségben

Hipertenzív szívelégtelenség modellünkben, a legmagasabb fokú intersticiális kollagén lerakódást a kezeletlen SHR csoportban ($p < 0.01$ SHR-C vs. Kontroll) észleltük. L-2286 kezelés azonban jelentősen javította a fibrózis fokát a hipertenzív állatokban ($p < 0.05$ vs. SHR-C csoport) (16. ábra).



16. ábra. L-2286 kezelés hatása az intersticiális kollagén depozícióra (%). Reprezentatív hisztológiai metszetek Masson's trikróm módszerrel festve (n=4). Nagyítás: 20x. A képeken látható vonalas mérték 48 μm -t jelöl. Kontroll (A): normotenzív koregyeztetett kontroll patkányok. SHR-C (B): 76 hetes spontán hipertenzív patkányok, SHR-L (C): 76 hetes spontán hipertenzív patkányok 46 hetes L-2286 kezelést követően. D: Metszetek denzitometriás értékelése. * $p < 0.01$ vs. Kontroll, § $p < 0.05$ vs. SHR-C csoport.

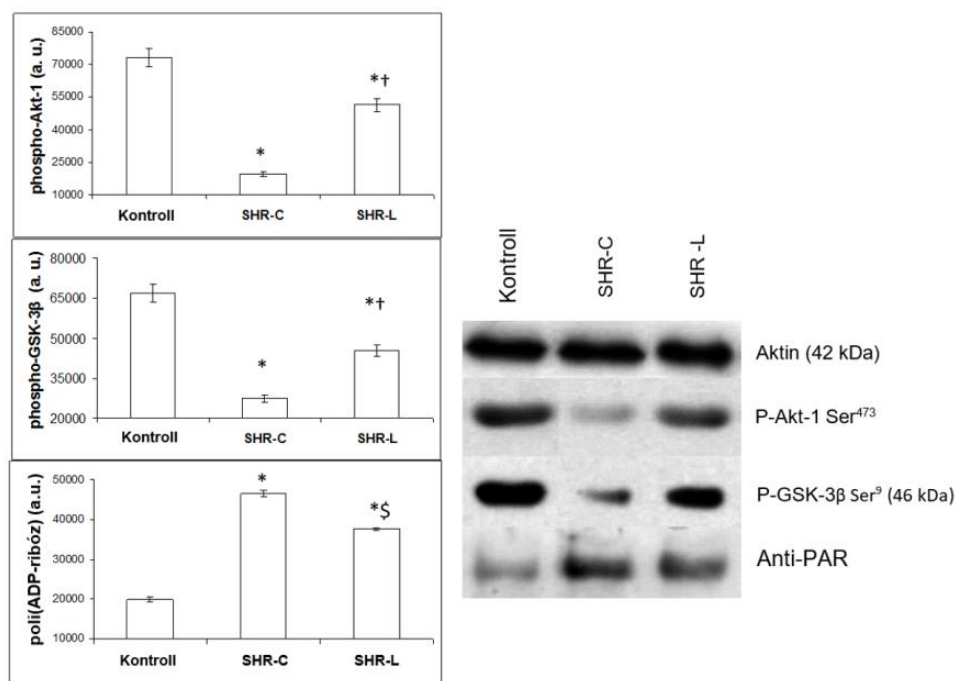
5.2.15. L-2286 hatása krónikus hipertenzió által kiváltott

szívelégtelenségben az Akt-1^{Ser473}/GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációra és az ADP-ribózilációra

Akt-1^{Ser473} idős normotenzív kezeletlen állatokban (Kontroll csoport) jelentős foszforilációt mutatott. A foszforiláltsági szint az SHR-C állatokban volt a legalacsonyabb ($p < 0.01$ vs. Kontroll csoport). L-2286 kezelés szignifikáns módon mérsékelte ezt a csökkenést ($p < 0.01$ vs. SHR-C csoport). A GSK-3 β downstream targetje az Akt-1-nek, ennek megfelelően a GSK-3 β ^{Ser9} foszforiláció is nagyon hasonló változásokat mutatott (17. ábra).

Az L-2286 in vivo hatékonyságát igazolandó, vizsgáltuk a minták poli(ADP-ribózil)ációját. A legalacsonyabb fokú PARilációt a normotenzív állatokban észleltük, a

legmagasabbat az SHR-C csoportban ($p < 0.01$ vs. Kontroll csoport). Az SHR-L csoportban az L-2286 kezelés hatására jelentősen mérséklődött a PARiláció ($p < 0.05$ vs. SHR-C csoport) (17. ábra).



17. ábra. Az L-2286 kezelés hatása a poli(ADP-ribóz) képződésére és az Akt-1^{Ser473}-GSK-3β^{Ser9} jelátviteli útra. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=4). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. Kontroll: életkor egyeztetett normotenzív kezeletlen patkányok. SHR-C: kezeletlen 76 hetes spontán hipertenzív patkányok, SHR-L: 76 hetes spontán hipertenzív patkányok 46 hétig tartó L-2286 kezeléssel. * $p < 0.01$ vs. Kontroll, † $p < 0.01$ vs. SHR-C, § $p < 0.05$ vs. SHR-C.

5.2.16. L-2286 hatása az echocardiographiás paraméterekre idős spontán hipertenzív patkányokban

30 hetes korban nem észleltünk lényegi különbséget a balkamrai szisztolés funkciót jelző paraméterekben (EF, FS) a normotenzív CFY (Kontroll) és hipertenzív (SHR) állatok között (EF (%): Kontroll^{30w}: 68.10±0.90 és SHR^{30w}: 68.33±1.75; FS (%): Kontroll^{30w}: 38.45±4.38 és SHR^{30w}: 39.10±3.33). Az állatok szívfrekvenciája nem különbözött lényegesen a csoportok között az altatás során (Kontroll: 269±18, SHR 272±15 – mindezek alacsonyabbak a normális szívfrekvenciánál az izoflurán miatt). Azonban a

balkamrai üregméretek és volumenek (LVESV és LVEDV), valamint a hátsó fal és a septum vastagsága, az RWT és a kalkulált balkamrai izomtömeg (balkamra hipertrófia jelei) már magasabbak voltak a hipertenzív állatokban (SHR) ($p < 0.05$ Kontroll vs SHR) (6. táblázat).

	Kontroll ^{30w}	SHR ^{30w}
EF (%)	68.1±0.9	68.33±1.75
FS (%)	38.45±4.38	39.1±3.33
LVEDV (ml)	278.55±15.78	339.84±14.65 ^a
LVESV (ml)	86.45±9.02	98.23±10.4 ^a
PW (mm)	1.6±0.07	2.11±0.09 ^a
Septum (mm)	1.48±0.06	1.83±0.08 ^a
RWT	0.4±0.05	0.51±0.02 ^a
LV tömeg (kalk. mg)	999.57±61.3	1250.58±78.78 ^a
LV tömeg/BW (mg/g)	2.59±0.9	3.69±0.06 ^a

6. táblázat. 30 hetes hím normotenzív Sprague-Dawley CFY (Kontroll, n=7) és 30 hetes hipertenzív (SHR, n=15) patkányok echocardiographiás paramétereit. EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális roströvidülés, LVEDV: bal kamrai végdiasztolés volumen, LVESV: bal kamrai végszisztolés volumen, Septum: septális falvastagság diasztolében, PW: hátsó fal vastagsága szisztolében, RWT: relatív falvastagság, LV tömeg (kalk.): balkamra kalkulált tömege – számított érték, LV tömeg: balkamra mért tömege, BW: testsúly. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^a $p < 0.05$ (vs. CFY csoport)

A vizsgálat végén (az állatok 76 hetes korában) ismét elvégeztük az echocardiographiás vizsgálatot. A mérés közben a különböző csoportokba tartozó állatok szívfrekvenciája ekkor sem különbözött egymástól érdemben (Kontroll: 266±19, SHR-C: 269±22, SHR-L: 261±25). Az L-2286 kezelés nem befolyásolta az SHR állatok vérnyomását sem (7. táblázat). A tartósan magas vérnyomás azonban jelentősen rontotta a szisztolés balkamra funkciót. A legalacsonyabb EF-et az SHR-C csoportban mértük ($p < 0.01$ vs. Kontroll és SHR-L), míg a kezelt SHR csoportban (SHR-L) a normotenzívhez hasonló értékeket észleltünk (EF (%): Kontroll^{76w}: 71.07±1.89, SHR-C^{76w}: 52.41±1.85, SHR-L^{76w}: 69.11±1.95, FS (%): Kontroll^{76w}: 41.9±1.71, SHR-C^{76w}: 28.08±1.23, SHR-L^{76w}: 40.25±1.64). Az LVIDd (bal kamrai végdiasztolés átmérő) és az LVIDs (bal kamrai végszisztolés átmérő) jelentősen megnőtt az SHR-C csoportban a többi csoporthoz viszonyítva ($p < 0.01$ vs. Kontroll és SHR-L). A legkisebb üregméretek a normotenzív

állatokban voltak mérhetőek, de a kezelt SHR csoportba (SHR-L) tartozó állatok balkamrai dimenziói sem különböztek ettől jelentősen (7. táblázat).

A balkamrai septum és hátsó fal (PW) vastagsága szintén jelentősen emelkedett az SHR csoportokban a normotenzív kontroll állatokhoz képest (PW: $p < 0.05$, septum: $p < 0.05$ vs. SHR-C, és $p < 0.01$ vs. SHR-L). A balkamrai falvastagságok a két SHR csoport között nem különböztek jelentősen. Az echocardiographiás paraméterek alapján kalkulált balkamrai tömeg szintén nőtt az SHR csoportokban ($p < 0.01$ vs. Kontroll) a normotenzív állatokéhoz képest. Hipertenzív állatok L-2286-al történt kezelése jelentősen csökkentette a balkamrai tömeget ($p < 0.01$ vs. SHR-C) a kezeletlen SHR csoporthoz képest. Hasonló változást észleltünk a gravimetriásan meghatározott balkamrai hipertrófia index (LV tömeg/testtömeg) esetében is. Végezetül az RWT (relatív falvastagság) az L-2286-al kezelt állatokban magasabb volt ($p < 0.05$ SHR-L vs SHR-C), mint a nem kezelt hipertenzív állatokban. Ez arra utal a többi paramétert is figyelembe véve, hogy a kezelt állatok még a kompenzált hipertrófia stádiumában vannak, míg a nem kezelték már a dilatációval együttjáró dekompenzált stádiumba kerültek [146](7. táblázat).

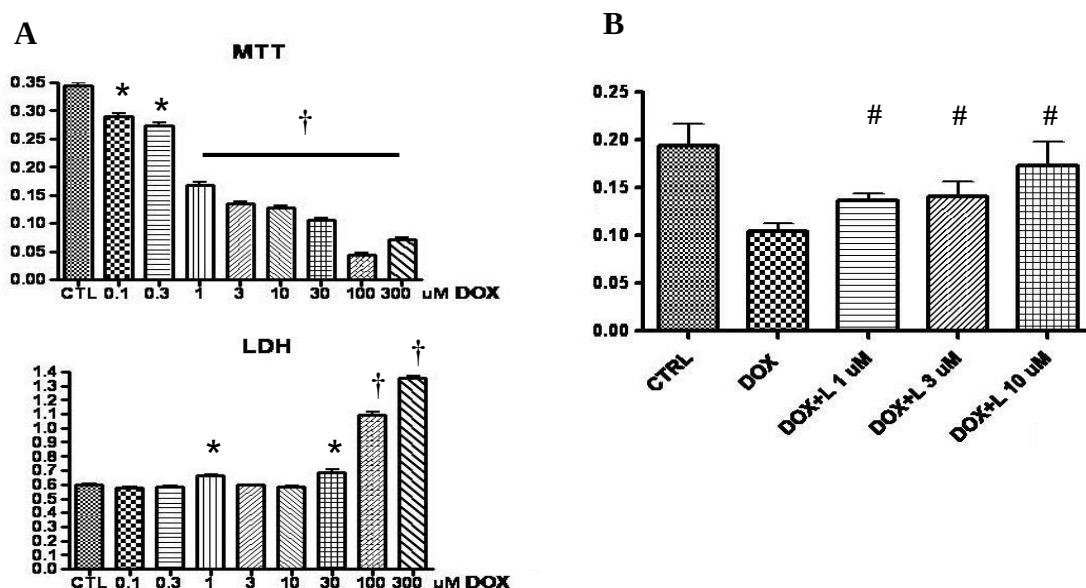
A vérnyomást ebben a vizsgálatunkban invazív módon határoztuk meg a kezelési periódus végén. Az SHR csoportokban észlelt jelentősen emelkedett vérnyomásértékek ($p < 0.01$ vs. Kontroll) nem változtak L-2286 kezelés hatására. (7. táblázat).

	Kontroll^{76w}	SHR-C^{76w}	SHR-L^{76w}
EF (%)	71.07±1.89	52.41±1.85 ^a	69.11±1.95 ^c
FS (%)	41.9±1.71	28.08±1.23 ^a	40.25±1.64 ^c
LVIDd (mm)	7.1±0.13	8.23±0.2 ^a	7.27±0.06 ^d
LVIDs (mm)	4.08±0.06	5.92±0.18 ^a	4.35±0.12 ^d
LVEDV (ml)	278.5±5.94	368.49±7.13 ^a	279.04±5.07 ^d
LVESV (ml)	86.03±11.37	175.41±12.29 ^a	86.18±6.58 ^d
PW (mm)	1.72±0.04	2.06±0.09 ^b	2.15±0.05 ^a
Septum (mm)	1.79±0.04	2.12±0.08 ^b	2.21±0.05 ^a
RWT	0.42±0.01	0.49±0.02 ^b	0.6±0.01 ^{a,c}
LV tömeg (mg)	1002.33±53.47	1438.12±97.36 ^a	1273.63±41.76 ^{a,c}
LV tömeg/BW (mg/g)	2.51±0.06	3.94±0.21 ^a	3.48±0.13 ^{a,c}
SBP^{76w} (Hgmm)	142±10	228±7 ^a	224±9 ^a
DBP^{76w} (Hgmm)	97±5	173±9 ^a	168±8 ^a
MBP^{76w} (Hgmm)	112±7	192±6 ^a	187±7 ^a

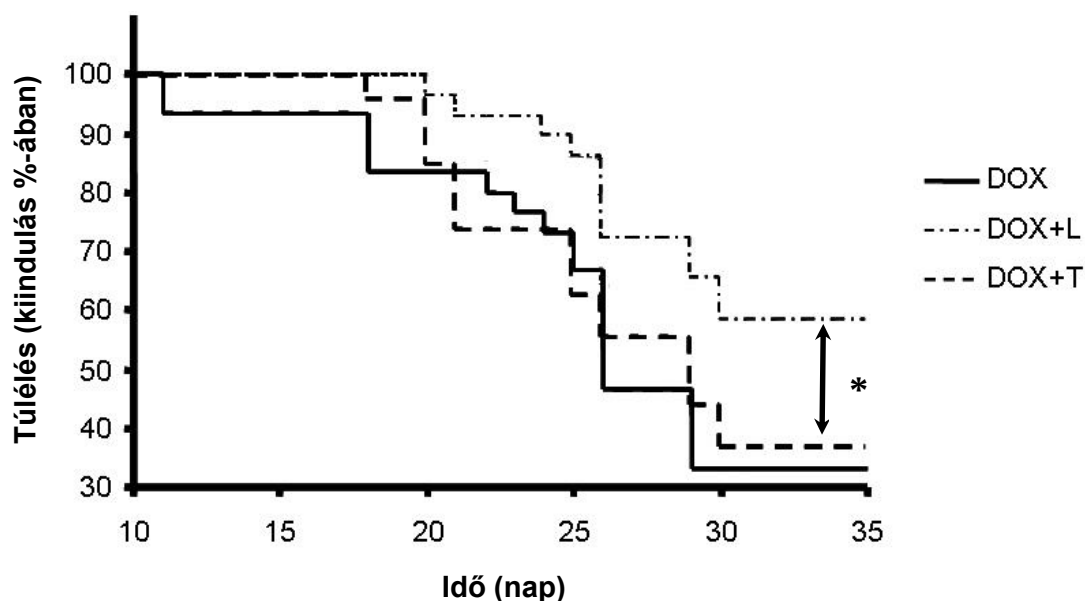
7. táblázat. L-2286 kezelés véd a krónikus hipertenzió által kiváltott kardiális eltérésekkel szemben spontán hipertenzív patkányokban (SHR). Kontroll^{76w}: normotenzív koregyeztetett kontroll patkányok (SD-CFY) (n=7), SHR-C^{76w}: 76 hetes kezeletlen SHR patkányok (n=7), SHR-L^{76w}: 76 hetes SHR patkányok, melyeket 46 hétig L-2286-al kezeltünk (n=26). EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális roströvidülés, LVIDd: bal kamrai végdiasztolés átmérő, LVIDs: bal kamrai végszisztolés átmérő, LVEDV: bal kamrai végdiasztolés volumen, LVESV: bal kamrai végszisztolés volumen, Septum: septális falvastagság diasztolében, PW: hátsó fal vastagsága szisztolében, RWT: relatív falvastagság, LV tömeg (uncorr): balkamra kalkulált tömege nem korrigált érték, LV tömeg: balkamra mért tömege, BW: testsúly. SBP, DBP, MBP: szisztolés, diasztolés és közép vérnyomás értékek (n=3). Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^ap<0.01 (vs. Kontroll csoport), ^bp<0.05 (vs Kontroll csoport), ^c<0.01 (vs. SHR-C csoport), ^d<0.05 (vs. SHR-C csoport).

5.2.17. A PARP-gátló hatású L-2286 véd a doxorubicin citotoxikus hatásaival szemben

Dóziskereső vizsgálatok során H9c2 kardiomiocitákat különböző koncentrációban (0.1-300 μ M) alkalmazott doxorubicinnel (DOX) inkubáltuk 24 óráig. Az MTT csökkenése már igen alacsony (0.1 μ M) DOX koncentráció mellett is jelentősnek bizonyult (18. ábra A). Jelentősen fokozott LDH kibocsátást azonban csak magasabb DOX koncentrációk esetén (≥ 100 μ M) észleltünk (18. ábra A). Alacsony koncentrációjú (0.1-30 μ M) DOX alkalmazása is károsítja a mitokondriális metabolizmust, azonban a sejtmembránok integritását (sejthalál markere) ebben a koncentrációban még nem volt képes befolyásolni. A PARP-gátló L-2286 védő hatással bírt az MTT assay-vel jellemzett mitokondriális oxidáció károsodásával szemben (18. ábra B).



18. ábra. Emelkedő koncentrációjú doxorubicin (DOX) hatása a sejt viabilitásra (MTT) és a laktát dehidrogenáz (LDH) kiáramlásra H9c2 sejtekben (A). Az L-2286 dózisfüggő (1-10 μ M) hatása a doxorubicin (DOX, 1 μ M) kiváltotta sejt viabilitás csökkenésre (MTT) (B). MTT koncentrációfüggő módon csökkent, az LDH kiáramlás pedig koncentrációfüggő módon emelkedett 24 órás DOX kezelés hatására. * $p < 0.05$ (vs. Kontroll) † $p < 0.01$ (vs. Kontroll). # $p < 0.05$ (vs. DOX). További részletek a Módszerek fejezetben.



19. ábra. L-2286 (L) és TEMPOL (T) hatása doxorubicin-indukálta kardiomiopátia modellben az állatok túlélésére. * $p < 0.01$ DOX+L vs. DOX, DOX+T csoportok.

5.2.18. A PARP-gátlás és a TEMPOL kezelés hatása a gravimetriás paraméterekre, a plazma BNP szintre, valamint a túlélésre DOX-indukálta szívelégtelenség modellben

A vizsgálat kezdetén nem különbözött az állatok testsúlya a csoportok között. A vizsgálat végén minden DOX-kezelt csoportban jelentősen alacsonyabb testtömeg volt mérhető ($p < 0.01$ vs. Kontroll és L csoport). A szív tömege is hasonlóképp változott. Azonban a szív súly/testtömeg, illetve a szív súly/tibia hossz arányszámok nem változtak jelentősen (8. táblázat).

A kisvérköri pangásra utaló nedves/száraz tüdő hányados emelkedett a DOX-kezelt csoportokban a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0.01$, vs. Kontroll és L csoport) (8. táblázat). DOX alkalmazása a plazma BNP szintet is emelte – mely szintén a szívelégtelenség markere ($p < 0.01$ vs. Kontroll és L csoport) [2, 47]. L-2286, illetve TEMPOL kezelés jelentősen mérsékelte ezeket a változásokat ($p < 0.05$ vs. DOX) (8. táblázat).

A kontroll és a csak L-2286 kezelésben részesülő állatok között nem észleltünk elhullást. A legmagasabb halálozási arányt a DOX csoportban észleltük, itt az állatoknak csupán alig több, mint 30%-a érte meg a kísérlet végét. A DOX+T csoportban kissé mérséklődött

(NS) a halálozás. L-2286 kezelés mellett azonban egy jelentősen jobb túlélési arány adódott ($p < 0.01$ vs. DOX, DOX+T) (19. ábra).

	Kontroll	DOX	DOX+L	DOX+T	L
BW (g)	39.1±0.5	39.5±0.4	38.6±1.0	38.5±0.7	39.4±0.7
BW ^{5w} (g)	40.5±0.6	34.5±0.6 ^a	33.0±1.2 ^a	29.3±1.1 ^a	41.9±0.9
HW ^{5w} (mg)	235±11	193±5 ^b	196±5 ^b	180±7 ^b	228±6
HW/BW ^{5w} (mg/g)	6.0±0.3	5.8±0.2	6.0±0.5	6.2±0.2	5.4±0.3
HW/TL ^{5w} (mg/mm)	12.1±1.2	10.5±1.0	12.5±1.0	11.3±0.7	11.0±0.5
Tüdő nedves/száraz ^{5w} tömeg (mg/mg)	1.14±0.11	1.32±0.02 ^a	1.22±0.01 ^{b,c}	1.27±0.04 ^a	1.11±0.18
plazma BNP ^{5w} (pg/dl)	108±3	171±9 ^a	128±7 ^{b,c}	129±6 ^{b,c}	112±6

8. táblázat. L-2286 (L) és TEMPOL (T) kezelés hatása a gravimetriás paraméterekre és a plazma BNP szintre. Kontroll: kezeletlen állatok. DOX: 4 hetes i.p. doxorubicin kezelésben részesült állatok (n=9), DOX+L: DOX és L-2286 kezelt állatok (n=18). DOX+T: DOX és TEMPOL kezelt állatok (n=11). L: kontroll L-2286-al kezelt állatok (n=7). ^{5w}: 5 hetes kezelés utáni értékek (1 hetes előkezelés, majd 4 hetes kezelés DOX adása mellett). BW: testtömeg, HW: szív-tömeg, TL: jobb tibia hossza. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg.

^a<0.01 vs. Kontroll és L csoportok, ^b<0.05 vs. Kontroll és L csoportok, ^c<0.05 vs. DOX csoport.

5.2.19. A PARP-gátlás és a TEMPOL kezelés hatása az echocardiographiás paraméterekre doxorubicin kezelt állatokban

A különböző csoportokban az állatok szívfrekvenciája nem különbözött egymástól jelentősen. A szisztolés balkamra funkció (EF, FS) azonban jelentősen alacsonyabb volt a DOX csoportban a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0.05$ DOX vs. Kontroll) (9. táblázat). A septum és a hátsó fal vastagsága is emelkedett a doxorubicinnel kezelt csoportban ($p < 0.01$, DOX vs. Kontroll). Gyógyszeres intervenciók (PARP-gátló, TEMPOL) lényegesen javították ezen paramétereket ($p < 0.01$, DOX-L és DOX-T vs. DOX). A balkamrai töltőnyomást és a diasztolés funkciót jelző E/E' hányados szignifikánsan emelkedett a DOX csoportban. Ezt a romlást a gyógyszeres intervenciók csökkentették

	Kontroll	Kontroll ^{5w}	DOX	DOX+L	DOX+T	L
EF (%)	69.9±1.2 ^d	69.7±0.4 ^d	60.9±2.5	66.9±0.7 ^d	65.7±1.5 ^d	69.6±0.5 ^d
FS (%)	39.4±1.0 ^d	38.69±0.67 ^d	32.45±1.63	36.35±0.46 ^d	36.27±1.64 ^d	39.1±0.5 ^d
HR (bpm)	420±16	404±1	408±35	413±9	415±51	426±42
Septum (mm)	0.84±0.01	0.72±0.03 ^c	0.99±0.1	0.56±0.04 ^c	0.82±0.01 ^c	0.73±0.01 ^c
PW (mm)	0.87±0.02 ^d	0.8±0.01 ^c	1.04±0.03	0.69±0.07 ^c	0.78±0.02 ^c	0.91±0.01 ^f
LVIDs (mm)	2.73±0.09	2.98±0.06	2.56±0.22	2.39±0.15	2.79±0.03	2.75±0.03
LVIDd (mm)	4.51±0.09 ^d	4.89±0.08 ^c	3.84±0.24	3.69±0.15	4.33±0.05	4.57±0.15
RWT	0.38±0.01 ^c	0.32±0.01 ^c	0.53±0.04	0.34±0.04 ^c	0.36±0.04 ^c	0.36±0.05 ^c
LVEDV (ml)	96.95±5.21	106.12±2.45	64.44±9.87	58.15±5.66	88.38±4.17	96.37±5.29
LVESV (ml)	31.58±2.98	33.55±0.78	24.53±5.31	20.23±3.15	30.18±3.11	31.68±2.86
LV tömeg (mg)	153±7	159±5	125±14 ^b	137±7 ^b	129±5 ^b	152±9
E (mm/s)	899±28	908±81	1072±13	917±48	869±2	1069±62
A (mm/s)	540±54 ^c	561±43 ^d	911±18	454±84 ^c	723±7	659±97
E' (mm/s)	25.8±2.54	29.4±4.4	15.5±1.4	23.9±4.7	30.3±2.2	27.9±3.3
E/E'	34.9±6.6 ^d	33.6±8.6 ^d	57.9±12.3	31.3±0.9 ^d	29.1±2.2 ^d	33.1±7.3 ^d
A' (mm/s)	21.5±2.0	19.2±2.1	27.0±3.1	18.3±1.9	19.9±2.9	19.3±1.5
E'/A'	1.31±0.002 ^c	1.51±0.001 ^c	0.6±0.002	1.28±0.004 ^d	1.57±0.002 ^c	1.46±0.003 ^c
MPI	0.54±0.01 ^c	0.55±0.01 ^c	0.74±0.01	0.57±0.01 ^d	0.59±0.02 ^d	0.54±0.01 ^c

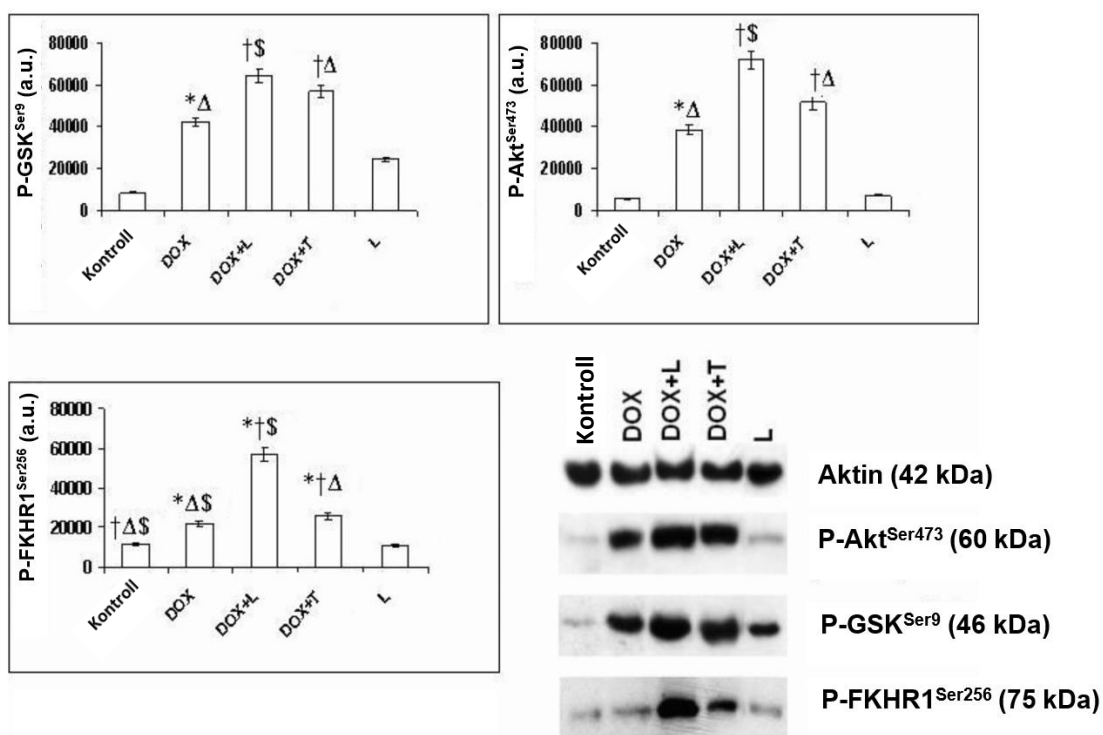
9. táblázat. L-2286 és Tempol kezelés hatása az echocardiographiás paraméterekre doxorubicin (DOX) indukálta szívelégtelenségben. Kontroll: kontroll állatok a kezelés megkezdése előtt (n=20). Kontroll^{5w}: kontroll állatok az 5 hetes vizsgálati időszak (1 hét előkezelés+4 hét és +/- DOX és +/- L ill. T kezelés) végén (n=7). DOX: 4 hetes i.p. doxorubicin kezelésben részesült állatok (n=9). DOX+L: DOX és L-2286 kezelt állatok (n=18). DOX+T: DOX és TEMPOL kezelt egerek (n=11). L: kontroll L-2286-al kezelt állatok (n=7). EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális roströvidülés, HR: szívfrekvencia, Septum: septum végdiasztolés vastagsága, PW: hátsó fal végdiasztolés vastagsága, LVIDs: balkamrai végszisztolés átmérő, LVIDd: balkamrai végdiasztolés átmérő, RWT: relatív falvastagság, LVEDV: balkamrai végdiasztolés volumen, LVESV: balkamrai végszisztolés volumen, LV tömeg: balkamrai tömeg. E: koradiasztolés áramlás a mitralis billentyűn keresztül, A: a pitvari kontrakció következtében kialakuló diasztolés végi áramlás a mitralis billentyűn keresztül, E': mitralis annulus koradiasztolés elmozdulási sebessége, A': mitralis annulus késődiasztolés elmozdulási sebessége, MPI: miokardiális teljesítmény index. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg.

^a<0.01 vs. Kontroll csoport, ^b<0.05 vs. Kontroll csoport, ^c<0.01 vs. DOX csoport, ^d<0.05 vs. DOX csoport, ^e<0.01 vs. DOX+L csoport, ^f<0.05 vs. DOX+L csoport, ^g<0.05 vs. L csoport.

($P < 0.05$, DOX-L és DOX-T vs. DOX) (9. táblázat). Az MPI, vagy Tei-index az izovolumetriás aktivitás idejét jelzi, mely mind a szisztolés, mind a diasztolés funkciót jellemzi. Az MPI értéke fordítottan arányos a balkamra funkcióval. Az MPI a DOX csoportban jelentősen megemelkedett a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0.01$), L-2286 azonban csökkentette ezt az emelkedést ($p < 0.05$) (9. táblázat).

5.2.20. A farmakológiai PARP-gátlás és a TEMPOL hatása az Akt-1/GSK-3 β , illetve a FKHR foszforilációra, valamint a Hsp72 és 90 mennyiségére DOX-kezelt állatokban

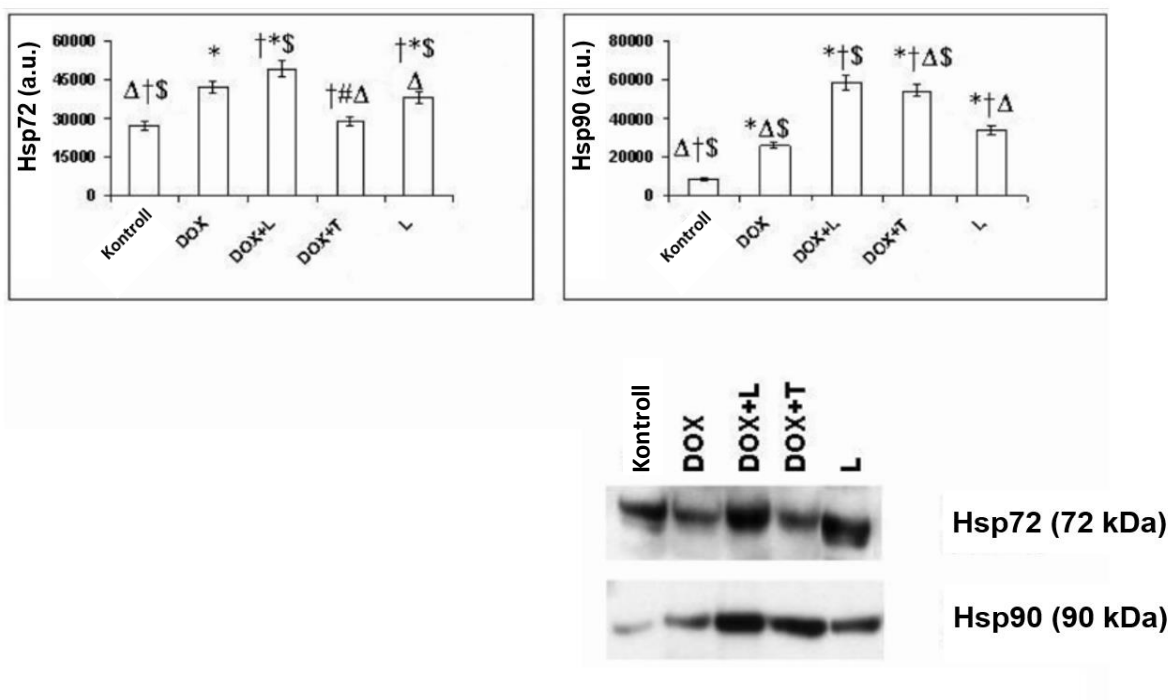
Akt-1^{Ser473} foszforiláció egészséges, fiatal egerekben alig volt kimutatható. DOX kezelés azonban emelte az Akt-1 aktivitását ($p < 0.01$ vs. Kontroll) és ez tovább nőtt mind L-2286, mind TEMPOL kezelés hatására ($p < 0.01$ vs. DOX). A legkifejezettebb foszforilációt a DOX+L csoportban észleltük (csaknem duplája a DOX csoporténak). TEMPOL kezelés



20. ábra. L-2286 (L) és a TEMPOL (T) hatása az Akt-1/GSK-3 β , FKHR1 útvonalra doxorubicin (DOX) indukálta szívelégtelenségben. Reprezentatív Western blot képek és az Akt-1^{Ser473}, GSK-3 β ^{Ser9}, FKHR1^{Ser256} foszforiláció mértékének denzitometriás meghatározása (n=3). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. Kontroll: Kontroll kezelt állatok. DOX: doxorubicin kezelt állatok. DOX+L: DOX és L-2286 kezelt állatok. DOX+T: DOX és Tempol kezelt állatok. L: L-2286 kezelt kontroll állatok. * $p < 0.01$ vs Kontroll, † $p < 0.01$ vs DOX, \$ $p < 0.01$ vs DOX+T, # $p < 0.05$ vs Kontroll, Δ $p < 0.01$ vs DOX+L.

nem okozott ilyen kifejezett emelkedést az Akt-1^{Ser473} foszforilációban ($p < 0.01$ vs. DOX+L) (20. ábra). GSK-3 β ^{Ser9} foszforiláció esetében, mely nagyrészt az Akt-1^{Ser473} foszforilációtól függő folyamat, hasonló változásokat észleltünk (20. ábra). A FKHR1^{Ser256} foszforilációs státusza szintén a Kontroll és az L csoportban volt a legalacsonyabb. DOX kezelés emelte a foszforilációját ($p < 0.01$ vs. Kontroll és L csoportok), de a kezelt, különösen L-2286-al kezelt állatok esetében volt legmagasabb ez az érték ($p < 0.01$ DOX+L vs. többi csoport) (20. ábra).

A hősokk fehérjék közül a Hsp72 és 90 mennyiségét határoztuk meg, melyek mennyisége L-2286 kezelés hatására jelentős mértékben megemelkedett az egészséges, nem stresszelt állatokban ($p < 0.01$ vs Kontroll). Habár mindkét fehérje mennyisége növekedést mutatott DOX stressz hatására ($p < 0.01$ vs Kontroll), a legmagasabb értékeket a DOX+L csoportban mértük ($p < 0.01$ vs DOX, DOX+T csoportok) (21. ábra).



21. ábra L-2286 (L) és a TEMPOL (T) hatása a Hsp72 és 90 expressziójára doxorubicin (DOX) indukálta szívelégtelenségben. Reprezentatív Western blot képek, illetve a Hsp72 és 90 mennyiségének denzitometriás meghatározása ($n=3$). Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. Kontroll: kontroll kezeletlen állatok. DOX: doxorubicin kezelt állatok. DOX+L: DOX és L-2286 kezelt állatok. DOX+T: DOX és Tempol kezelt állatok. L: L-2286 kezelt kontroll állatok.

* $p < 0.01$ vs. Kontroll, † $p < 0.01$ vs. DOX, \$ $p < 0.01$ vs. DOX+T, # $p < 0.05$ vs. C, Δ $p < 0.01$ vs. DOX+L, & $p < 0.05$ vs. DOX+L.

5.3. A PARP-gátlás hatása a hipertenzív szervkárosodások kialakulására. Védelem a kardiovaszkuláris remodellinggel szemben

5.3.1. A PARP-gátlás hatása fiatal spontán hipertenzív patkányokban a gravimetriás paraméterekre

A vizsgálat kezdetekor, 6 hetes korban az állatok testtömege a három csoportban nem mutatott jelentős különbséget (WKY: 71.01 ± 1.89 g, SHR-C: 72.03 ± 2.36 g, SHR-L: 69.92 ± 3.21 g). Azonban a 24 hetes kezelési időszak végére a WKY állatok testtömege jelentősen magasabb volt, mint a hipertenzív állatoké (WKY: 392.70 ± 14.01 g, SHR-C: 323.80 ± 11.27 g, SHR-L: 321.86 ± 6.84 g, $p < 0.01$ WKY vs. SHR csoportok, 30 hetes patkányok). A miokardiális hipertrófia mértékét a kamratömeg/testtömeg hányadossal

	WKY	SHR-C	SHR-L
SBP ^{30w} (Hgmm)	129 ± 7	192 ± 9^b	186 ± 5^b
DBP ^{30w} (Hgmm)	89 ± 5	127 ± 8^b	125 ± 4^b
MBP ^{30w} (Hgmm)	103 ± 7	149 ± 5^b	146 ± 7^b
BW ^{6w} (g)	71.01 ± 1.89	72.02 ± 2.36	69.92 ± 3.21
BW ^{30w} (g)	392.70 ± 14.01	323.80 ± 11.27^a	$321.86 \pm 6.84^{a,c}$
WV (g)	1.16 ± 0.17	1.45 ± 0.18^b	$1.24 \pm 0.24^{b,c}$
WV/BW (mg/g)	2.95 ± 0.17	4.48 ± 0.12^b	$3.85 \pm 0.15^{b,c}$
Nedves/száraz tüdő tömeg	4.84 ± 0.92	4.79 ± 0.84	4.77 ± 0.99
plazma BNP (ng/ml)	2.19 ± 0.011	2.33 ± 0.034	2.31 ± 0.031

10. táblázat. L-2286 kezelés hatása a gravimetriás paraméterekre és a plazma BNP szintre fiatal SHR állatokban. WKY: koregyezettett normotenzív patkányok, n=7, SHR-C: kezeletlen SHR patkányok, n=8, SHR-L: 24 hetes L-2286 kezelésben részesült SHR állatok, n=9. SBP, DBP, MBP^{30w}: 30 hetes állatok szisztolés, diasztolés vérnyomása és artériás középnyomása (n=3 csoportonként). BW^{6w}: 6 hetes állatok testtömege, BW^{30w}: 30 hetes állatok testtömege, WV: kamratömeg, BNP: plazma B típusú nátriuretikus peptid. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. ^a $p < 0.01$ (vs. WKY csoport), ^b $p < 0.05$ (vs. WKY csoport), ^c $p < 0.05$ (vs. SHR-C csoport).

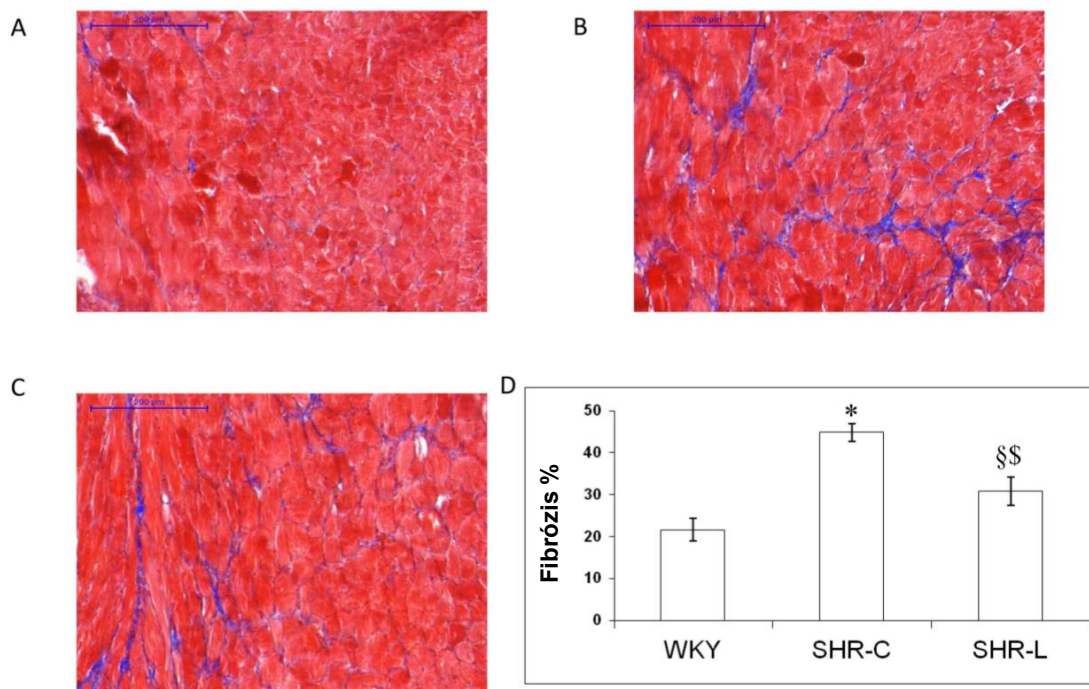
határoztuk meg (WV/ BW, mg/g). Az SHR csoportokban ez az érték jelentősen növekedett a normotenzív állatokhoz képest (WV/BW: WKY: 2.95 ± 0.17 , SHR-C: 4.48 ± 0.12 , SHR-L: 3.85 ± 0.15 , $p < 0.05$ WKY vs. SHR csoportok). A kamratömeg meghatározásakor is hasonló eredményt kaptunk (WV, WKY: 1.16 ± 0.17 g, SHR-C: 1.45 ± 0.18 g, SHR-L: 1.24 ± 0.24 g, $p < 0.05$ WKY vs. SHR csoportok). Mind a VW, mind a VW/BW hányados jelentősen csökkent L-2286 kezelés hatására ($p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C csoport). A nedves/száraz tüdő tömeg aránya nem különbözött szignifikánsan a csoportok között (10. táblázat). A gravimetriás paraméterek vizsgálatával a fiatal SHR állatokban balkamra hipertrófia jelei észlelhetők szívelégtelenség nélkül. A hipertrófia mértéke PARP-gátló kezeléssel mérséklődött.

5.3.2. L-2286 kezelés nem befolyásolja a plazma BNP mennyiségét és a vérnyomást fiatal SHR állatokban

A normotenzív (WKY) csoportban, illetve a hipertenzív (SHR-C és SHR-L) csoportok között nem különbözött érdemben a szívelégtelenség marker BNP szintje (10. táblázat). A vérnyomásértékek azonban mindkét SHR csoportban jelentősen magasabbak voltak, mint a WKY csoportban ($p < 0.05$). L-2286 kezelés nem befolyásolta SHR állatok vérnyomásértékét (10. táblázat).

5.3.3. L-2286 kezelés csökkenti a miokardiumban az intersticiális kollagén lerakódás mértékét

Szövettani vizsgálat során a normotenzív állatokban (WKY) csak minimális kötőszövetes állomány volt látható. Krónikus magas vérnyomás azonban jelentősen növelte a kollagén lerakódás mértékét ($p < 0.01$ SHR-C vs. WKY csoport). L-2286 kezelés hatására pedig szignifikánsan csökkent ez a növekedés ($p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C csoport) (22. ábra).



22. ábra. L-2286 kezelés csökkenti az intersticiális kollagén lerakódás mértékét. A metszeteket Masson's trikróm módszer szerint festettük (n=5). Vonalas mérték: 200 μ m. 10x nagyítás. WKY (A): normotenzív életkor egyeztetett patkányok. SHR-C (B): 30 hetes kontroll SHR patkányok, SHR-L (C): 30 hetes, L-2286 kezelésben részesülő SHR állatok. D: Metszetek denzitometriás értékelése. * $p < 0.01$ vs. WKY, \$ $p < 0.05$ vs. WKY, \$\$ $p < 0.05$ vs. SHR-C.

5.3.4. A PARP-gátlás lassítja a hipertenzív kardiopáthia kialakulásának folyamatát spontán hipertenzív patkányokban

A vizsgálat kezdetén az echocardiographiás paraméterek nem különböztek lényegesen a három csoportban (11. táblázat). A balkamrai szisztolés funkciót jelző paraméterekben (EF és FS) az állatok 30 hetes korában sem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Az altatás során az állatok szívfrekvenciája is megegyezett a csoportok között. A balkamrai üreg dilatált (LVESV és LVEDV) az SHR csoportokban a normotenzív állatokhoz képest ($p < 0.05$ WKY vs. SHR-C és SHR-L). Ezt a változást azonban az L-2286 kezelés nem befolyásolta. A balkamra hipertrófia mértékét jelző értékek (septum és hátsó fal vastagsága, RWT, balkamrai tömeg) jelentősen magasabbak voltak az SHR csoportokban, mint a normotenzív állatokban ($p < 0.05$, WKY vs. SHR-C és SHR-L), és ezen paraméterek romlása szignifikáns módon mérséklődött L-2286 kezelés hatására ($p < 0.05$ SHR-C vs. SHR-L csoport) (12. táblázat).

	WKY	SHR-C	SHR-L
EF ^{6w} (%)	67.26±0.525	68.4±1.77	68.23±1.81
FS ^{6w} (%)	38.63±4.47	38.03±5.52	39.35±4.15
LVEDV ^{6w} (ml)	147.27±13.88	149.56±16.78	149.11±14.43
LVESV ^{6w} (ml)	46.63±4.47	48.03±5.52	47.35±5.45
Septum ^{6w} (mm)	1.2±0.07	1.18±0.05	1.17±0.12
PW ^{6w} (mm)	1.19±0.07	1.16±0.067	1.14±0.04
LV tömeg ^{6w} (kalk., mg)	344.14±35.49	351.66±36.23	354.77±33.23

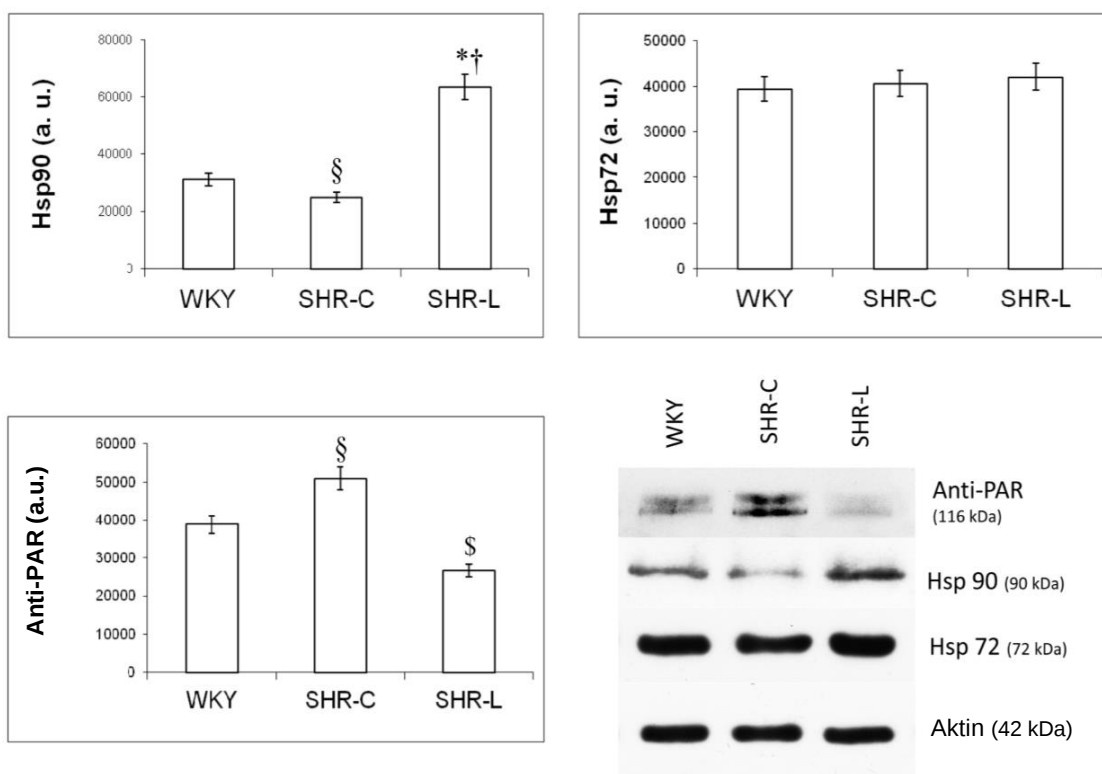
11. táblázat. 6 hetes hím normotenzív WKY és hipertenzív (SHR) patkányok echocardiographiás paramétereit. WKY: normotenzív életkor egyeztetett kontroll patkányok (n=7), SHR-C: kezeletlen hipertenzív SHR patkányok (n=8), SHR-L: L-2286 kezelésben részesülő SHR állatok (n=9). EF^{6w}: 6 hetes állatok ejekciós frakciója, FS^{6w}: 6 hetes állatok frakcionális roströvidülése, LVEDV^{6w}: 6 hetes állatok balkamrai végdiasztolés volumene, LVESV^{6w}: 6 hetes állatok balkamrai végszisztolés volumene, Septum^{6w}: septum falvastagsága 6 hetes állatokban, PW^{6w}: hátsó fal vastagsága 6 hetes állatokban, LV tömeg^{6w}: balkamrai kalkulált tömeg 6 hetes patkányokban. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg.

	WKY	SHR-C	SHR-L
EF ^{30w} (%)	69.1±2.4	68.72±2.1	69.01±3.2
FS ^{30w} (%)	39.8±1.9	39.04±1.85	40.57±2.66
LVEDV ^{30w} (ml)	279.18±18.18	335.87±10.36 ^a	326.94±9.18 ^a
LVESV ^{30w} (ml)	85.77±8.56	96.85±10.36 ^a	99.81±11.85 ^a
Septum ^{30w} (mm)	1.43±0.04	1.93±0.04 ^a	1.79±0.05 ^{a,b}
PW ^{30w} (mm)	1.54±0.08	2.15±0.12 ^a	1.87±0.03 ^{a,b}
RWT ^{30w}	0.38±0.05	0.504±0.02 ^a	0.445±0.012 ^{a,b}
LV tömeg ^{30w} (kalk., mg)	1002.81±59.5	1370.35±79.87 ^a	1121.13±53.23 ^{a,b}
LV tömeg/BW ^{30w} (mg/g)	2.73±0.7	4.23±0.8 ^a	3.70±0.3 ^{a,b}

12. táblázat. L-2286 kezelés mérsékli a balkamra hipertrófia mértékét fiatal SHR állatokban. WKY: normotenzív életkor egyeztetett kontroll patkányok (n=7), SHR-C: kezeletlen hipertenzív SHR patkányok (n=8), SHR-L: L-2286 kezelésben részesülő SHR állatok (n=9). EF^{30w}: 30 hetes állatok ejekciós frakciója, FS^{30w}: 30 hetes állatok frakcionális roströvidülése, LVEDV^{30w}: 30 hetes állatok balkamrai végdiasztolés volumene, LVESV^{30w}: 30 hetes állatok balkamrai végszisztolés volumene, Septum^{30w}: septum falvastagsága 30 hetes állatokban, PW^{30w}: hátsó fal vastagsága 30 hetes állatokban, RWT^{30w}: relatív falvastagság, LV tömeg^{30w}: balkamrai kalkulált tömeg 30 hetes patkányokban. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^ap<0.05 (vs. WKY csoport), ^bp<0.05 (vs. SHR-C csoport).

5.3.5. Az L-2286 kezelés hatása a Hsp72 és 90 celluláris szintjére

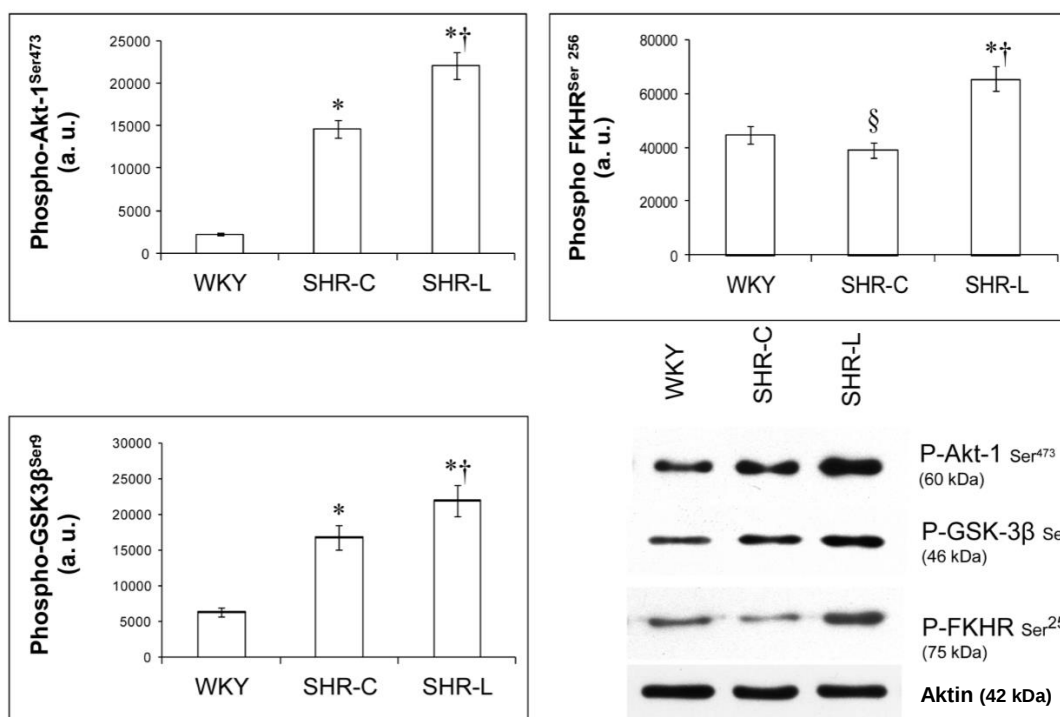
A Hsp72 mennyiségében nem volt jelentős különbség a három vizsgálati csoportban. A Hsp90 mennyisége azonban jelentősen emelkedett az SHR-L csoportban a kezeletlen SHR állatokhoz, illetve a WKY állatokhoz képest ($p < 0.01$ SHR-L vs. WKY és SHR-C csoportok), a legalacsonyabb koncentrációt az SHR-C csoportban mértük ($p < 0.05$ vs. WKY) (23. ábra).



23. ábra. L-2286 kezelés hatása a Hsp72 és 90 mennyiségére és a poli(ADP-riboz)iláció mértékére. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás ($n=4$). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. WKY: normotenzív koregyeztetett patkányok. SHR-C: 30 hetes kezeletlen spontán hipertenzív patkányok, SHR-L: 30 hetes, L-2286 kezelésben részesülő spontán hipertenzív patkányok. * $p < 0.01$ vs. WKY, † $p < 0.01$ vs. SHR-C, § $p < 0.05$ vs. WKY, § $p < 0.05$ vs. SHR-C.

5.3.6. L-2286 kezelés hatása a poli(ADP-ribozil)ációra, valamint az Akt-1^{Ser473}/GSK-3 β ^{Ser9} és FKHR^{Ser256} foszforiláció mértékére fiatal SHR állatokban

Az Akt-1^{Ser473} a WKY csoportban alig foszforilálódott. Az SHR-C csoportban azonban az Akt-1^{Ser473} foszforilációja sokkal kifejezettebb lett ($p < 0.01$ vs. WKY). A kezelt SHR-csoportban (SHR-L) egy további emelkedés volt látható ($p < 0.01$ vs. SHR-C csoport) (24. ábra). Azonos eredményt észleltünk a GSK-3 β ^{Ser9} foszforiláció vizsgálatakor is (24. ábra). A GSK3 β mellett a FKHR az Akt-1 egyik target molekulája. Az Akt-1^{Ser473} foszforilációval párhuzamosan a legmagasabb foszforilációt (és legkifejezettebb gátlást) az SHR-L csoportban észleltük



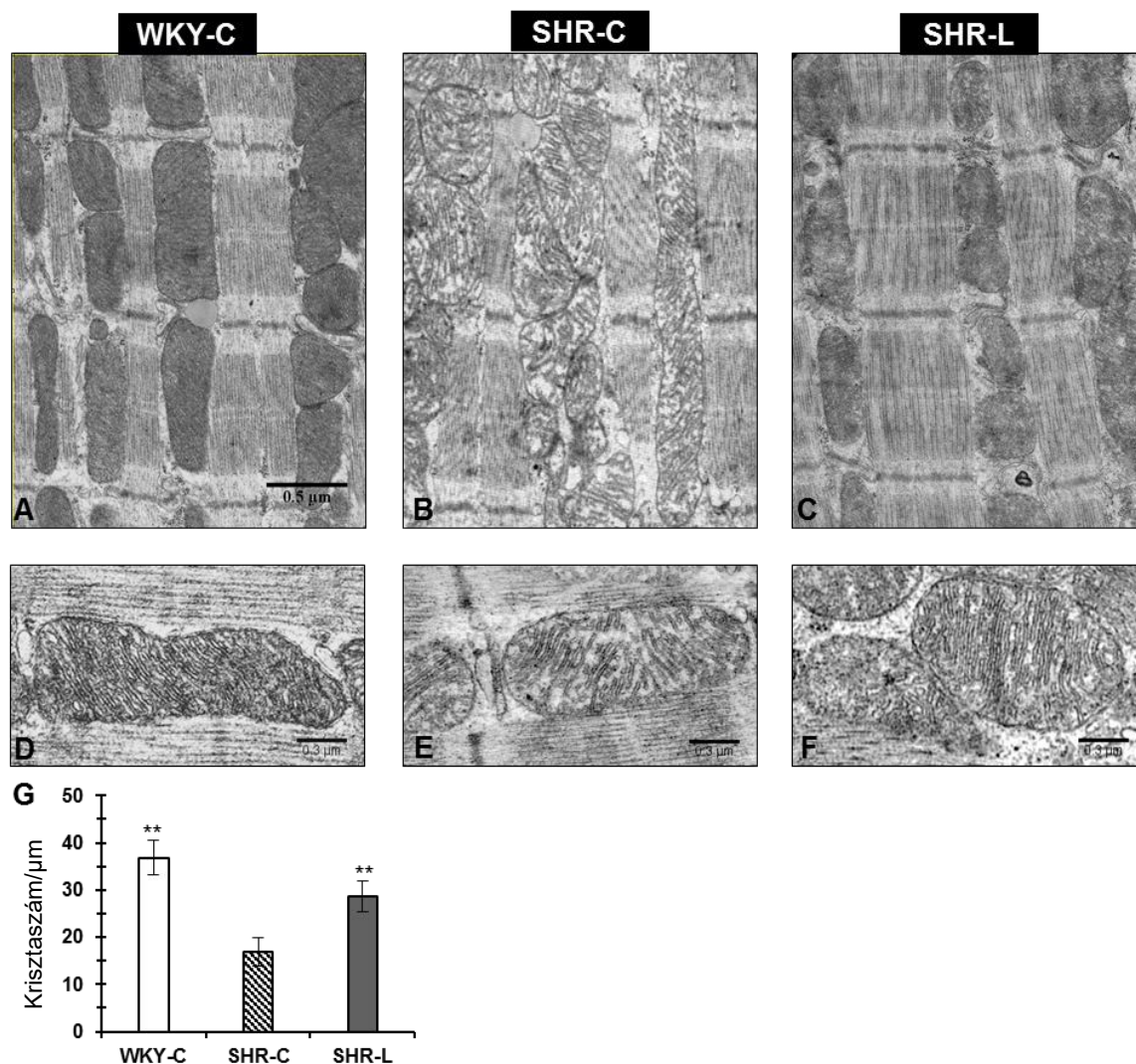
24. ábra. L-2286 kezelés hatása az Akt-1^{Ser473}/GSK-3 β ^{Ser9}, FKHR^{Ser256} útvonal aktivitására. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás ($n=4$), Akt-1^{Ser473}, GSK-3 β ^{Ser9}, FKHR^{Ser256} foszforilációval kapcsolatban. Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. WKY: normotenzív koregyeztetett patkányok. SHR-C: 30 hetes kezeletlen spontán hipertenzív patkányok, SHR-L: 30 hetes, L-2286 kezelésben részesülő spontán hipertenzív patkányok. * $p < 0.01$ vs. WKY, † $p < 0.01$ vs. SHR-C, § $p < 0.05$ vs. WKY.

($p < 0.01$ vs. SHR-C és WKY). A legalacsonyabb foszforiláció és ezáltal legmagasabb FKHR aktivitás pedig az SHR-C csoportban volt mérhető ($p < 0.05$ vs. WKY) (24. ábra). Az L-2286 hatékonyságának vizsgálata céljából az ADP-riboziláció mértékét Western-blot segítségével határoztuk meg. A legalacsonyabb ADP-ribozilációt az SHR-L

csoportban észleltük ($p < 0.05$ SHR-L vs. WKY és SHR-C), a legmagasabbat pedig a kezeletlen hipertenzív csoportban ($p < 0.05$ vs. WKY) (23. ábra).

5.3.7. A szívizomsejtek interfibrilláris mitokondriumainak ultrastrukturális változásai hipertónia és L-2286 kezelés hatására

A miokardiumból hosszirányú metszeteket készítettünk, hogy meghatározzuk az interfibrilláris mitokondriumok állapotát. A mitokondriumok ezen alpopulációja, mely szorosan a kontraktilis elemek közé ékelve található meg, jelentős szerepet tölt be a szív kontraktilis munkája energiaigényének fedezésében. Ezért ezen szubpopuláció károsodása fontos szerepet játszik a szívelégtelenség és kardiomiopathiák kialakulásában [160]. Kezeletlen hipertenzív állatokban (SHR-C csoport) (25. ábra B) ezek a mitokondriumok kevésbé rendezetten helyezkedtek el a filamentumok között, morfológiailag heterogének voltak és a mátrixuk elektrondenzitása csökkent volt a normotenzív WKY állatok miokardium mintáihoz képest (25. ábra A). A mitokondriális belső membrán krisztáinak vizsgálatakor a normotenzív állatokban sűrűn elhelyezkedő, szabályos formájú krisztákat találtunk (25. ábra D). Ezzel szemben jelentősen alacsonyabb krisztadenzitás (SHR-C vs WKY-C, $p < 0.01$), kiszélesedett krisztatér és csökkent junkciós szám volt látható az SHR-C csoportban (25. ábra E és G). L-2286-kezelt SHR állatokban enyhébb mitokondriális ultrastruktúra változások voltak csak észlelhetők (25. ábra C, F és G) ($p < 0.01$ vs. SHR-C és WKY-C) (25. ábra G).

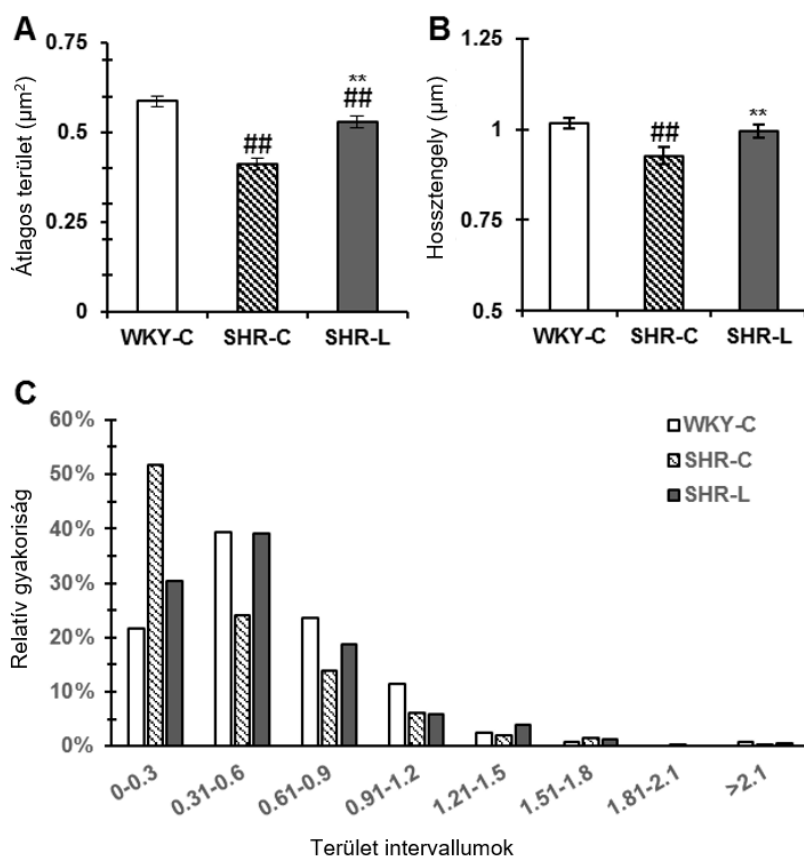


25. ábra. A szívmusclek interfibrilláris mitokondriumainak ultrastrukturális változásai hipertónia és L-2286 hatására. (A-C) Reprezentatív elektronmikroszkópiás képek mutatják az interfibrilláris mitokondriumokat (A) WKY-C, (B) SHR-C és (C) SHR-L állatokban (nagyítás: 10k, vonalas mérték: 0.3 μm). (D-F) A miokardium interfibrilláris mitokondriumainak az ultrastrukturája (D) WKY-C, (E) SHR-C és (F) SHR-L állatokban (nagyítás: 40k, vonalas mérték: 0.5 μm). (G) Mitokondriális krisztadenzitás. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. **p<0.01 vs. SHR-C.

5.3.8. A mitokondriális dinamika vizsgálata hipertenzív állatokban

Hogy belátást nyerjünk a mitokondriális fisszió-fúzió folyamatának aktuális állapotába, meghatároztuk az interfibrilláris mitokondriumok areáját (26. ábra A) és hossz tengelyét (26. ábra B) (~500 mitokondrium/csoport). Az SHR-C csoportban csökkent az átlagos

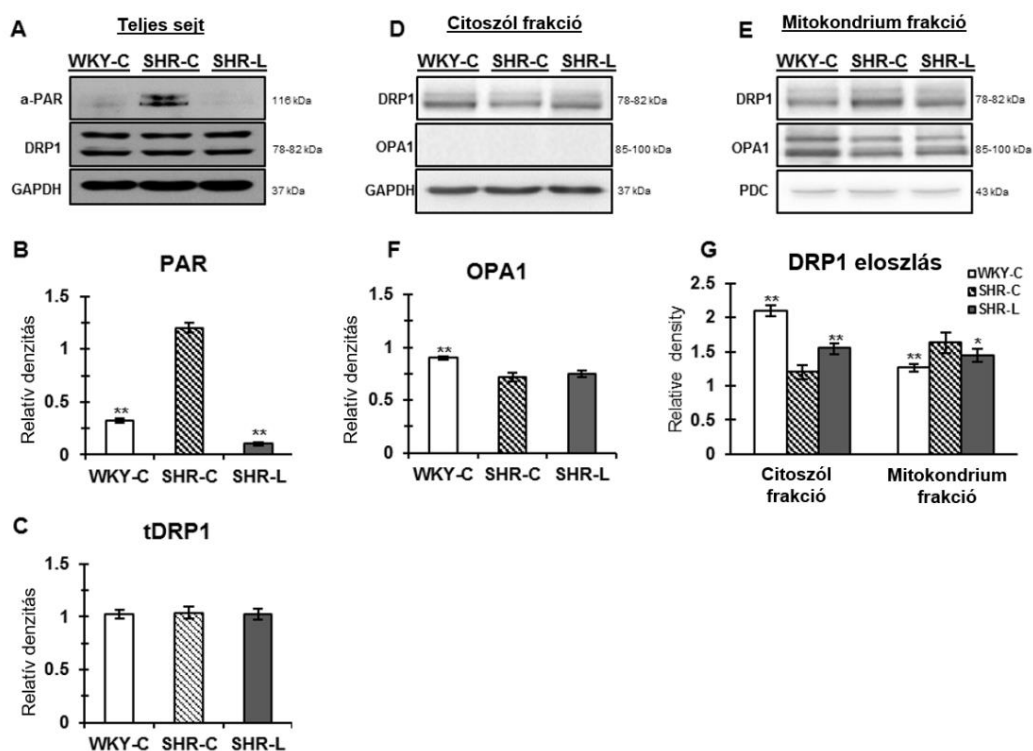
mitokondrium area és hossz méret a WKY állatokhoz képest (SHR-C vs. WKY-C, $p < 0.01$). Az L-2286 kezelt SHR állatokban mindkét érték magasabbnak adódott (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.01$). Ezt követően jellemeztük, hogy a mitokondriumok mérete milyen megoszlási mintázatot mutat. Ezért meghatároztuk a mitokondriumok relatív gyakoriságát az általunk meghatározott $0.3 \mu\text{m}^2$ –es terület intervallumokban. SHR-C állatokban azt találtuk, hogy a legkisebb terület intervallumba volt besorolható a mitokondriumok csaknem 50 %-a (26. ábra C). A kezelt hipertóniás (SHR-L) és normotenzív (WKY-C) állatok mitokondriumainak többsége a magasabb terület intervallumba tartozott ($0.3-0.6 \mu\text{m}^2$).



26. ábra. A hipertónia és az L-2286 hatása az interfibrilláris mitokondriumok fragmentációjára. (A) Az átlagos mitokondrium méret (area) a különböző csoportokban. (B) A mitokondriumok átlagos hossza. (C) A mitokondriumok relatív gyakorisága a különböző mérettartományokban.

5.3.9. Az L-2286 kezelés hatása a fisszió-fúzió regulátorainak celluláris mennyiségére és szubcelluláris eloszlására

Hogy tisztázzuk a PARP-gátlással elért csökkent mitokondriális fisszió és megőrzött mitokondriális belső membrán szerkezet hátterében álló molekuláris mechanizmusokat, a fúzióban szerepet játszó OPA1-nek és a fisszió fő mediátorának, a DRP1-nek sejtszintű, illetve különböző sejtfrakciókban lévő mennyiségét határoztuk meg Western blot segítségével.



27. ábra. L-2286 csökkenti a mitokondriális fissziót a DRP1 mitokondriális transzlokációjának mérséklése által SHR állatokban. (A) A PAR és a DRP1 mennyisége nem frakcionált sejtmintákban (B-C). A PAR (B) és a DRP1 (C) GAPDH-hoz viszonyított relatív mennyisége (D-E). Az OPA1 és a DRP1 szubcelluláris eloszlása a (D) citoszol (E) és a mitokondriális frakciókban (F-G). Az OPA1 (F) és a DRP1 (G) mennyiségének meghatározása az adott szubcelluláris frakciókban a GAPDH-hoz viszonyítva. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

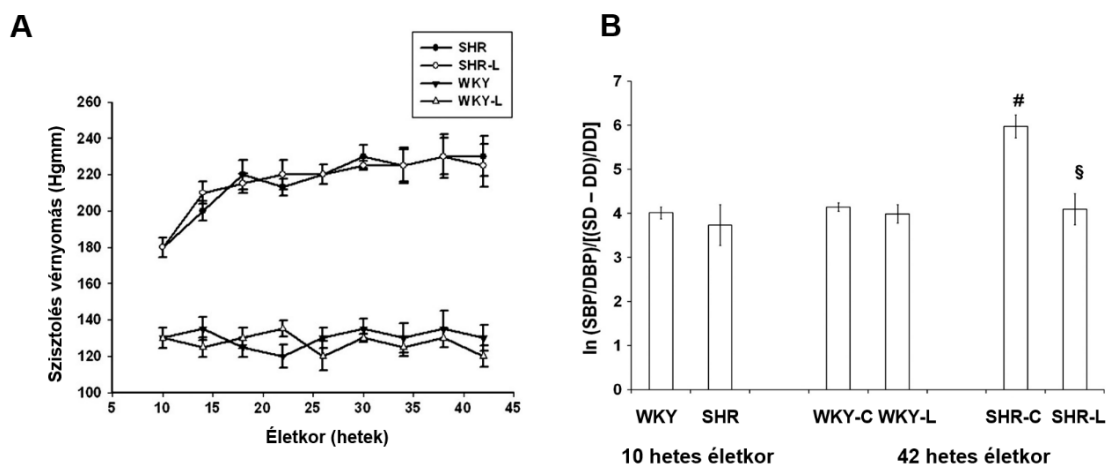
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. SHR-C.

Meghatároztuk az L-2286 hatását sejtkultúrában az autoPARiláció mértékére is (27. ábra A). A legmagasabb PAR-polimer képződés a kontroll hipertenzív állatokban volt a legmagasabb (SHR-C vs. WKY-L, $p < 0.01$). L-2286 kezelés azonban jelentősen

csökkentette a PARP aktiváció mértékét SHR állatokban (SHR-L vs. SHR-C, $p<0.01$) (27. ábra B). A fisszió regulátora, a DRP1 celluláris szintje nem különbözött lényegesen a csoportok között (27. ábra A és C). A frakcionált mintákban azonban (27. ábra D és E) jelentős eltérések adódtak. A DRP1 szintje a mitokondriális frakcióban jelentősen emelkedett az SHR-C csoportban (SHR-C vs. WKY-C, $p<0.01$), jelezve a DRP-1 transzlokációját és a külső mitokondrium membránhoz való kapcsolódását (27. ábra G). PARP-1 gátló kezelés hatására a DRP1 nagyobb arányban maradt a citoszól frakcióban, mint a kezeletlen hipertenzív állatokban (SHR-L vs. SHR-C, $p<0.01$) (27. ábra D) és kevesebb kapcsolódott a mitokondriumokhoz (SHR-L vs. SHR-C, $p<0.05$) (27. ábra E). Az OPA1 (27. ábra E) - mely a belső membrán integritásáért és fúziójáért felelős - mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a hipertenzív állatokban (SHR-C vs. WKY-C, $p<0.01$). L-2286 kezelés csak minimálisan volt képes (NS) mérsékelni a hipertónia kiváltotta OPA1 mennyiség csökkenést (27. ábra F).

5.3.10. L-2286 kezelés hatása a szisztolés vérnyomásra fiatal SHR patkányokban

A 32 hét hosszúságú kezelési időszak során az SHR állatok (SHR-C, SHR-L) szisztolés vérnyomása mindvégig jelentősen magasabb volt a normotenzívekéhez (WKY-C, WKY-L) képest (10 hetes korban: SHR: 180 ± 5.6 Hgmm, WKY: 130 ± 5.4 Hgmm, $p<0.05$; SHR vs. WKY csoportok; 42 hetes életkorban SHR-C: 230 ± 6.3 Hgmm, SHR-L: 225 ± 2.4 Hgmm, WKY-C: 130 ± 5.4 Hgmm, WKY-L: 135 ± 5.5 Hgmm, $p<0.01$; SHR-C és SHR-L vs. WKY-C és WKY-L). A PARP-gátlás L-2286 kezeléssel sem a hipertenzív, sem a normotenzív állatok esetében nem befolyásolta a szisztolés vérnyomás alakulását a kezelési időszak során (28. ábra).



28. ábra. A PARP-gátló kezelés hatása a normotenzív és hipertenzív patkányok szisztolés vérnyomásértékeinek (A), valamint aorta stiffness indexének (ASI) alakulására (B). Az értékeket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg.

$p < 0.05$ (SHR-C vs. WKY-C és SHR-L), § $p < 0.05$ (SHR-L vs. WKY-C, WKY-L).

5.3.11. Az L-2286 kezelés hatása az aortafal merevségére

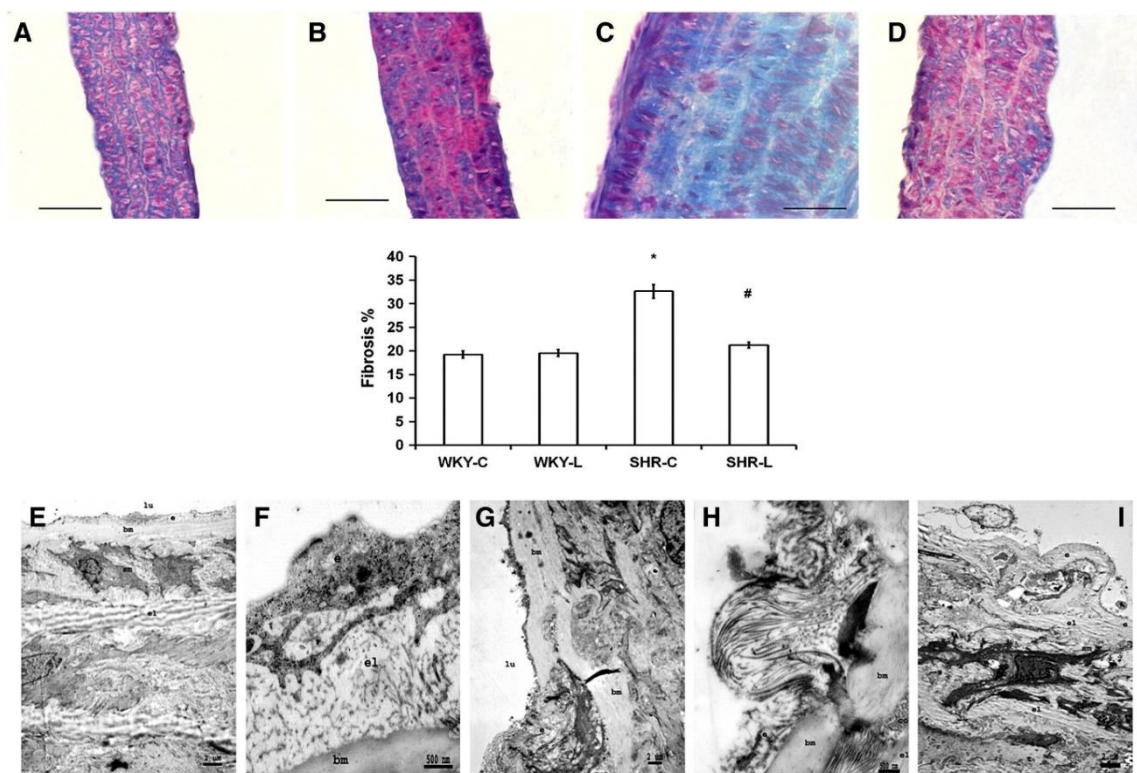
Az aortafal merevségét jelző artériás stiffness index (ASI) mértékében a vizsgálat kezdetén nem volt különbség a normotenzív (WKY) és hipertenzív (SHR) állatok között (ASI: WKY: 3.79 ± 0.46 , SHR: 3.86 ± 0.41 , NS). A normotenzív állatok ASI értéke a 32 hetes vizsgálati időszak során nem változott. Az SHR állatok esetében azonban ez az érték jelentősen megemelkedett (42 hetes állatok: WKY-C: 4.1 ± 0.1 , WKY-L: 3.98 ± 0.2 , SHR-C: 5.8 ± 0.3 , SHR-L: 4.3 ± 0.4 , $p < 0.05$; SHR-C vs. WKY-C és WKY-L). A PARP-gátló L-2286 kezelés jelentősen mérsékelte a hipertenzió indukálta aorta stiffness emelkedést (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.05$) (28. ábra).

5.3.12. Az érfal kollagéntartalmának változása hipertenzió és PARP-gátló kezelés hatására

Masson's trikróm festést használtunk az érfali fibrózis mértékének meghatározásához. A legjelentősebb kollagén tartalmat a nem kezelt hipertenzív patkányok (SHR-C)

aortájában találtuk (WKY-C: $19.22 \pm 0.8\%$, WKY-L: $19.55 \pm 0.73\%$, SHR-C: $27.62 \pm 1.45\%$, SHR-L: $21.24 \pm 0.63\%$; $p < 0.05$ SHR-C vs. WKY-C).

PARP-gátló alkalmazása esetén a magas vérnyomású állatokban (SHR-L) a fibrózis mértéke alacsonyabb volt (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.05$), de a normotenzívek értékét nem érte el (SHR-L vs. WKY-L $p < 0.05$) (29. ábra A–D).



29. ábra. A-D: L-2286 kezelés hatása az intersticiális kollagén lerakódásra. Reprezentatív Masson's trikróm módszer szerint festett szövettani metszetek, illetve a kötőszövetes átépülés fokának denzitometriás meghatározása ($n = 4$). A: WKY-C állat aortájából készült metszet, B: WKY-L állat aortájából készült metszet, C: SHR-C állat aortájából készült metszet, D: SHR-L állat aortájából készült metszet.

* $p < 0.05$ SHR-C vs. WKY-C, SHR-L, # $p < 0.05$ SHR-L vs. WKY-C, WKY-L

E-I: 42 hetes állatok aortafalából készült reprezentatív elektronmikroszkópos metszetek. Lu: lumen, bm: bazál membrán, sm: simaizomsejt, el: lamina elastica interna, e: endotél. E-F: WKY állat aortája, G-H: SHR-C patkány aortája, I: SHR-L csoportba tartozó állat aortája.

5.3.13. Az aortafal ultrastrukturális változásainak vizsgálata hipertenzív patkányokban

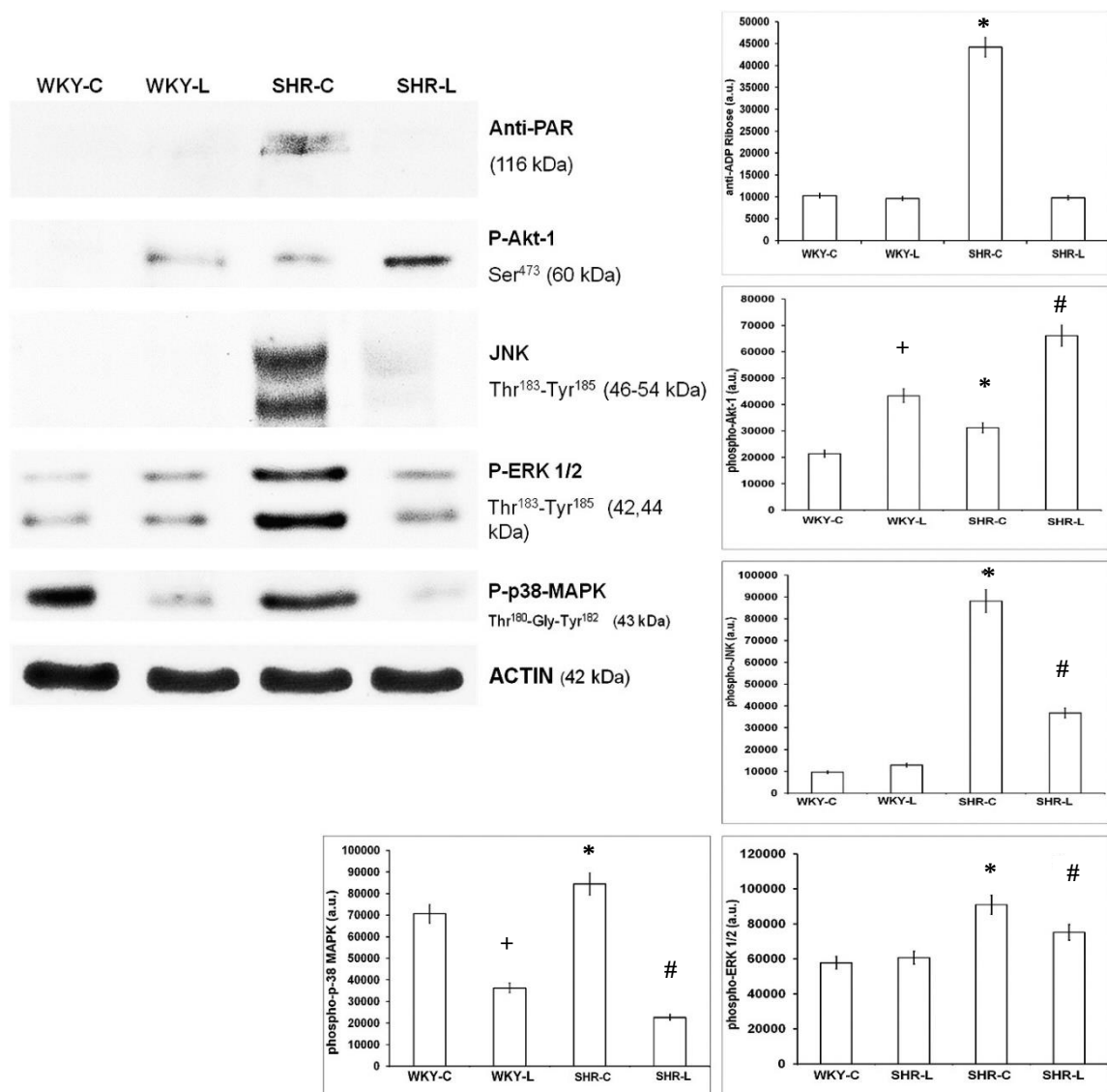
A WKY patkányok aortafalának elektronmikroszkópos vizsgálata intakt szerkezetet mutatott (29. ábra). Nem kezelt SHR állatokban (SHR-C) a krónikusan magas vérnyomás jelentős változásokat idézett elő az aortafal struktúrájában. Az endotélsejtek esetében

aktiváció volt észlelhető, sejtmagjaik szegmentálttá váltak, citoplazmájuk extrém módon kiszélesedett (29. ábra G és H). A lamina elastica interna több helyen felszakadozott és a media simaizomsejtjeinek a nyúlványai behatoltak ezen keresztül a szubendotéliumba és a lumenbe is (29. ábra H). A szubendoteliális tér is kiszélesedett és az aktivált fibroblasztok által termelt nagy mennyiségű kollagén rostok a bazál membrán károsodását okozták (29. ábra G és H). “gombaszerű” kollagén rostokat tartalmazó képződmények törték át az endotél sejtek rétegét és a lumenbe boltosultak be. A simaizomsejtek által termelt nagy mennyiségű elasztikus rostok nem rendezetten helyezkednek el, hanem random módon és károsítják a normál rétegeket (29. ábra H).

A PARP enzim gátlása L-2286-al (SHR-L) jelentősen jobb érfali morfológiát eredményezett a hipertenzív állatokban. Habár az endotél sejtek aktivációja ebben a csoportban is megfigyelhető volt, az érfali rétegek folytonossága intakt maradt. A kollagén és elasztikus rostok mennyisége kisebb volt az SHR-L csoportban az SHR-C állatokhoz képest. Így a bazál membránt sem törik át a simaizomsejtek, illetve kollagén rostok. A PARP-1 enzim farmakológiai gátlása jelentős védő hatással rendelkezik a hipertenzio által kiváltott vaszkuláris remodellingre a simaizomsejtekre és a fibroblasztokra gyakorolt kedvező hatása által (29. ábra I).

5.3.14. Az L-2286 kezelés hatása az aorta falában a fehérjék poli(ADP-ribozil)ációjára

Érfali mintákban határoztuk meg a fehérjék poli(ADP-ribozil)ációját (PAR), hogy igazoljuk az alkalmazott L-2286 hatékonyságát. Western blot analízis alapján a nagyerek falában a fehérjék PARilációja az SHR-C csoportban volt a legmagasabb. Ez az emelkedés L-2286 kezeléssel jelentősen mérsékelhető volt ($p < 0.05$ vs. SHR-C) (30. ábra).



30. ábra. L-2286 kezelés hatása az Akt-1^{Ser473}, JNK^{Thr183-Tyr185}, ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} és p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} foszforilációjára normotenzív és hipertenzív patkányok aortájának falában. Reprezentatív Western blot képek, illetve az Akt-1^{Ser473}, JNK^{Thr183-Tyr185}, ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} és p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} foszforilációjának és a PARiláció mértékének denzitometriás meghatározása (n=4). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. *p<0.05 SHR-C vs. WKY-L, #p<0.05 SHR-L vs. SHR-C, +p<0.05 WKY-L vs. WKY-C.

5.3.15. Az L-2286 kezelés hatása az Akt-1 és a MAP kinázok foszforilációs státuszára SHR állatok aortájában

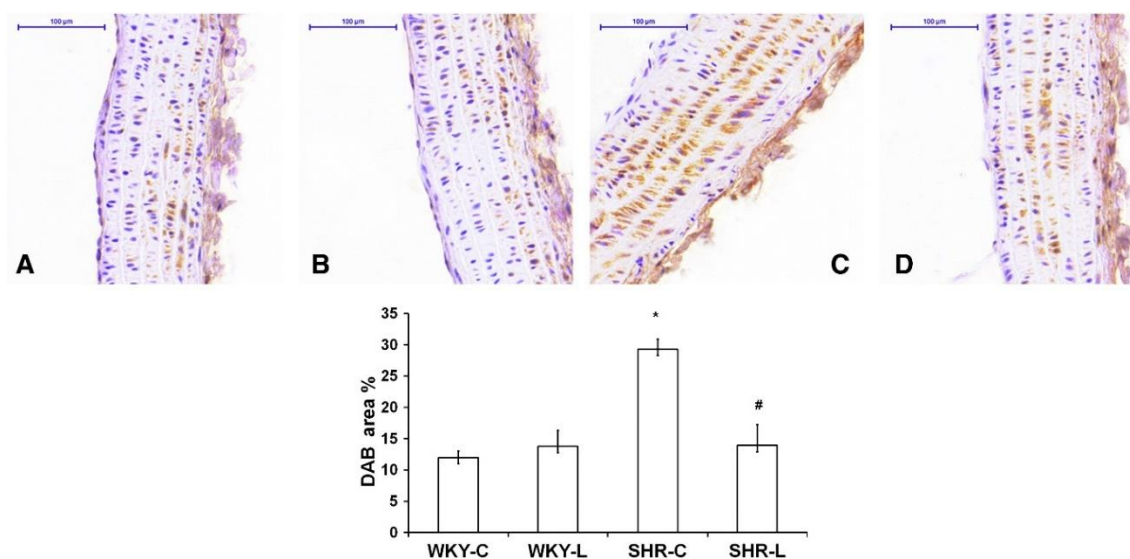
Akt-1^{Ser473} foszforiláció mértéke igen alacsony volt a 42 hetes WKY-C patkányokban, mely a hipertenzív állatokban (SHR-C) jelentősen magasabbnak adódott ($p < 0.05$ vs. WKY-L). L-2286 kezelés (SHR-L) a foszforiláció mértékét tovább növelte ($p < 0.05$ vs. SHR-C). A PARP-gátló L-2286 kezelés nem stresszelt normotenzív állatokban (WKY-L) is fokozta az Akt-1^{Ser473} foszforilációt ($p < 0.05$ vs. WKY-C) (30. ábra).

A MAP kinázok – p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}, JNK és ERK1/2^{Thr183-Tyr185} – esetében a normotenzív állatokban észlelt foszforiláció mértéke jelentősen nőtt a kezeletlen SHR állatokban (SHR-C vs. WKY-C, $p < 0.05$). Ezen változások L-2286 kezelés hatására jelentősen mérséklődtek (SHR-C vs. SHR-L, $p < 0.01$) (30. ábra).

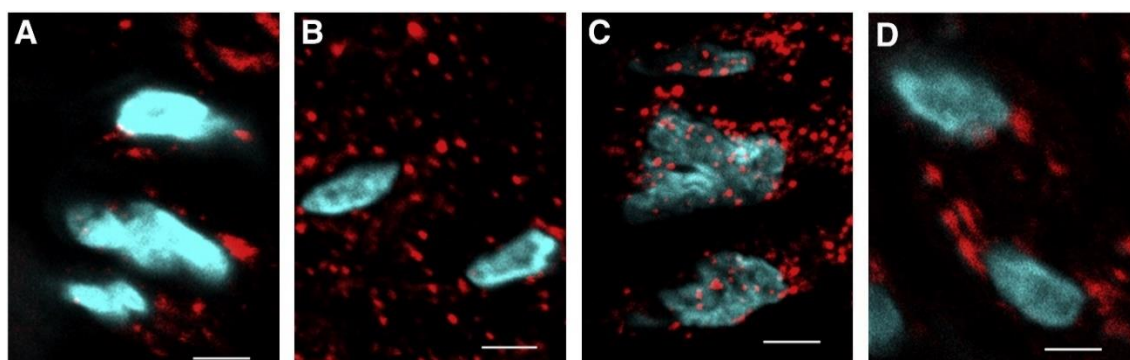
5.3.16. PARP-gátlás hatása az oxidatív stressz markereire és az AIF nukleáris transzportjára SHR állatok aortájában

Az oxidatív stressz meglétének igazolására és mértékének meghatározására a 4-HNE, egy lipid peroxidációs termék mennyiségét határoztuk meg (WKY-C: $11.98 \pm 1.02\%$, WKY-L: $13.76 \pm 2.53\%$, SHR-C: $29.26 \pm 1.61\%$, SHR-L: $13.9 \pm 3.29\%$) (31. ábra) [147]. A normotenzív csoportok állatainak (WKY-C és WKY-L) aorta falában alig volt kimutatható a 4-HNE jelenléte (31. ábra A és B). Ezzel ellentétben hipertenzív állatokban (SHR-C) a 4-HNE mennyisége jelentősen megemelkedett (SHR-C vs. WKY-C és WKY-L, $p < 0.05$) (31. ábra C). PARP-gátló kezelésben részesült SHR állatok esetében (SHR-L) ez az emelkedés jóval mérsékeltebb volt (SHR-L vs. SHR-C $p < 0.05$) (31. ábra D).

Normotenzív patkányokban (WKY-C és WKY-L) az apoptózis indukáló faktor (AIF) csak a sejtek citoplazmájában volt megtalálható (32. ábra A és B), de hipertónia hatására az SHR-C csoportban jelentős fokú nukleáris transzlokáció volt észlelhető. L-2286 kezelés hatására az AIF transzlokáció szignifikánsan csökkent hipertenzív állatokban ($p < 0.05$ SHR-L vs. SHR-C) (32. ábra C és D).



31. ábra. 4-hydroxynonenal (4-HNE) mennyiségének immunohisztokémiai meghatározása. A-D: Reprezentatív immunohisztokémiai képek 4-HNE ellenes antitesttel kezelt aorta metszetekből. A 4-HNE mennyiségét és lokalizációját a barna festődés mutatja. DAB denzitometriás meghatározásának (n=4) eredményét mutatja a grafikon. A: WKY-C állat aortájából készült metszet, B: WKY-L állat aortájából készült metszet, C: SHR-C állat aortájából készült metszet, D: SHR-L állat aortájából készült metszet.

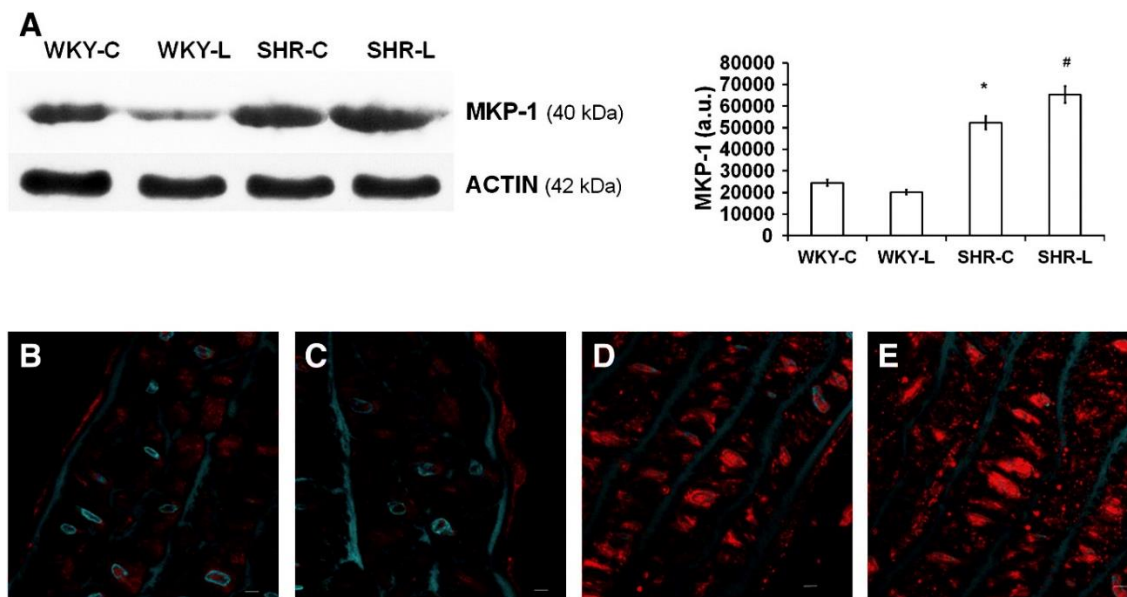


32. ábra A-D: Reprezentatív egyesített konfokális képek az AIF sejten belüli elhelyezkedéséről, nukleáris transzlokációjáról. Az AIF immunoreaktivitást a vörös festődés mutatja. A sejtmagokat Hoechst magfestés rajzolja ki (kék színű). A képeken látható vonalas mérték 150 µm-t jelöl. A: WKY-C állat aortájából készült metszet, B: WKY-L állat aortájából készült metszet, C: SHR-C állat aortájából készült metszet, D: SHR-L állat aortájából készült metszet.

5.3.17. A PARP-gátlás hatása az aortafalban az MKP-1 expresszió mértékére és az NF- κ B aktivációra

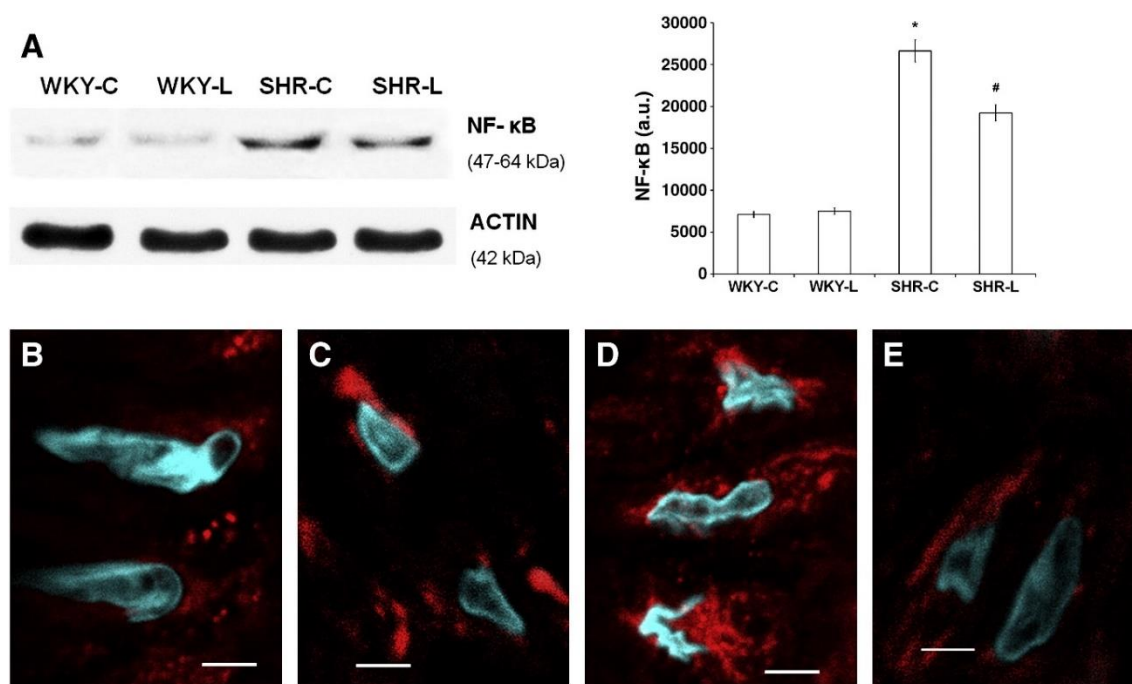
Érfali mintákban a Western-blottal és immunofluoreszcens módon meghatározott MKP-1 mennyisége jelentősen emelkedett volt kezeletlen hipertenzív állatokban (SHR-C) normotenzív WKY patkányokhoz viszonyítva (SHR-C vs. WKY-C és WKY-L, $p < 0.05$). A PARP enzim gátlása L-2286 adásával tovább növelte az MKP-1 mennyiségét hipertenzív patkányok aortafalában (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.05$) (33. ábra).

Normotenzív patkányokban (WKY-C és WKY-L) az NF- κ B csak a citoplazmában volt megtalálható. Hipertenzív kontroll állatokban (SHR-C) az NF- κ B nagy része a sejtmagban volt látható immunofluoreszcenciával. Ez a nukleáris transzlokáció jelentősen mérséklődött a PARP-gátló L-2286-al végzett kezelés hatására (SHR-L) (34. ábra). Emellett Western-blottal mérve az NF- κ B mennyisége is megemelkedett hipertenzív állatokban (SHR-C vs. WKY-C és WKY-L, $p < 0.05$), mely kisebb mértékű volt az SHR-L csoportban (SHR-L vs. SHR-C $p < 0.05$) (34. ábra).



33. ábra. A: L-2286 kezelés hatása az MKP-1 expressziójára normotenzív és hipertenzív patkányok aortájában. Denzitometriás meghatározás ($n=4$). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtuk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. * $p < 0.05$ SHR-C vs. WKY-C, WKY-L és SHR-L, # $p < 0.05$ SHR-L vs. WKY-C és WKY-L.

B-E: Reprezentatív egyesített konfokális képek az MKP-1 nukleáris lokalizációjáról. MKP-1 immunoreaktivitást a vörös festődés mutatja. A sejtmagokat Hoechst magfestés rajzolja ki (kék színű). A képeken látható vonalas mérték 150 μ m-t jelöl. B: WKY-C állat aortájából készült metszet, C: WKY-L állat aortájából készült metszet, D: SHR-C állat aortájából készült metszet, E: SHR-L állat aortájából készült metszet.

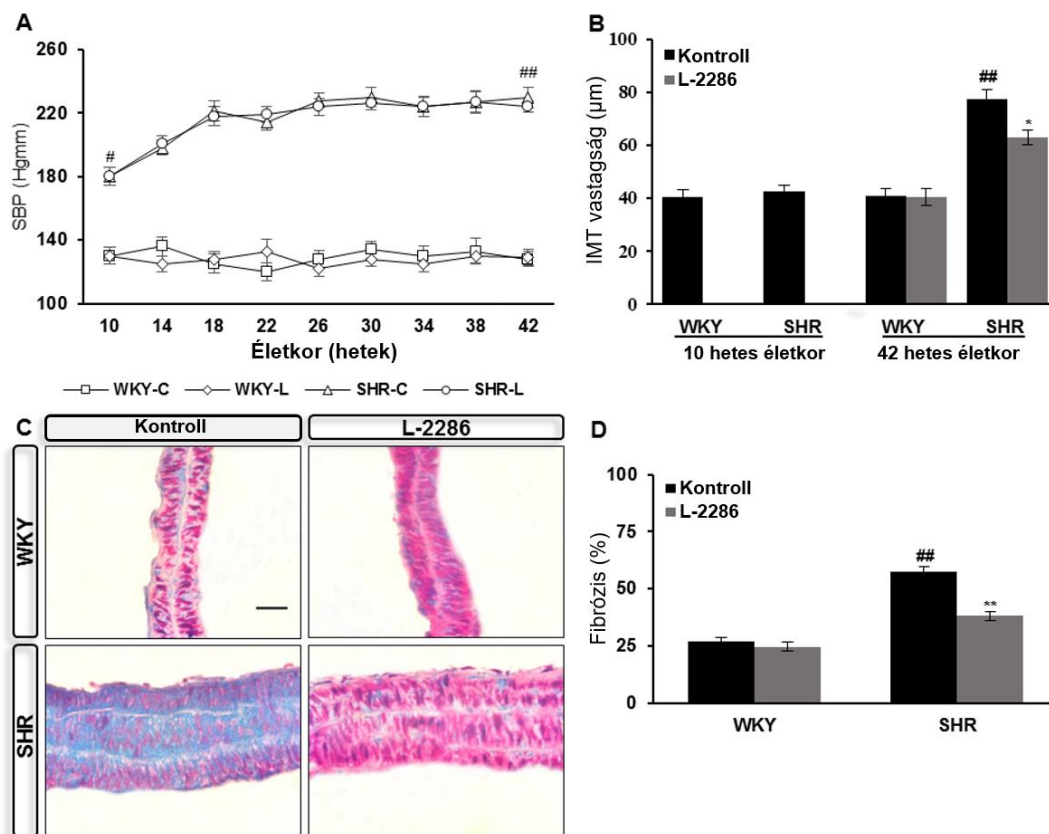


34. ábra. A: L-2286 kezelés hatása az NF-κB foszforilációjára normotenzív és hipertenzív állatok aortájában. Denzitometriás meghatározás (n=4). Aktint a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtuk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. *p<0.05 SHR-C vs. WKY-C, WKY-L, SHR-L, #p<0.05 SHR-L vs. WKY-C, WKY-L.

B-E: Reprezentatív egyesített konfokális képek az NF-κB nukleáris lokalizációjáról. NF-κB immunoreaktivitást a vörös festődés mutatja. A sejtmagokat Hoechst magfestés rajzolja ki (kék színű). A képeken látható vonalas mérték 150 μm-t jelöl. B: WKY-C állat aortájából készült metszet, C: WKY-L állat aortájából készült metszet, D: SHR-C állat aortájából készült metszet, E: SHR-L állat aortájából készült metszet.

5.3.18. L-2286 kezelés csökkenti a carotisok struktúrális átépülését SHR patkányokban

A szisztolés vérnyomás az SHR állatokban már a kezelés megkezdése előtt is jelentősen magasabb volt, mint a kontrollként használt WKY patkányokban (SHR vs. WKY, $p < 0.05$) (35. ábra). Ez a különbség a kezelési időszak során mindvégig jelen volt, sőt az idő előrehaladtával még nőtt is (42 hetes korban $p < 0.01$ SHR csoportok vs. WKY csoportok). L-2286 kezelés nem befolyásolta a szisztolés vérnyomás értékeit a kezeletlen csoportokhoz képest.



35. ábra. L-2286 kezelés a vérnyomás csökkentése nélkül mérsékli a carotis artériák struktúrális remodellingjét. (A) Szisztolés vérnyomás a kezelési időszak során, 4 hetente mérve. (B) A carotis artériák vaszkuláris ultrahanggal mért intima-média vastagsága (IMT) a kezelés elején és végén. (C). Reprezentatív Masson's trikróm módszer szerint festett szövettani metszetek (vonalas mérték 30 μm), illetve a kötőszövetes átépülés fokának denzitometriás meghatározása (D) ($n = 4$).

Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. WKY-C; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. megfelelő kontroll csoport.

Tartós magas vérnyomás következtében kialakult verőér átépülést elsősorban az érfalak megvastagodása jellemzi. Ennek hátterében a simaizomsejtek hipertrófiája és a fokozott intersticiális fibrózis áll [148, 149]. Az érfali vastagságot a carotisok intima-media vastagságának (IMT) mérésével határoztuk meg. A kiindulási értékek még nem különböztek jelentősen a hipertenzív és normotenzív törzsek között (35. ábra). 42 hetes életkorra azonban jelentősen eltérő IMT értékek voltak észlelhetők a csoportok között. A kezeletlen SHR (SHR-C) állatokban a carotisok IMT értéke közel duplája volt a normotenzívekhez (SHR-C vs. WKY-C, $p < 0.01$) képest. SHR állatokban a PARP-gátlás jelentősen mérsékelte ezt a kedvezőtlen folyamatot (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.05$) (35. ábra B). Masson's trikróm festett metszetek vizsgálatával az SHR-C állatok carotisaiban jelentős kötőszövetes felszaporodás volt látható (SHR-C) 42 hetes életkorra (SHR-C vs. WKY-C, $p < 0.01$) (35. ábra C és D). Kezelt hipertenzív állatokban jelentősen mérsékeltebb volt az érfali kollagénfelszaporodás mértéke a kontroll csoporthoz viszonyítva (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.01$) (35. ábra C és D). Ez a védő hatás független volt a vérnyomástól, mivel az L-2286 nem befolyásolta azt egyik törzsben sem (35. ábra A).

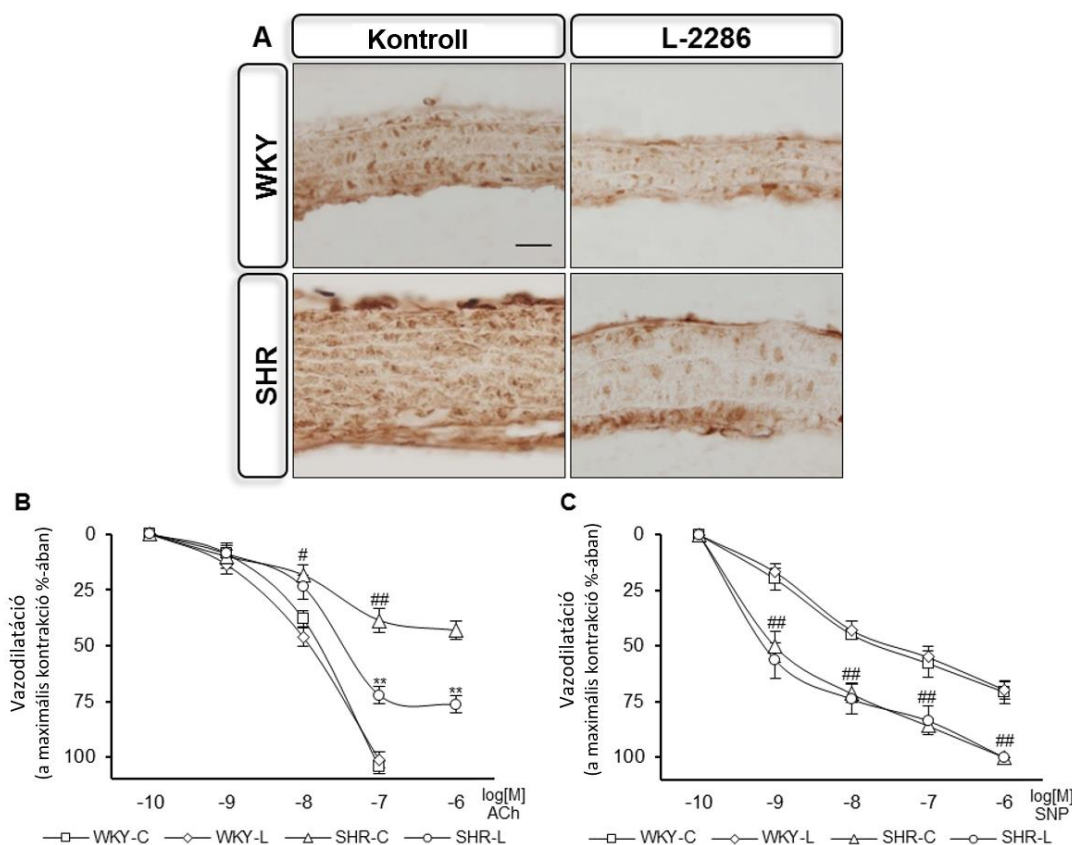
5.3.19. PARP-gátlás mérsékli az SHR állatok carotisaiban észlelt fokozott peroxinitrit képződést és az endotél diszfunkciót

A hipertónia pathogenezisében fontos szerepet játszik az oxidatív stressz. A jelentős mennyiségű O_2^- az érrendszerben vazoregulációs zavarokhoz vezet azáltal, hogy a vazodilatátor hatású NO-val reagálva egy igen reaktív anyagot, ONOO⁻-t hoz létre. Ez nukleinsavakkal, fehérjékkel és lipoproteineket reagálva további szövetkárosodást és vaszkuláris diszfunkciót okoz. Immunohisztokémiai módszerrel vizualizálva a carotis artériák falában a peroxinitrit által nitrozilált fehérjéket és lipoproteineket (NT), jelentősen magasabb értékeket észleltünk SHR-C patkányokban a normotenzív állatokhoz viszonyítva (36. ábra A) [150]. Krónikus L-2286 kezelés csökkentette az oxidatív stressz és az NT képződést mindkét törzsben (WKY és SHR).

Izolált artéria carotis communisokat (CCA) 60 mM KCl prekontraháltuk növekvő dózisú ACh (36. ábra B) vagy SNP (36. ábra C) jelenlétében. A kiváltott maximális kontrakció mértéke és a kontrakciós erő hasonló volt a különböző csoportokban. ACh magasabb

dózisainál az SHR és WKY patkányok vazodilatációs válaszgörbéi szétváltak. 10^{-6} M ACh alkalmazásakor a normotenzív állatokban a KCl-indukálta falfeszülés teljesen visszafordítható volt, a kezeletlen hipertenzív állatokban azonban ez a hatás csak marginális volt (SHR-C vs. WKY, $p<0.01$). L-2286 javította az endotélium-függő vazorelaxációt CCA érgyűrűkön (SHR-L vs. SHR-C, $p<0.01$).

SNP egy NO donor molekula, hatása a vaszkuláris simaizomsejt funkciótól függ. Hipertenzív állatok esetében hiperreaktivitás volt látható a normotenzívekhez képest (36. ábra C). L-2286 kezelés alig változtatta a vazomotor választ SHR állatokban (NS, SHR-L vs SHR-C).



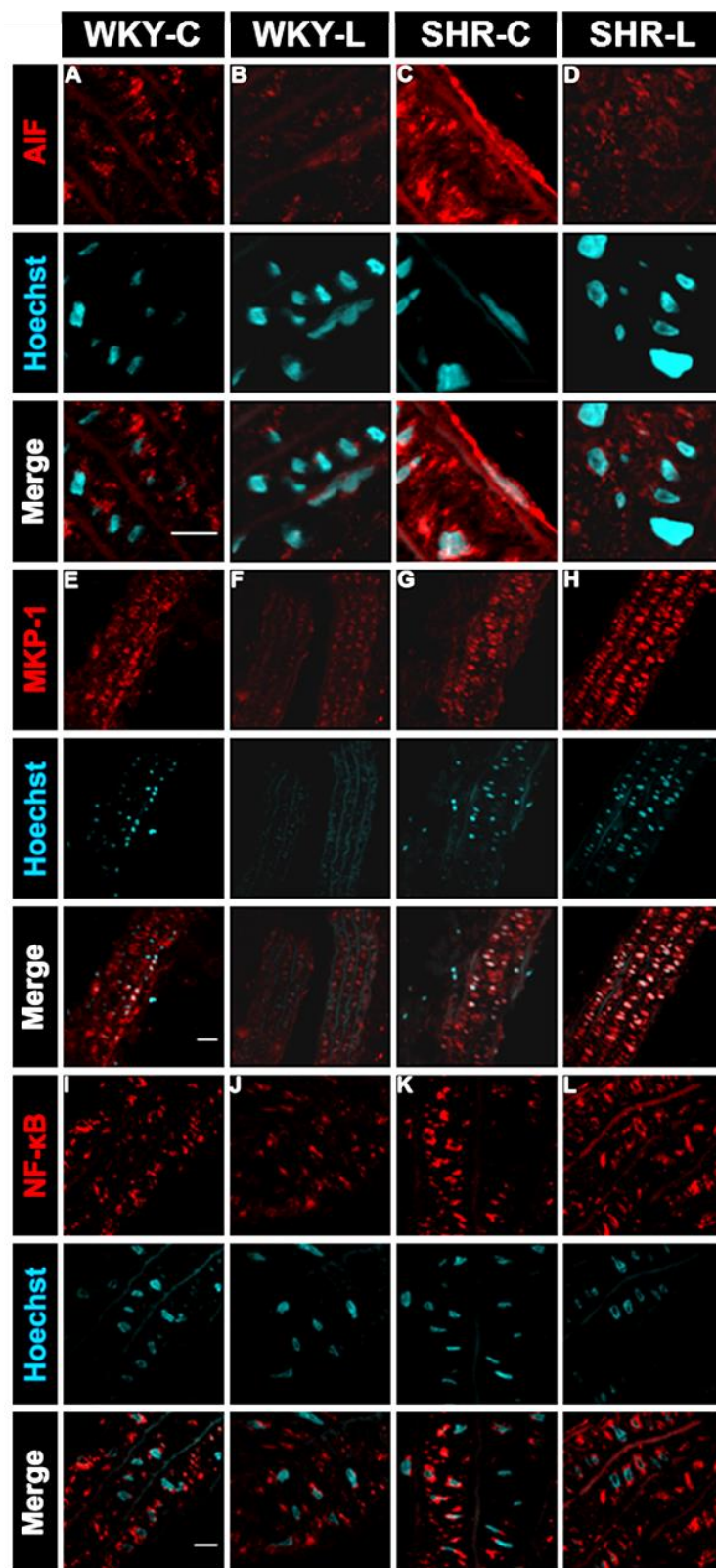
36. ábra. L-2286 csökkenti az endotél diszfunkciót és a nitrotirozin (NT) képződés mértékét SHR állatok carotisában. (A) Reprezentatív immunohisztokémiai képek NT ellenes antitesttel kezelt carotis metszetekből (vonalas mérték 30 μ m). (B, C) Izolált carotis gyűrűk vazorelaxációs tulajdonságai 60 mM KCl-os prekontrakciót követően (B) ACh vagy (C) SNP jelenlétében. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

$p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. WKY-C; ** $p<0.01$ vs. megfelelő kontroll csoport.

5.3.20. Hipertenzív állatok carotisaiban az L-2286 kezelés mérsékli az AIF és NF- κ B transzlokációt, illetve módosítja az MKP-1 - MAPK jelátviteli út aktivitását

Akut stressz szituációkban a PARP-1 aktivitás gátlásának egyik legismertebb következménye a sejthalál csökkentése. Emellett a PARP-gátlás a sejtenergetikára és a jelátvitelre kifejtett hatásának következtében a nekrotikustól az apoptotikus sejthalál irányába tolja el azt, mely által csökken a környező sejtek-szövetek károsodása [151]. Tartósan fennálló hipertenzió esetében is jelenős szerepe van a sejthalálnak, ezért krónikus modellünkben azt vizsgáltuk, hogy a PARP-1 milyen szerepet játszik ezen folyamatok kialakulásában. A jelentős PARP-1 aktiválódás által kiváltott sejthalál folyamatában az AIF kiszabadulása a mitokondriális intermembrán térből és a sejtmagba történő transzlokációja a következményes DNS degradációval jelentős szerepet játszik [152]. Normotenzív állatokban az AIF alig mutatott ko-lokalizációt a magfestődéssel konfokális mikroszkópia során. Ez a jelenség igen kifejezetté vált a kezeletlen hipertenzív csoportban (SHR-C) (37. ábra C). L-2286 kezelés az AIF transzlokációt szinte teljesen megakadályozta a kezelt SHR (37. ábra D) és normotenzív patkányokban (37. ábra A és B).

Az érfal különböző rétegeiben a hipertenzió által kiváltott fenotípus változások részben a gyulladásos folyamatok által vannak szabályozva. A gyulladás kiváltásában az NF- κ B központi szerepet játszik [153]. Emellett a MAP kinázok aktivitásában az oxidatív és mechanikai stressz hatására létrejövő változások is jelentős szerepet játszanak [63]. Munkacsoportunk korábbi adatai azt igazolták, hogy a PARP-1 enzim farmakológiai gátlása, vagy RNS szintű interferenciával történő blokkolása oxidatív stressz során emeli az MKP-1 celluláris mennyiségét [154, 155]. Az MKP-1 a MAP kinázok egy igen fontos upstream regulátora, ezért mennyiségének változása jelentősen képes befolyásolni a MAP kinázok aktivitását és ezen keresztül a remodelling folyamatát [156]. Krónikus állatkísérletünk során immunfluoreszcens módszerrel a carotis artériákban fokozott MKP-1 expressziót észleltünk a kontroll SHR állatokban (37. ábra G) a normotenzív WKY csoporthoz képest (37. ábra E és F). Ez az emelkedés jelentősen fokozódott az L-2286-al kezelt állatokban (SHR-L) (37. ábra H).

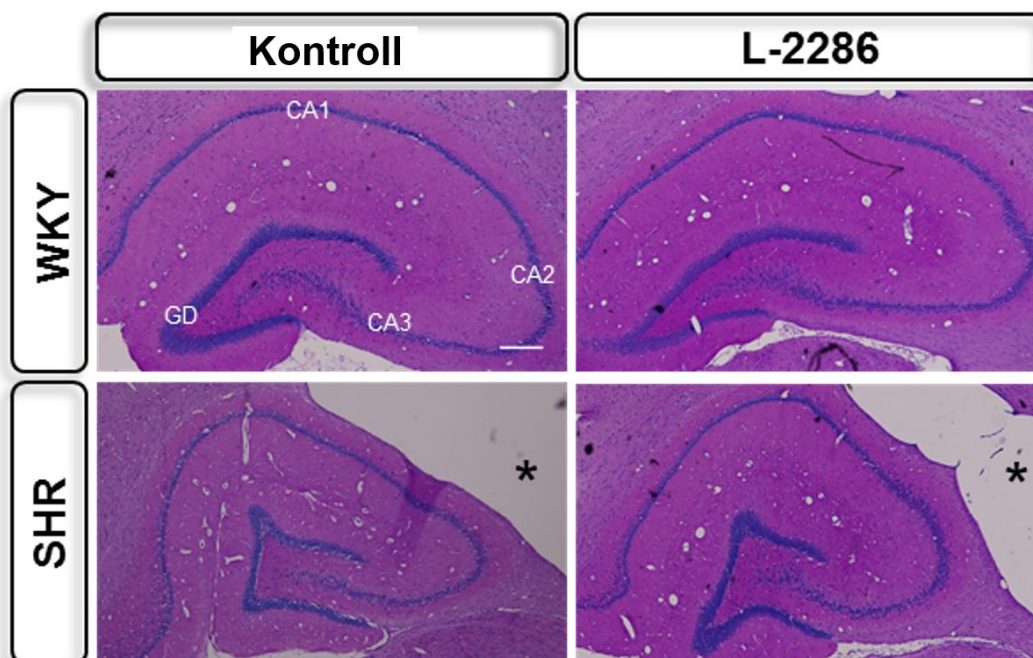


37. ábra: Az AIF és NF- κ B szubcelluláris eloszlása, valamint az MKP-1 expressziója normotenzív és hipertenzív állatok ereiben. (A-D) AIF nukleáris transzlokációja carotis artériában (A) WKY-C, (B) WKY-L, (C) SHR-C és (D) SHR-L állatok (vonalas mérték: 10 μ m). (E-F) Az MKP-1 mennyisége (E) WKY-C, (F) WKY-L, (G) SHR-C és (H) SHR-L állatokban (vonalas mérték: 25 μ m). (I-L) NF- κ B szubcelluláris eloszlása (I) WKY-C, (J) WKY-L, (K) SHR-C és (L) SHR-L állatokban (vonalas mérték: 10 μ m).

Mivel a PARP-1 fontos koregulátora az NF- κ B-nek a gyulladásos folyamatokban [157], ezért ennek mennyiségét is meghatároztuk. Kontroll hipertenzív patkányokban (SHR-C) az NF- κ B jelentős aktiválódását és nukleáris transzlokációját észleltük (36. ábra K) a WKY csoportokhoz viszonyítva, amelyekben az NF- κ B elsősorban az extranukleáris kompartmentben volt megtalálható konfokális mikroszkópiával (37. ábra I és J). Ez a folyamat gátolható volt L-2286 kezeléssel SHR állatok carotisaiban (37. ábra L).

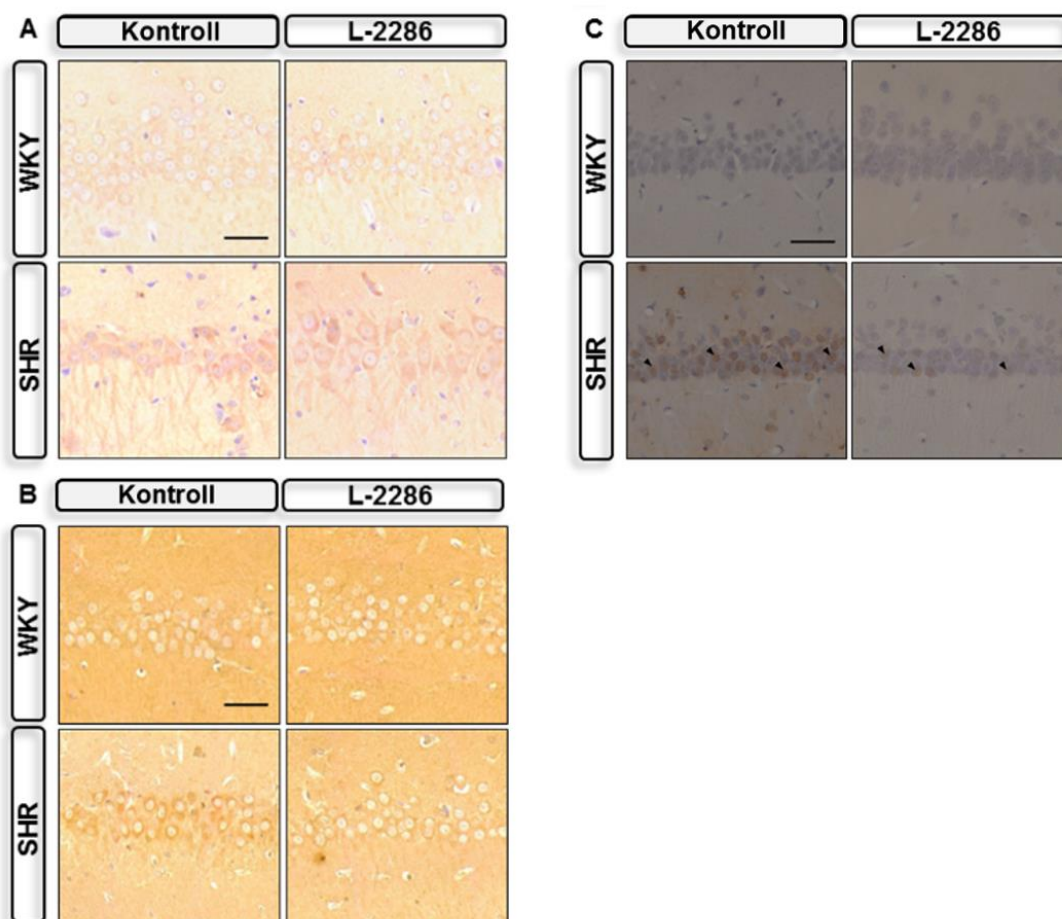
5.3.21. A dorzális hippocampus struktúrális eltérései és az oxidatív stresszmarkerek változásai hipertenzív patkányokban

A krónikus magas vérnyomás központi idegrendszeri hatásainak vizsgálatára a dorzális hippocampus egy megfelelő agyterület, mivel érzékeny az oxidatív sejtkárosodásra és jellegzetes formája miatt könnyű a különböző területek azonosítása és lokalizálása [158]. Vizsgálatunkban a szisztémás farmakológiai PARP-gátlás hatását vizsgáltuk az oxidatív stresszmarkerekre és a következményes struktúrális elváltozásokra SHR állatokban.



38. ábra. Krónikus magas vérnyomás kiváltotta struktúrális elváltozások patkány dorzális hippocampusában. Dorzális hippocampusból származó PAS festett metszetek (vonalas mérték: 200 μ m). GD, gyrus dentatus; CA1: cornu ammonis 1; CA2: cornu ammonis 2; CA3: cornu ammonis 3; * oldalkamra (ventriculus lateralis).

Makroszkópos képeken a hipertenzív patkányok agyában az agykamrák tágulatát láttuk. Emellett PAS módszer szerint festett metszeteken a dorzális hippocampus jellegzetes elváltozásokat mutatott SHR állatokban (38. ábra). A mediolateralis tengely rövidülése, a gyrus dentatus deformációja a csúcs ellapulásával volt a leginkább szembevető elváltozás hipertenzív állatok agyában, mely eltéréseket primeren valószínűleg a 3. agykamra és az oldalkamra kitágulása által kifejtett nyomás okozott (SHR-C). Noha az L-2286 kezelés nem csökkentette jelentősen ezen malformációk kialakulását (SHR-L), azonban a hippocampust ellátó erek struktúrája sokkal intaktabb volt ezen állatokban. A kontroll SHR állatokban ezen erek lumene irreguláris volt. Emellett lacunaris perivaszkuláris fehérállomány károsodások is észlelhetők voltak SHR-C patkányokban. Ez utóbbi elváltozás WKY állatokban nem volt kimutatható, L-2286 kezelt SHR-ekben pedig jóval ritkábban fordultak elő (38. ábra).



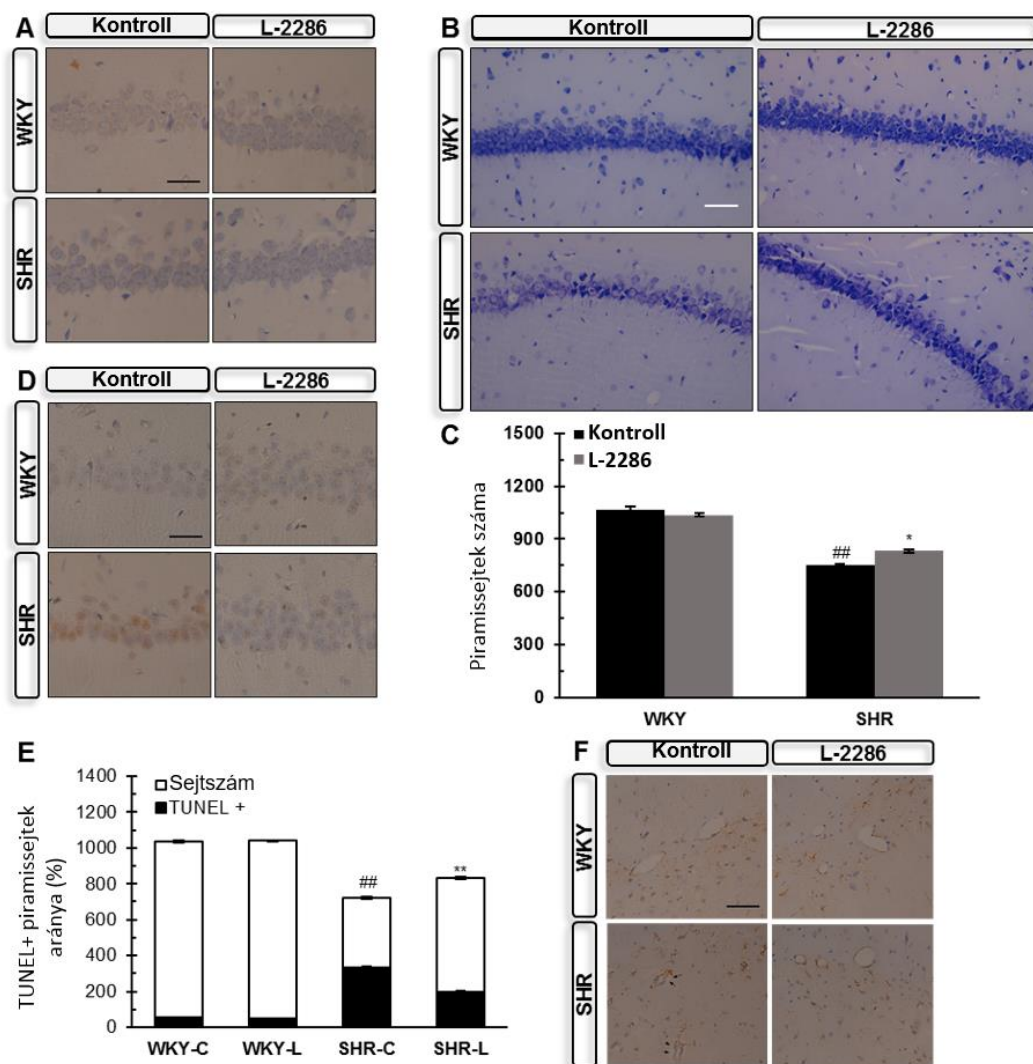
39. ábra L-2286 alkalmazása csökkenti az idegszövet oxidatív károsodását SHR állatokban. (A) CA1 régió NT és (B) HNE festése jelzi a dorzális hippocampus piramis sejtjeinek nitrozatív károsodását és a lipid peroxidáció mértékét (vonalas mérték 50 μ m). Reprezentatív immunohisztokémiai képek 8-oxG ellenes antitesttel kezelt metszetekből (C), ► néhány pozitívan festődő sejtmagot jelez (vonalas mérték 50 μ m).

5.3.22. Az L-2286 kezelés csökkentette az oxidatív sejtkárosodás mértékét SHR állatok dorzális hippocampusában

Hogy meghatározzuk a központi idegrendszer oxidatív sejtkárosodásának mértékét, NT (39. ábra A) és 4-HNE (39. ábra B) ellenes antitestekkel kezeltük az agyi metszeteket. Hipertónia jelentősen fokozta a fehérjék tirozin oldalláncának nitrozilációját (NT), illetve a lipid peroxidáció (4-HNE) mértékét kezeletlen SHR állatok hippocampusában (SHR-C). L-2286 kezelés mellett mind az NT, mind a 4-HNE mennyisége jelentősen alacsonyabb volt, amely az oxidatív stressz mértékének csökkentésére utal. Az oxidánsok a DNS-t is károsítják. Ezt a károsodást a 8-oxoG mennyiségének meghatározásával lehet jellemezni. Jelen vizsgálatunkban a CA1 régió piramis sejtjeiben határoztuk meg a 8-oxoG mennyiségét (39. ábra C). SHR-C állatokban a sejtmagok nagyobb része jelölődött 8-oxoG-vel, mint a normotenzív csoportokban (WKY-C és WKY-L). L-2286 jelentősen csökkentette a DNS károsodás mértékét hipertenzív állatokban (SHR-L).

5.3.23. Krónikus L-2286 kezelés csökkentette a hipertónia által indukálta piramis sejtszám csökkenést a hippocampus CA1 areájában

Meghatároztuk az oxidatív sejt-, illetve DNS károsodás következtében kialakuló PARP-1 aktiváció mértékét SHR állatok agyának CA1 régiójában. Immunohisztokémiai meghatározással a poli(ADP-ribóz)-polimer/PAR jelölődést vizsgáltuk, melynek során az SHR-C állatok CA1 piramissejtjeinek magjában kifejezett széli jelölődést észleltünk (40. ábra A) (hasonlóan a 8-oxoG jelöléshez - (39. ábra C)). WKY állatokban alacsonyabb festődést észleltünk. A PARP-1 enzim gátlása L-2286 kezeléssel jelentősen csökkentette a PAR jelölődés intenzitását mind hiper-, mind normotenzív állatokban.



40. ábra. L-2286 kezelés mérsékli a PAR képződést, valamint a sejtvésztes és a reaktív astrogliosis mértékét SHR patkányok dorzális hippocampusában. (A) PAR-polimer képződés a CA1 régióban (vonalas mérték 50 μm). (B-C), (B) A dorzális hippocampus CA1 régiójából származó reprezentatív krezil ibolya módszerrel festett metszetek (vonalas mérték 50 μm). (C) Piramis sejtszám a CA1 areában. (D-E) Reprezentatív immunohisztokémiai képek TUNEL módszer szerint festett metszetekből (D) (vonalas mérték 50 μm) és (E) a TUNEL+ pozitív sejtek aránya az össz sejtszámhoz viszonyítva a CA1 régióban. (F) Reprezentatív immunohisztokémiai képek GFAP ellenes antitesttel kezelt metszetekből, melyek segítségével mérhető az astroglia populáció (vonalas mérték 50 μm), ►: perivaszkuláris lacunáris fehérállomány károsodás. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. ^{##}p<0.01 vs. WKY-C; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01 vs. SHR-C.

Mivel az oxidatív sejtkárosodás és a következményes excesszív PARP-1 aktiváció sejthalált okoz, meghatároztuk a CA1 régióban a piramis sejtek számát krezil ibolya módszerrel festett metszeteken (40. ábra B és C). SHR-C állatokban szignifikánsan alacsonyabb a sejtszám a normotenzívekéhez képest (SHR-C vs. WKY-C, p<0.01). Farmakológiai PARP-gátlás mellett hipertenzív állatokban a piramis sejtek száma

magasabb maradt a kezeletlen állatokhoz képest (SHR-L vs SHR-C, $p < 0.05$). A jelenség háttérében sejtvésztes állhat, ezért a piramissejteket TUNEL-tesztel vizsgáltuk, mely azokat a magokat jelöli, amelyek fragmentált DNS-t tartalmaznak (40. ábra D). A hipertenzív kontroll patkányokban (SHR-C) a csökkent piramissejtszámmal párhuzamosan a TUNEL+ sejtek számának a növekedését észleltük a CA1 régióban (SHR-C vs. WKY-C, $p < 0.01$). 32 hetes L-2286 kezelés a normotenzív állatokban nem okozott érdemi változást, azonban SHR patkányokban jelentősen csökkent a TUNEL+ sejtek számát (SHR-L vs. SHR-C, $p < 0.01$) (40. ábra D és E).

Az astroglia aktiváció az idegszövetben valamilyen celluláris stressz következtében alakul ki. Ennek során a glia sejtek hipertrofizálnak és hiperplázia is bekövetkezik abból a célból, hogy segítsék a neuronok és az endotél sejtek funkcióját a BBB létrehozásában [159]. Az intermedier filamentumok közé tartozó GFAP ellenes antitesttel jelöltük az agyi metszeteket, hogy meghatározzuk a glia sejtek perivaszkuláris eloszlását (40. ábra F). Az astrociták száma nem különbözött jelentősen a különböző patkány törzsek között, azonban méretük megnőtt, illetve a perivaszkuláris immunoreaktivitás mértéke is fokozódott SHR állatokban. 32 hetes L-2286 kezelés csökkentette az astroglia sejtek számát, méretét és perivaszkuláris felszaporodásuk mértékét SHR állatokban (SHR-L).

5.4. Rezveratrol hatása posztinfarktusos szívelégtelenség modellben

5.4.1. Rezveratrol kezelés javítja a gravimetriás paramétereket ISO-indukálta szívelégtelenség modellben

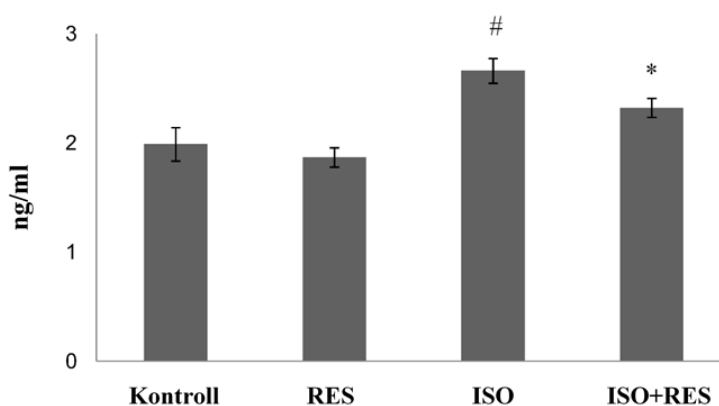
Az állatok testtömege sem a vizsgálat elején, sem a végén nem különbözött egymástól a különböző csoportokban. A balkamrai tömeg (VW) azonban jelentősen magasabb volt a posztinfarktusos csoportban ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Hasonló eredményt kaptunk a kamratömegnek a testtömegre (VW/BW), illetve a tibia hossza történt normalizálása során is ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Rezveratrol kezelés jelentősen mérsékelte a balkamra hipertrófia ezen jeleit posztinfarktusos állatokban ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO). Kontroll állatokban azonban a rezveratrol nem befolyásolta a gravimetriás paramétereket (13. táblázat).

	Kontroll	RES	ISO	ISO+RES
BW (g)	595.86±15.15	596.00±21.30	544.50±11.63	593.86±18.41
VW (g)	1.33±0.01	1.31±0.01	1.53±0.02#	1.35±0.01*
TL (mm)	51.43±0.72	51.57±0.72	50.86±0.55	49.86±0.35
VW/BW (mg/g)	2.25±0.06	2.21±0.08	2.81±0.06#	2.29±0.09*
VW/TL (mg/mm)	26.03±0.47	25.33±0.33	29.96±0.28#	27.02±0.13*

13. táblázat. Rezveratrol hatása kontroll és posztinfarktusos állatokban a gravimetriás paraméterekre. A gravimetria részleteit illetően utalunk a Módszerek fejezetre. BW: testtömeg, VW: kamratömeg, TL: jobb tibia hossza, VW/BW: kamratömeg/testtömeg, VW/TL: kamratömeg/tibiahossz. Kontroll: sem ISO, sem rezveratrol kezelésben nem részesült állatok, ISO: posztinfarktusos állatok, 8 héttel az ISO alkalmazása után; ISO+RES: rezveratrollal kezelt posztinfarktusos állatok; RES csak rezveratrol kezelésben részesült állatok. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. # $p < 0.05$ vs. Kontroll. * $p < 0.05$ vs. ISO.

5.4.2. Rezveratrol mérsékli a plazma BNP szintjét posztinfarktusos szívelégtelen állatokban

Az ISO csoportban a BNP szint szignifikánsan emelkedett volt 8 héttel a szívinfarktust követően ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Rezveratrol alkalmazása mérsékeltte ezt a változást ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO), amely arra utal, hogy alkalmazásával csökken a posztinfarktusos szívelégtelenség súlyossága. A nem stresszelt kontroll állatokban nem volt észlelhető érdemi eltérés a rezveratrol kezelt (RES), illetve nem kezelt (Kontroll) állatok között (41. ábra).



41. ábra. Rezveratrol gátolja a plazma BNP szint emelkedését posztinfarktusos patkányokban. A mérés részletei a Módszerek fejezetben találhatók. Kontroll: sem ISO, sem rezveratrol kezelésben nem részesült állatok ISO: posztinfarktusos állatok 8 héttel az ISO alkalmazása után; ISO+RES: rezveratrollal kezelt posztinfarktusos állatok; RES csak rezveratrol kezelésben részesült állatok. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. # $p < 0.05$ vs. Kontroll. * $p < 0.05$ vs. ISO.

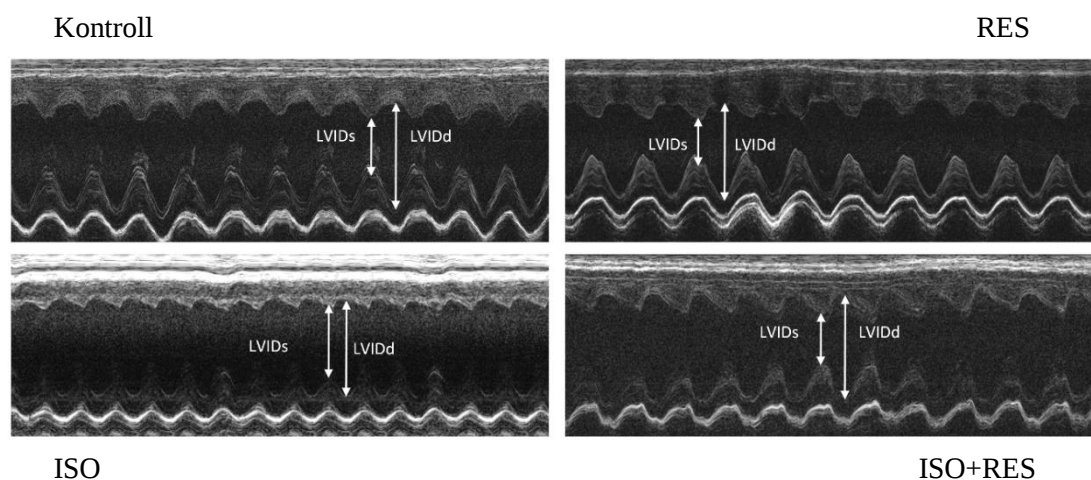
5.4.3. Rezveratrol javította a balkamra funkciót és mérsékeltte a balkamra hipertrófiát ISO-kezelt állatokban

A vizsgálat elején az állatok echocardiographiás paraméterei érdemben nem különböztek egymástól. A vizsgálat végére azonban a balkamra hipertrófiára utaló paraméterek (septum és PW vastagsága, illetve a kalkulált balkamra tömeg) szignifikánsan magasabbak voltak a posztinfarktusos csoportban a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Rezveratrol kezelés jelentősen csökkentette ezeket a kedvezőtlen változásokat ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO). A posztinfarktusos állatokban a szisztolés balkamra funkció (EF %) szignifikánsan csökkent a kontroll állatokhoz képest ($p < 0.05$,

ISO vs. Kontroll). A balkamra funkció csökkenését rezveratrol kezelés mérsékelte ($p<0.05$, ISO+RES vs. ISO) (14. táblázat, 42. ábra).

	Kiindulás	Kontroll	RES	ISO	ISO+RES
EF (%)	75.62±0.87	71.70±1.61	72.47±1.69	56.96±1.43 [#]	67.49±1.14 [*]
Septum (mm)	1.63±0.05	1.65±0.10	1.61±0.03	1.82±0.03 [#]	1.70±0.02 [*]
PW (mm)	1.57±0.03	1.59±0.07	1.59±0.03	1.81±0.06 [#]	1.60±0.02 [*]
LVIDd (mm)	8.19±0.11	8.44±0.22	8.43±0.17	7.88±0.12	8.41±0.23
LVIDs (mm)	4.42±0.08	4.85±0.09	4.69±0.19	5.70±0.2 [#]	4.90±0.12 [*]
LVEDV (μl)	364.23±10.38	393.36±19.32	386.40±16.82	365.54±6.64	401.59±18.63
LVESV (μl)	88.83±4.40	109.9±4.53	106.14±7.26	157.71±7.29 [#]	130.27±6.69 [*]
LV tömeg (kalk., mg)	994.1±21.8	1035.31±59.79	1038.38±44.44	1239.14±76.5 [#]	1041.85±35.50 [*]

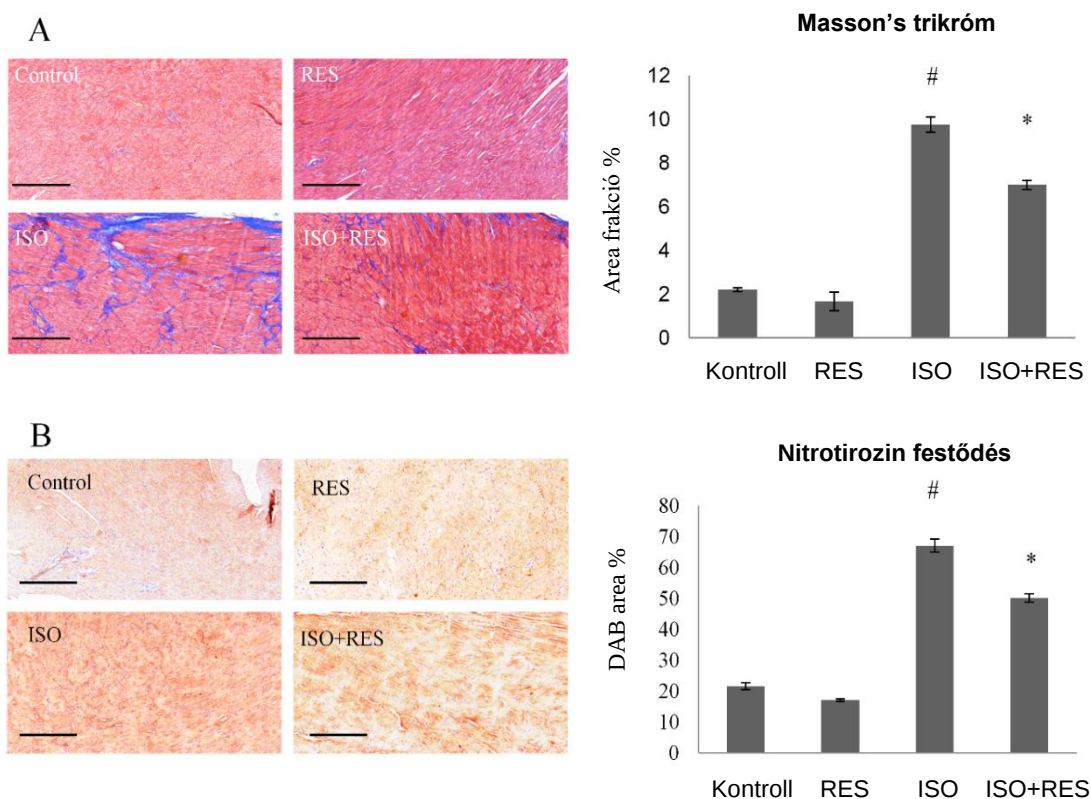
14. táblázat. Rezveratrol hatása az echocardiographiás paraméterekre ISO-kezelt patkányokban. Kontroll: sem ISO, sem rezveratrol kezelésben nem részesült állatok; ISO: posztinfarktusos állatok 8 héttel az ISO alkalmazása után; ISO+RES: rezveratrollal kezelt posztinfarktusos állatok; RES csak rezveratrol kezelésben részesült állatok. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. [#] $p<0.05$ vs. Kontroll. ^{*} $p<0.05$ vs. ISO. EF: ejekciós frakció, LVESV: balkamrai végszisztolés volumen, LVEDV: balkamrai végdiasztolés volumen, LVIDd: balkamrai végdiasztolés átmérő, LVIDs: balkamrai végszisztolés átmérő.



42. ábra. A Kontroll, RES, ISO és ISO+RES csoportok állatainak reprezentatív echocardiographiás képe.

5.4.4. Rezveratrol csökkenti az intersticiális kollagén lerakódás mértékét a szívizomzatban

Izoproterenol kezelést követően jelentős kötőszövetes átépülés volt kimutatható a hisztológiai vizsgálat során. Az intersticiális kollagén lerakódás mértéke a posztinfarktusos állatokban jóval magasabb volt, mint a kontroll patkányokban ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Rezveratrol kezelés szignifikánsan módon csökkentette a fibrózis mértékét posztinfarktusos patkányokban ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO). A Kontroll és RES csoport állatai között azonban nem észlelhető lényegi különbség (43.A ábra).



43. ábra. Rezveratrol kezelés mérsékli az ISO-indukálta szívelégtelenségben az intersticiális kollagén lerakódás és a fehérje nitroziláció mértékét. **(A)** Reprezentatív Masson's trikróm festett metszetek, vonalas mérték: 500 μ m. **(B)** Reprezentatív immunohisztokémiai képek NT ellenes antitesttel kezelt szívizom metszetekből, vonalas mérték: 500 μ m. Kontroll: koregyeztetett kontroll patkányok. RES: 8 hétig rezveratrollal kezelt kontroll patkányok. ISO: állatok 8 héttel az ISO alkalmazását követően; ISO+RES: rezveratrol kezelt állatok 8 héttel az ISO-indukálta infarktust követően. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. [#] $p < 0.05$ vs. Kontroll. ^{*} $p < 0.05$ vs. ISO.

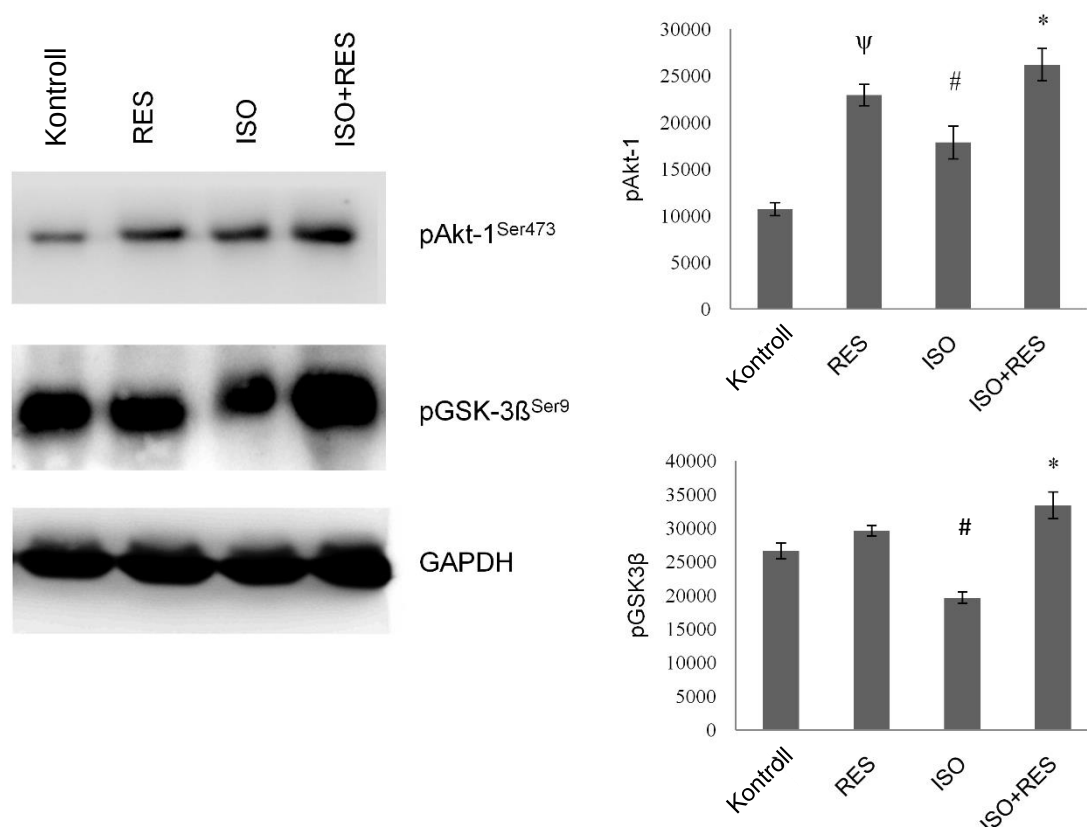
5.4.5. Rezveratrol hatása a fehérje nitroziláció mértékére

Az oxidatív stressz mértékét jelen modellünkben a nitrotirozin (NT) mennyiségének meghatározásával jellemeztük. A Kontroll csoportban elhanyagolható mennyiségű NT volt kimutatható, azonban a szívelégtelen állatokban a nitrotirozin mennyisége jelentősen magasabbá vált ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). Ez az emelkedés rezveratrol kezelés mellett szignifikánsan csökkent ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO)(43.B ábra).

5.4.6. Rezveratrol kedvezően befolyásolja az Akt-1^{Ser473} és GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációt az ISO-kezelt állatokban

Az Akt-1^{Ser473} foszforiláció mértéke jelentősen magasabb volt az ISO-csoportban, mint a Kontroll állatok esetében ($p < 0.05$). Rezveratrol kezelés mind a kontroll, mind az ISO-kezelt állatok esetén jelentősen fokozta a túlélést elősegítő faktor, az Akt foszforilációját ($p < 0.05$, RES vs. Kontroll, $p < 0.05$ ISO+RES vs. ISO). A legmagasabb értéket a rezveratrol kezelésben részesült posztinfarktusos állatokban (ISO+RES) észleltük.

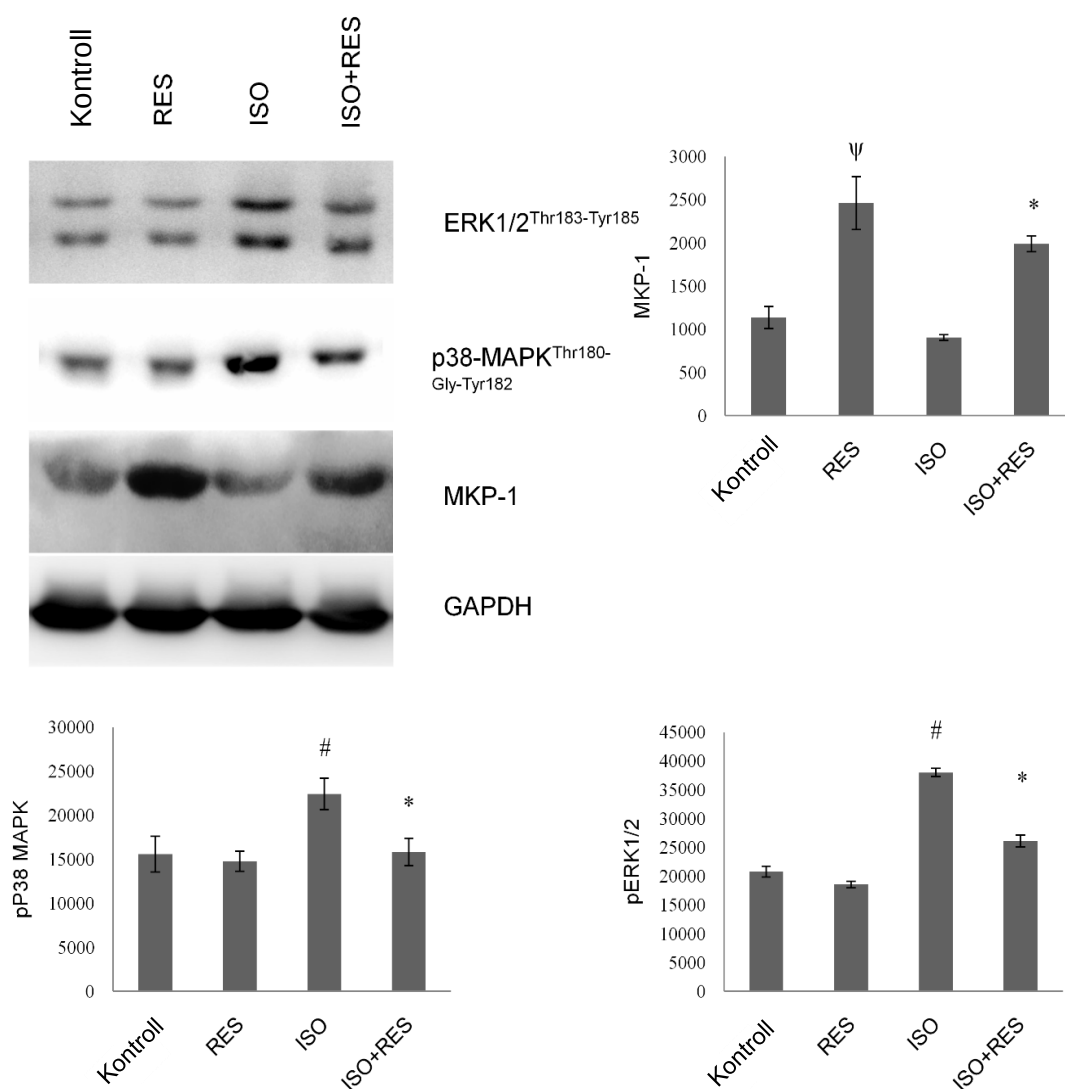
A GSK-3 β ^{Ser9} esetében paradox módon egy csökkenés volt észlelhető az ISO csoportban a Kontrollhoz viszonyítva ($p < 0.05$, ISO vs. Kontroll). A nem stresszelt állatokban rezveratrol kezelés nem okozott a GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációban érdemi eltérést. Izoproterenol kezelés következtében kialakult szívelégtelenség esetén azonban magasabb foszforilációs szintet észleltünk a rezveratrol kezelt állatokban ($p < 0.05$, ISO+RES vs. ISO)(44. ábra).



44. ábra. Rezveratrol kezelés hatása az Akt-1^{Ser473} és GSK-3β^{Ser9} foszforiláció mértékére. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=3) Akt-1^{Ser473} és GSK-3β^{Ser9} foszforilációval kapcsolatban. GAPDH-t a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. Kontroll: koregyezettett kezeletlen patkányok; RES: 8 hetes rezveratrol kezelésben részesült állatok; ISO: állatok 8 héttel az ISO alkalmazását követően; ISO+RES: rezveratrol kezelt állatok 8 héttel az ISO-indukálta infarktust követően. #p<0.05 vs. Kontroll, *p<0.05 vs. ISO, ^ψp<0.05 RES vs. Kontroll.

5.4.7. Rezveratrol csökkenti a MAP kinázok foszforilációját és növeli az MKP-1 mennyiségét izoproterenol kezelt állatok szívében

A p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} és ERK1/2^{Thr183-Tyr185} foszforilációja jelentősen emelkedett az ISO csoportban a Kontroll csoporthoz képest (p<0.05, ISO vs. Kontroll). Rezveratrol kezelés hatására e két jelátviteli faktor aktivitása jelentősen csökkent (p<0.05, ISO+RES vs. ISO). A MAP kinázok deaktivációját defoszforiláció útján előidéző MKP-1 mennyisége pedig ellentétes módon változott, az ISO csoportban volt a legalacsonyabb és a RES-kezelt állatokban a legmagasabb (p<0.05, RES és ISO+RES vs. Kontroll és ISO)(45. ábra).

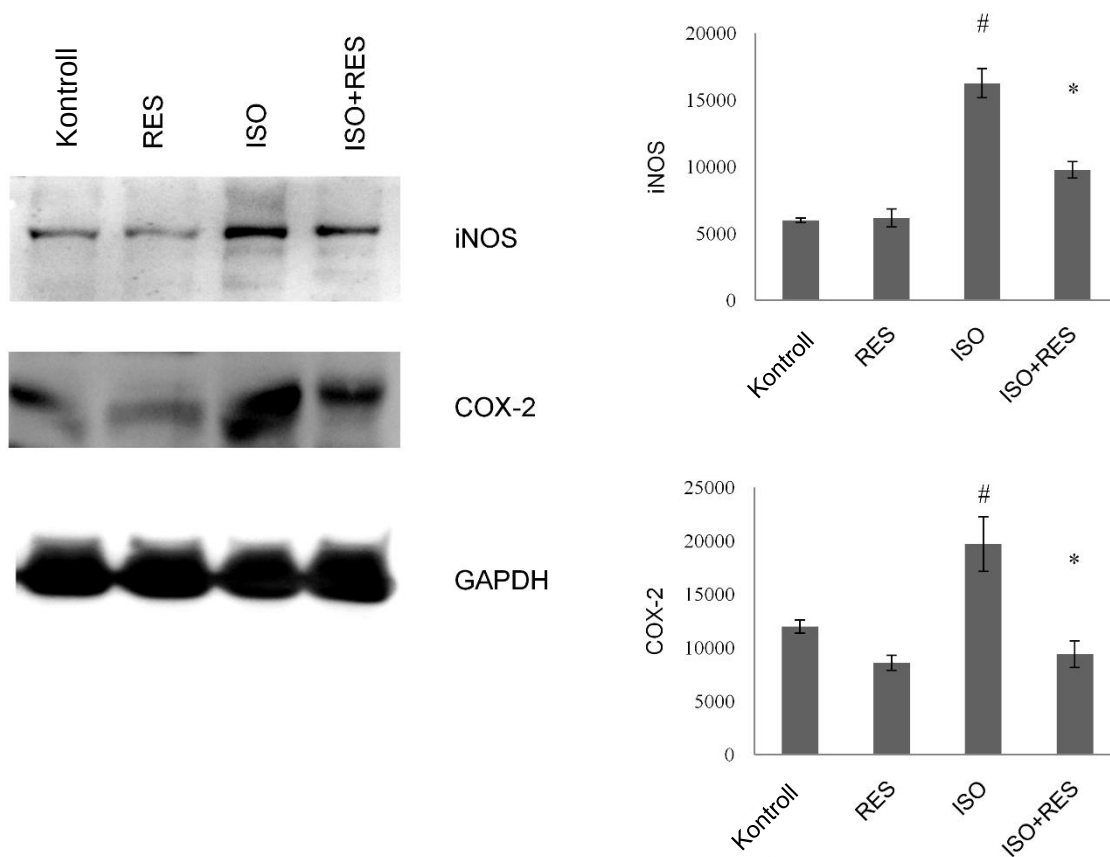


45. ábra. A rezveratrol kezelés hatása a p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} és ERK1/2^{Thr183-Tyr185} foszforilációra és az MKP-1 szintjére. Reprezentatív Western blot képek és denzitometriás meghatározás (n=3) a p38-MAPK és ERK1/2 foszforiláció, valamint az MKP-1 szintjével kapcsolatban. GAPDH-t a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. Kontroll: koregyeztetett kezeletlen patkányok; RES: 8 hetes rezveratrol kezelésben részesült állatok; ISO: állatok 8 héttel az ISO alkalmazását követően; ISO+RES: rezveratrol kezelt állatok 8 héttel az ISO-indukálta infarktust követően. #p<0.05 vs. Kontroll, *p<0.05 vs. ISO, ^ψp<0.05 RES vs. Kontroll.

5.4.8. Rezveratrol kezelés csökkenti a COX-2 és az iNOS expresszióját

A COX-2 és iNOS expressziója jelentősen magasabb volt az ISO csoportban a kontroll állatokhoz viszonyítva (p<0.05, ISO vs. Kontroll). Ez az emelkedés szignifikánsan kisebb volt a rezveratrol kezelt állatokban a kezeletlenekhez képest (p<0.05, ISO+RES vs. ISO).

A nem stresszelt állatokban a rezveratrol kezelés nem mutatott különbséget a nem kezelt csoporthoz képest (46. ábra).



46. ábra. Rezveratrol kezelés hatása a COX-2 és iNOS mennyiségére. Reprezentatív Western blot képek, illetve a COX-2 és iNOS mennyiségének denzitometriás meghatározása (n=3). GAPDH-t a fehérjemennyiség kontrollja céljából használtunk. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. Kontroll: koregyezettett kezeletlen patkányok; RES: 8 hetes rezveratrol kezelésben részesült állatok; ISO: állatok 8 héttel az ISO alkalmazását követően; ISO+RES: rezveratrol kezelt állatok 8 héttel az ISO-indukálta infarktust követően. # p<0.05 ISO vs. Kontroll, *p<0.05 ISO+RES vs. ISO.

5.5. A rezveratrol kardioprotektív hatása posztinfarktusos stabil koszorúér betegekben

5.5.1. A saját tervezésű humán klinikai vizsgálatba bevont betegek demográfiai jellemzői és preventív gyógyszeres kezelésük

A betegeket a vizsgálatba történő bevonás során igyekeztünk úgy besorolni a két kezelési csoportba, hogy azok a legfőbb klinikai jellemzők tekintetében megfeleljenek egymásnak. Azonban a kis betegcsoport miatt kisebb (de nem szignifikáns) eltérések adódtak a csoportok között (15. táblázat).

	Rezveratrol csoport (n=20)	Placebo csoport (n=20)
Férfi nem	13 (65%)	13 (65%)
Kor (év)	65.3±9.7	67.4±7.7
Diabétesz	7 (35%)	8 (40%)
Hipertónia	20 (100%)	19 (95%)
Diszlipidémia	13 (65%)	14 (70%)
Dohányzás	3 (15%)	4 (20%)
Obezitás (BMI>30)	8 (30%)	7 (35%)
BMI (kg/m ²)	29.3±2.1	28.1±3.2
Szekunder prevenció gyógyszeres kezelés:		
Szalicilátok	15 (75%)	17 (85%)
Tienopiridinek	5 (25%)	7 (35%)
ACEI/ARB	18 (90%)	18 (90%)
Béta-blokkoló	18 (90%)	17 (85%)
Sztatin	15 (75%)	16 (80%)

15. táblázat. A klinikai vizsgálatba bevont betegek demográfiai jellemzői és az alkalmazott preventív gyógyszeres kezelés.

5.5.2. A rezveratrol hatása a hemoreológiai és egyes laboratóriumi paraméterekre

A placebo csoportban a vizsgálat során néhány hemoreológiai faktor romlását észleltük. Merevebbé váltak a vörösvértestek, amit a csökkent vörösvértest deformabilitás mutatott, illetve a vérlemezkék aggregabilitása is fokozódott a vizsgálati periódus végére a kiindulási értékhez viszonyítva ($p < 0.05$).

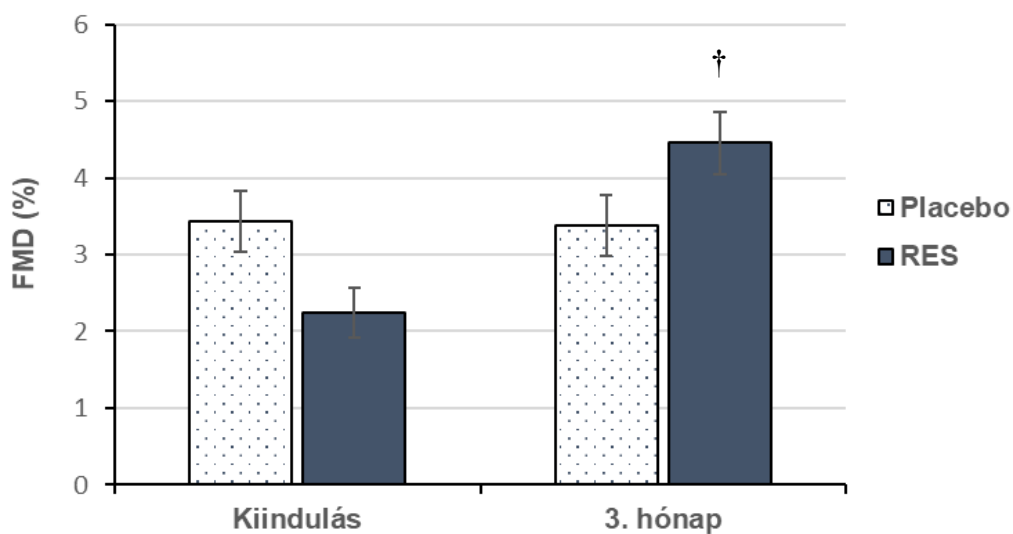
	Placebo Kiindulás	Rezveratrol Kiindulás	Placebo 3. hónap	Rezveratrol 3. hónap
Hemoreológiai paraméterek				
Hematokrit (%)	43.9±1.22	44.4±0.98	43.47±0.86	44.11±0.91
Fibrinogén (g/l)	3.22±0.12	3.46±0.17	3.38±0.15	3.7±0.21
Vörösvértest aggregáció (%)	12.8±0.76	11.57±0.33	13.1±0.53	11.32±0.59
Kollagén indukálta vérlemezke aggregáció (%)	43.22±6.57	42.61±6.22	47.95±6.74*	32.89±4.81*
Plazma viszkozitás (mPas)	1.26±0.02	1.26±0.02	1.31±0.02	1.34±0.02
Teljes vér viszkozitás (mPas)	4.37±0.18	4.5±0.13	4.49±0.17	4.6±0.1
Vörösvértest deformabilitás (RCTT)	6.9±0.13 [#]	7.1±0.14	7.5±0.14 [#]	7.03±0.1
Laboratóriumi paraméterek				
Fehérvérsejtszám ($\times 10^9/l$)	6.11±0.37	6.81±0.49	6.53±0.37	7.08±0.38
CRP (mg/l)	3.27±0.35	3.64±0.57	7.03±3.31	6.51±2.97
HgA _{1c} (%)	6.47±0.26	6.33±0.19	6.18±0.25	6.04±0.23
TNF α (pg/ml)	5.95±0.59	6.13±0.51	10.12±0.99	10.1±1.01
Vérlemezke szám ($\times 10^9/l$)	195.42±10.9	197.82±8.43	210±11.9	205±8.48
Összkoleszterin (mmol/l)	4.5±0.25	5.1±0.5	4.5±0.26	4.74±0.26
Triglicerid (mmol/l)	1.94±0.24	1.67±0.21	2.04±0.25	1.84±0.26
LDL-koleszterin (mmol/l)	2.6±0.24	3.15±0.35 [†]	2.51±0.21	2.7±0.15 [†]
HDL-koleszterin (mmol/l)	1.02±0.06	1.2±0.06	1.1±0.08	1.2±0.06

16. táblázat. Hemoreológiai és laborparaméterek változása a placebo és rezveratrol kezelt csoportban. Az értékeket átlag±SEM formában adtuk meg. * $p < 0.05$ RES 3. hó vs. Placebo 3. hó, [#] $p < 0.05$ Placebo 3. hó vs. Placebo Kiindulás, [†] $p < 0.05$ RES 3. hó vs. RES Kiindulás.

Ezen kedvezőtlen hemoreológiai változások rezveratrol kezeléssel megelőzhetőek voltak (16. táblázat). A legtöbb vizsgált laboratóriumi paraméter esetében (fehérvérsejtszám, vérlemezkeszám, CRP, HgbA1c, TNF α , összkoleszterin, triglicerid, HDL-koleszterin) nem találtunk szignifikáns eltérést. Az LDL-koleszterin szint azonban szignifikánsan csökkent a rezveratrol kezelt csoportban a kiindulási értékhez viszonyítva ($p < 0.05$) (16. táblázat). A hematokrit, fibrinogén, a teljes vér és plazma viszkozitás esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a 3 hónapos kezelés végére a rezveratrol és a placebo kezelt csoport között.

5.5.3. A rezveratrol hatása a flow-mediálta vazodilatációra

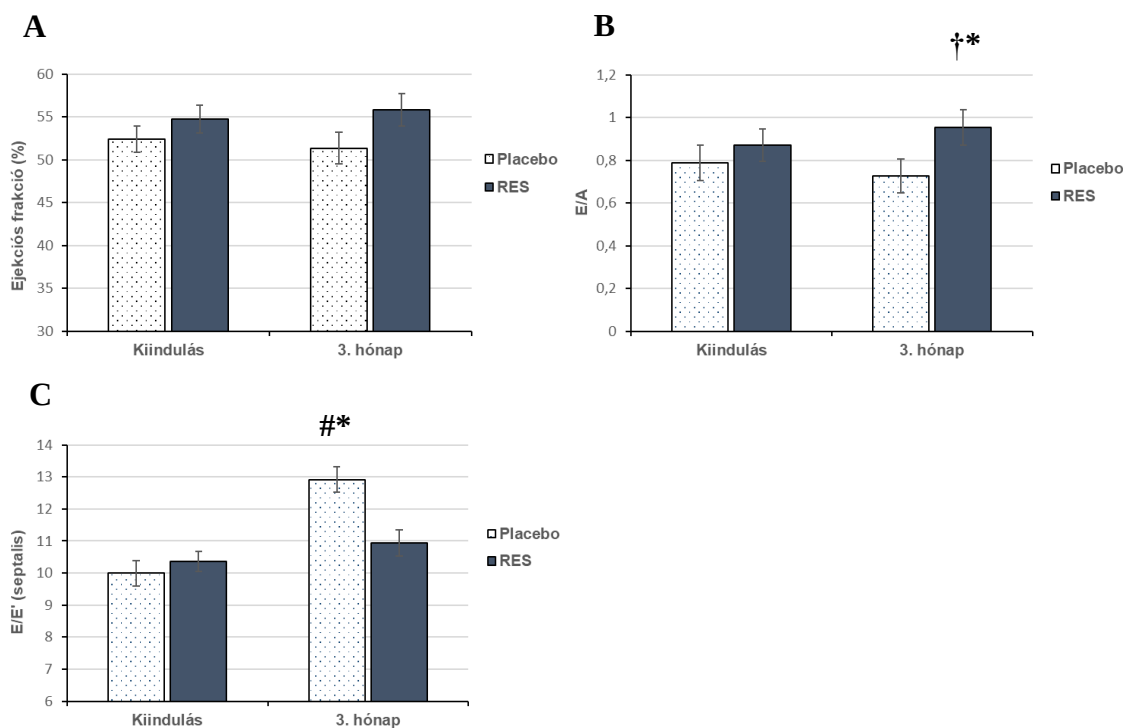
Az artéria brachiálison mért flow-mediálta vazodilatáció szignifikánsan megnőtt a RES kezelt csoportban ($p < 0.05$) (1. ábra). Ezzel szemben a placebóval kezelt csoportban nem találtunk érdemi változást.



47. ábra. Flow-mediálta vazodilatáció a 3 hónapos vizsgálati időszak elején és végén. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. [†] $p < 0.05$ RES 3. hó vs. RES Kiindulás.

5.5.4. A rezveratrol kezelés hatása a bal kamra funkcióra koszorúér betegekben

A szisztolés balkamra funkció, melyet az ejekciós frakcióval (EF) jellemeztünk, nem mutatott érdemi változást sem a placebo, sem a rezveratrol csoportban. Rezveratrol kezelés mellett ugyan egy tendenciaszerű javulás volt észlelhető, de ez a statisztikai szignifikancia mértékét nem érte el (48.A ábra). A balkamrai diasztolés funkció azonban - melyet az E/A hányadossal (48.B ábra), illetve az E/E' hányadossal (48.C ábra) jellemeztünk – szignifikánsan jobbnak ($p < 0.05$) bizonyult a kezelés végén a rezveratrol csoportban.



48. ábra. A balkamrai szisztolés (EF) és diasztolés (E/A, ill. E/E') funkció változása. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. * $p < 0.05$ RES 3. hó vs. Placebo 3. hó, # $p < 0.05$ Placebo 3. hó vs. Placebo Kiindulás, [†] $p < 0.05$ RES 3. hó vs. RES Kiindulás.

6. MEGBESZÉLÉS

Munkám során a PARP enzim aktiválódásának, illetve farmakológiai gátlásának hatását vizsgáltam különféle kóroki tényezők (posztinfarktusos, krónikus emelkedett afterload és toxikus) által kiváltott szívelégtelenség modellekben. Emellett a krónikusan emelkedett afterload (hipertenzió) által a manifeszt szívelégtelenség kifejlődését megelőző miokardiális remodelling (hipertenzív szívbetegség), illetve a vaszkuláris remodelling kialakulása során vizsgáltam a PARP enzim szerepét, illetve a PARP-gátlás hatásait.

6.1. Az L-2286 kódjelű PARP-gátló tulajdonságai és jellemzése in vitro és in vivo akut stressz modellekben

Vizsgálataim során mindvégig a Sümegi és Hideg professzorok által a PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében kifejlesztett L-2286 kódjelű PARP-gátlót használtam [121, 122]. A molekula kifejlesztésére azért került sor, mert az elmúlt évtized elején elérhető és széles körben használt PARP-inhibitorok (nikotinamid, 3-aminobenzamid) csak igen magas, millimólos koncentrációban tudtak érdemi gátló hatást kifejteni [94, 161]. Ennek következtében krónikus élőállatmodellekben való használatra alkalmatlanok voltak. Az L-2286 egy kinazolin származék (kémiai nevén 2-[(2-Piperidin-1-yl)thio]quinazolin-4(3*H*)-one) (3. ábra), mely potens PARP-gátló hatással rendelkezik (IC_{50} : 2.6 μ M). A PARP-gátló hatáson túlmenően a heteroaromás gyűrűnek köszönhetően mérsékelt scavenger hatása is van a molekulának. Ezért az exogén oxidatív stressz (H_2O_2) által kiváltott sejtkárosító hatást még ennél is alacsonyabb koncentrációban (EC_{50} : 0.8 μ M) volt képes mérsékelni [121, 122].

Saját in vitro sejtkultúrás mérési eredmények is megerősítették azt, hogy az L-2286 igen potens citoprotektív szernek bizonyult, sikerült igazolni, hogy valóban igen alacsony koncentrációban képes kivédeni az oxidatív stressz (doxorubicin és H_2O_2) által okozott sejtkárosodást (MTT). A doxorubicin kezelés (1 μ M) során alkalmazott L-2286 kezelés 1 μ M koncentráció felett volt képes mérsékelni az MTT csökkenését. Hidrogén

peroxidokkal stresszelt sejteken a molekula leírásakor és karakterizációjához hasonlóan 1 μM alatti EC_{50} érték adódott, amely sokkal alacsonyabb, mint a PARP-gátló 4-HQ molekula, valamint a szintézise során használt kiindulási molekula, a 4-MQ.

Komplexebb rendszerben, izolált szívperfúzióban iszkémia-reperfúzióval kiváltott oxidatív stressz során is vizsgáltuk a kísérleti PARP-gátló molekulát, hogy meghatározzuk kardioprotektív hatását. Vizsgálatunk idején természetesen már ismert volt, hogy a PARP-gátlás jelentősen csökkenti iszkémia-reperfúzió során a szívkárosodás mértékét [162, 163]. Számos kutatólabor mellett saját munkacsoportunk is tesztelte már a PARP-gátlás protektív hatását IR során. Korábbi munkáinkban a nemzetközi irodalommal egyetértésben igazoltuk a különféle PARP-gátlók - NA, 3-AB, BGP-15 és 4-HQ - oxidatív sejtkárosodással szembeni védő hatását [94, 164-167]. Langendorff perfúziós rendszerben IR során alkalmazott PARP-gátlás csökkentette valamennyi sejtalkotóelem, biomolekula oxidatív károsodását. Csökkent a lipid peroxidáció, a protein oxidáció és a DNS-károsodás mértéke, valamint jelentősen kisebb volt a szívinfarktus méretét jelző nekroenzimek (CK, GOT, LDH) kiáramlása is a perfuzátumba. A PARP enzim gátlásával a sejtek NAD^+ tartalmának a csökkenése is mérséklődött stressz szituációkban, továbbá javították a miokardium metabolizmusát is, segítve ezzel a normális energetikai állapot (ATP , $\text{PCr}\uparrow$, $\text{Pi}\downarrow$) helyreállítását a posztiszkémiás fázisban.

L-2286 használatával sikerült reprodukálni az egyéb PARP-gátlók esetén már igazolt kardioprotektív hatást IR folyamán. Az L-2286-ot Langendorff perfúzió során 10 és 20 μM koncentrációban adva gyorsult reperfúzió során a magas energiájú foszfátok koncentrációjának helyreállási üteme, illetve az anorganikus foszfát csökkenésének mértéke (6. ábra). Az inorganikus foszfát reutilizáció jelentőségét az adja, hogy a magas koncentrációjú inorganikus foszfát a kalcium és a ROS mellett az mPTP megnyílásának fontos triggere, mely végül sejthalálhoz vezet [168, 169]. A metabolikus státusz teljesebb helyreállása következtében az oxidatív sejtkárosodás foka is jelentősen mérséklődött. Az L-2286 ennek megfelelően csökkentette a lipid peroxidációt jelző TBARS mennyiségét és a fehérje oxidációt jellemző karbonil tartalmat.

Az ex vivo izolált szervperfúziós kísérletek (Langendorff) során már egy komplett szerv számára nyújtott védelmet oxidatív stressz során a tesztelt PARP-gátló molekula. A tervezett krónikus élőállatmodellben végzett kísérletek előtt azonban szükségét éreztük,

hogy in vivo szívinfarktus modellben is meghatározzuk az L-2286 hatását és hatékonyságát. Vizsgálatunkhoz izoproterenol által kiváltott szívinfarktus modellt használtunk. Izoproterenol hatására diffúz szubendokardiális nekrosis alakul ki a fizioológiásnál jelentősen magasabb szívfrekvencia, vérnyomás és a nagy dózisú adrenerg szer által okozott direkt kardiotoxicitás következtében [123]. L-2286 előkezelés csökkentette a szívizom infarktus méretét. Ezt mind indirekt módon a nekroenzimek (CK és LDH) szérumbeli aktivitásának mérésével (7. ábra), mind a nekrosis anatómiai kiterjedtségének meghatározásával (TTC festés) sikerült igazolni.

6.2. A PARP-gátlás hatása krónikus szívelégtelenség modellekben

Az eddigi eredmények, illetve vizsgálataink megkezdésekor az irodalomból ismert PARP-gátlós tanulmányokban csaknem kivétel nélkül az akut stressz szituációkra, döntően iszkémia-reperfúziós károsodások kivédésére koncentráltak [161-165]. A szívelégtelenség kialakulása, a remodelling folyamata során azonban éles ellentétben ezen vizsgálatokkal nem egy akut károsodás, nem egy időben jól behatárolt robbanásszerűen megemelkedett szabad gyök termelődés által kiváltott szervkárosodással állunk szemben, hanem a szívizomzat lassú, folyamatos kisebb intenzitású károsodásával. A különbségek ellenére azonban a szívelégtelenség pathogenezisében is jelentős szerepe van az oxidatív stressznek, ezért valószínűnek tűnt, hogy egy antioxidáns hatású, az oxidatív károsodással szemben védő hatású molekula, a PARP-gátló L-2286 kísérletes szívelégtelenség kialakulásával szemben is védő hatású lesz [46, 48]. Vizsgálataink kiterjedtek a legfontosabb etiológiai tényezők (posztinfarktusos állapot, krónikus hipertenzió, toxikus eredet) által provokált szívelégtelenség modellekre. A toxikus szívelégtelenség modell kivételével minden esetben figyelmet fordítottunk arra, hogy a károsító noxa kialakulását ne befolyásoljuk. Ezen modellekben az L-2286-ot nem alkalmaztuk a károsodás akut szakában.

6.2.1. Posztinfarktusos szívelégtelenség

Szívelégtelenség kialakulása szempontjából az egyén szintjén a szívizomvesztés, a lezajlott szívinfarktus a legjelentősebb rizikótényező [2, 170]. Tekintettel a szívelégtelenség kezelésének megoldatlan voltára, illetve a pathogenezisben szerepet játszó oxidatív stresszre, érdemesnek tartottuk a PARP-gátlás vizsgálatát posztinfarktusos szívelégtelenség modellben [46, 48]. Egy másik munkacsoport vizsgálatunk megkezdése előtt nem sokkal publikálta azt a felvetését, miszerint, hogy PARP-gátlás potenciálisan védhet a szívelégtelenséggel szemben, mivel sikerült igazolni LAD-ligált rágszálókban a szívfunkció csökkenésével párhuzamosan a PARP-enzim aktivációját. Ráadásul az alkalmazott PJ-34 jelű PARP-gátló kissé javította az állatok szívfunkcióját is ($dp/dt\uparrow$, $LVEDP\downarrow$) [171]. A balkamra funkció csökkenése azonban nem egyenlő a szívelégtelenséggel [2] és ebben a vizsgálatban nem is történt meg a szívelégtelenség igazolása, illetve a PARP-gátlás alkalmazása mellett annak nyomon követése. Munkánk során ezért arra fókuszáltunk, hogy a vizsgált PARP-gátló (L-2286) szubcelluláris hatásait tisztázzuk, illetve vizsgáljuk a remodellingre és a szívelégtelenség kialakulására gyakorolt hatását.

A szívizomzat struktúráját és funkcióját károsító noxát követően kialakuló miokardiális átépülés/remodelling két fő jellegzetessége az inadekvát/túlzott szívizomsejt hipertrófia és az extracelluláris mátrix fehérjék (fibrilláris kollagén, kollagén I és III) felszaporodása, melyek fokozzák a szövet merevségét és károsan befolyásolják a miokardiális viszkoelaszticitást. Ez a folyamat aztán diasztolés, végül pedig szisztolés diszfunkcióhoz vezet [172, 173]. A perivaszkuláris fibrózis és a rendezetlen szívizomsejt hipertrófia csökkenti a coronaria flow reservet és szöveti hipoperfúziót okozva szívizom iszkémiához vezet [123, 172].

Vizsgálatunkban az ISO kezelés balkamra hipertrófiát idézett elő. A szívizomzat tömegének megemelkedését mind gravimetriás, mind echocardiographiás módszerrel sikerült igazolni. Emelkedett a hipertrófiát jelző VW/BW és a VW/TL arány, illetve az echocardiographia során mérhető septum és hátsó fal vastagsága is (2-4. táblázat). Az általunk észlelt változások összhangban vannak más munkacsoportok eredményeivel is [174, 175]. A hipertrófia háttérében szövettani vizsgálattal jelentős miokardiális fibrózis, valamint a megmaradt szívizomsejtek hipertrófiája állt (8-9. ábra). Posztinfarktusos állatokban emellett balkamra dilatáció (LVESV, LVEDV emelkedése) is észlelhető a

szisztolés balkamra funkció (EF, FS) csökkenése mellett (4. táblázat). A szív dilatációja és szisztolés funkciózavara hátterében a kezdeti miokardium vesztés mellett a kötőszövetes átépülés állhat. Vizsgálatunkban az L-2286 segítségével kifejtett PARP-gátlás csökkentette a balkamra hipertrófiára utaló paramétereket (gravimetriás indexek, balkamrai falvastagság), mérsékelte a fibrózist és a szívizomsejt hipertrófiát. Emellett javította a szisztolés balkamra funkciót (EF, FS) is.

Patkányok EKG vizsgálata is megerősítette a szövettani eredményeket. Az R hullám amplitúdója, amely a viabilis szívizomsejtek számával egyenesen, illetve az intersticiális kötőszövet felszaporodással fordítottan arányos [176], posztinfarktusos állatokban jelentősen csökkent. ISO-kezelt állatokban emellett J-pont depressziót is észleltünk (rágcsálókban nincs értékelhető ST szakasz), mely a remodellinggel járó inadekvát koronária keringés és a fokozott balkamrai falfeszülés (strain) jele egyaránt lehet [177, 178]. PARP-gátló kezelés mind az R-hullám csökkenését, mind a J-pont depresszióját csökkentette. Ez az eredmény is támogatja a többi módszerrel nyert eredményt, miszerint az L-2286 csökkenti a szívizomzat patológiás átépülésének folyamatát.

A hipertrófiát, illetve a szívelégtelenséget kiváltó stimulusok (nyomás és volumen terhelés) beindítják a foetalis génprogramot. Az aktiváció során többek között emelkedik a nátriuretikus fehérjék (ANP, BNP) expressziója és szekréciója is [179, 180]. A nátriuretikus peptidek koncentrációja a plazmában egyenesen arányos a falfeszülés és így a szívelégtelenség klinikai súlyosságával [2, 181]. ISO indukálta szívelégtelenség modellünkben a kontrollhoz képest emelkedett BNP értéket észleltünk, mely egyértelműen jelzi a szívelégtelenség kialakulását. PARP farmakológiai gátlása pedig csökkentette a BNP szintet, mely a szívelégtelenség súlyosságának mérséklését jelzi (3. táblázat).

6.2.2. Krónikus hipertenzió által indukált szívelégtelenség

Második kísérletünk fontosságát az adja, hogy populációs szinten a magas vérnyomás betegség, elsősorban a nem megfelelően kezelt hipertónia jelenti a szívelégtelenség legfőbb etiológiai faktorát [2, 3, 19, 20]. Kísérletünkben SHR-t használtunk, amely a magas vérnyomás állatmodellje és sok tekintetben hasonló az emberi esszenciális hipertóniához [22, 182, 183]. Az SHR törzset eredetileg Okamoto és Aoki mutatta be,

mint a genetikus hipertenzió modelljét [184]. A hosszantartó magas vérnyomás hatására kialakuló szívelégtelenség az irodalom alapján különböző mechanizmusokkal magyarázható, de az oxidatív stressz és a jelátviteli utak abnormális változásai a betegség pathogenezisében központi szerepet játszanak [81, 185].

Kísérletünket az SHR állatokkal a hipertenzív kardiopátia kompenzált fázisában (30 hetes korban) kezdtük. Ebben az életkorban a balkamra hipertrófia markáns jelei már észlelhetők, szövettanilag intersticiális fibrózis és szívmuscle hipertrófia jellemző [186]. Jelen vizsgálatunkban egy non-invazív vizsgálattal, echocardiographiával határoztuk meg a kiindulási szívparamétereket, illetve néhány állat esetén gravimetriával is megerősítettük azokat. Az SHR állatokban mindkét módszer igazolta a jelentős fokú balkamra hipertrófiát. SHR állatokban nagyobb volt a septum és a PW vastagsága, a kalkulált, illetve mért szívtömeg, valamint a VW/BW hányados. A szisztolés balkamra funkció a hipertenzív és normotenzív csoport között még nem különbözött egymástól (5-6. táblázat). A vizsgálat végén, 76 hetes életkorban azonban az SHR állatokban már a szívelégtelenség markáns jelei voltak észlelhetők.

A vizsgálat végén a szisztolés balkamra funkció (EF, FS) a normotenzív és a kezelt hipertenzív (SHR-L) állatokban nem csökkent a kiindulási értékhez viszonyítva, azonban az SHR-C csoportban a balkamra funkció jelentős romlását detektáltuk a kísérlet végén, 76 hetes életkorban (7. táblázat). A hipertónia kialakulása során a balkamra geometriája megváltozik a megnövekedett nyomás és térfogat terhelés miatt. A magas vérnyomásban szenvedőknek az LV geometriája négyféle osztályba sorolható az LV tömegindex és az RWT alapján [22]. Az osztályozás alapján excentrikus hipertrófiát figyelhettünk meg az SHR-C csoportban (nagyobb LV tömeg/BW és normál RWT), míg az L-2286 adása megőrizte a koncentrikus hipertrófia (nagyobb LV tömeg/BW és nagyobb RWT) állapotát, amit a kísérlet kezdetén is észleltünk az SHR állatok esetén. Tehát az L-2286 hatástalansága a septum és a PW vastagság csökkentésére kedvező hatásként fogható fel, mert így hozzájárult a koncentrikus hipertrófia fenntartásához (7. táblázat). Kísérletünkben a plazma-BNP szintje mindkét SHR csoportban magasabb volt a normotenzív csoporthoz képest, azonban L-2286 kezelés mellett ez a szívelégtelenség súlyosságát jelző biomarker szint kevésbé emelkedett meg (5. táblázat). A szívelégtelenség egy gyakori következménye a volumenretenció [2]. Gravimetriás vizsgálattal a nedves/száraz tüdő hányados vizsgálat jól jelzi a tüdőben a pangás jelenségének a meglétét [47, 145, 187]. Ez a paraméter is emelkedett volt SHR-C

állatokban a BNP szinthez hasonlóan. PARP-gátló kezelés pedig a pangásnak ezt az indexét is jelentősen mérsékelte (5. táblázat). L-2286 kezelés a szisztolés szívfunctió megőrzésével és a szívelégtelenség folyamatának lassításával kedvezően befolyásolta az idős szívelégtelen SHR-ek túlélését is [2, 181].

6.2.3. Antraciklin kezelés által kiváltott szívelégtelenség

Noha a DOX kezelés következtében kialakuló kardiomiopáthia és szívelégtelenség pontos celluláris és molekuláris mechanizmus még nem teljesen tisztázott, azonban a megnövekedett szabad gyök termelődés mellett az endogen antioxidánsok csökkent mennyisége illetve az ezek következtében kialakuló oxidatív stressz itt is központi szerepet játszik [188]. Az oxidatív stressz hatására lassú izomrostvesztés, illetve a szívizomsejtek vakuolizációja következik be, melyek a DOX indukálta szívelégtelenségben tipikus szövettani eltérései [188]. Vizsgálatunk kezdete előtt néhány publikáció már felvetette, hogy a DOX által kiváltott kardiotoxicitás mediálásában a PARP enzim aktivációja is fontos szerepet tölthet be [189]. Szenczi és munkatársai emellett azt is igazolták, hogy a DOX kezelt szívizomsejtek akut károsodását mérsékelte a farmakológiai PARP gátlás a végdiasztolés kalcium szint csökkentésén, a kalcium overload megelőzésén keresztül [189]. A DOX kiváltotta szívelégtelenség modellben az enyhe scavenger hatással is bíró PARP-gátló, az L-2286 hatását vizsgáltuk a szívelégtelenség kialakulására.

A gravimetriás paraméterek meghatározásakor nem észleltük a balkamra hipertrófia jeleit a DOX csoportban, mivel mind a VW/BW, mind a VW/TL hányados hasonlóan adódott a csoportok között. A szívelégtelenségre, illetve az azzal járó pangásra diagnosztikus nedves/száraz tüdő hányados azonban jelentősen magasabb volt a DOX csoportban a kontrollhoz képest [47, 145, 187]. L-2286 kezelés egyértelműen mérsékelte a pangásnak ezen indexét (8. táblázat).

A nátriuretikus peptidek (ANP és BNP) a falfeszülés következtében termelődnek és jelennek meg a keringésben. Szívelégtelenségben jó diagnosztikus és prognosztikus biomarkerek [2, 181, 190]. A pangás gravimetriás indexével egyezően a plazma BNP szint mérésekor is jelentős emelkedés volt észlelhető a DOX csoportban. L-2286 kezelésben is részesülő állatokban azonban a BNP szint nem emelkedett szignifikánsan a

kontroll egerekhez képest, mely azt igazolta, hogy az L-2286 kezelés jelentősen mérsékelte a DOX indukálta szívelégtelenség súlyosságát (8. táblázat).

Echocardiographia végzése rendkívül fontos minden olyan állapotban, ahol a szívizomzat funkciója károsodik, mivel a balkamra funkció a kardiovaszkuláris mortalitás és morbiditás fontos tényezője [2, 191]. A toxikus kardiomiopátiák egyik legfontosabb etiológiai faktora az antraciklin tartalmú kemoterápiás protokollok alkalmazása. Az ESC 2016-os állásfoglalása ezért megerősíti, hogy antraciklin tartalmú kemoterápiák esetén javasolt a balkamra funkció rendszeres kontrollja [191].

Jelen vizsgálatunkban a korábbi eredményeknek megfelelően, a DOX kezelés csökkentette a szisztolés és a diasztolés balkamra funkciót [189, 192, 193]. A szisztolés balkamra funkciót jellemző paraméterek (EF, FS) a DOX csoportba tartozó egerekben volt a legalacsonyabb. Az L-2286 kezelésben is részesülő állatok (DOX-L) esetében a csökkenés mértéke jóval kisebb volt, az ebben a csoportban mérhető EF és FS értékek nem különböztek szignifikáns módon a Kontroll csoporttól. A különféle Doppler technikákat (szöveti Doppler/TDI; pulzatilis Doppler/PD) széles körben alkalmazzuk a humán klinikai gyakorlatban a szív diasztolés funkciójának jellemzésére [191, 194, 195]. A mitralis beáramlási mintázat PD módszerrel történő vizsgálata során nyert E hullám, illetve a mitralis annulus elmozdulásának TDI módszerrel történő jellemzése során nyert E' hullám együttes értékelése (E/E' hányados) arányos a bal pitvari töltőnyomással és jelenleg a diasztolés funkció jellemzésének a legelfogadottabb mérőszáma [195]. L-2286 kezelés a diasztolés funkciót jellemző E/E' hányados DOX kiváltotta emelkedését (romlását) is kedvezően befolyásolta. Az MPI (vagy Tei-index) egy relative új jellemzője a globális balkamra funkciónak, mely mind a szisztolés, mind a diasztolés funkciót jellemzi és igen alacsony interobszerver variabilitást mutat [196, 197]. Az MPI emelkedése a DOX csoportban a szív funkciójának a romlását jelezte. PARP-gátló kezelés alkalmazásával a DOX-L csoportban az MPI értéke nem romlott, gyakorlatilag megegyezett a kontroll állatokéval (9. táblázat). L-2286 kezelés mellett észlelt echocardiográfiás változások egybehangzó módon arra utalnak, hogy a PARP-gátló kezelés kardioprotektív hatással bír a DOX által indukált szívelégtelenségben is.

A gravimetriával, a plazma BNP szinttel és a szív funkciójával igazolva a legsúlyosabb fokú szívelégtelenség a csak doxiciklin-kezelt állatokban fejlődött ki. Az állatok túlélését vizsgálva ezen eredményekkel egyező módon azt találtuk, hogy a legmagasabb mortalitás

a DOX csoportban volt észlelhető (az állatok közel 2/3-a pusztult el a 4 hetes kezelés során). Farmakológiai PARP-gátlás azonban jelentősen csökkentette a szívelégtelenség súlyosságát és ezzel párhuzamosan az állatok túlélése is javult (kb. 40 % volt a halálozás a kezelési idő alatt) (19. ábra).

6.3. A hipertónia által kiváltott kardiovaszkuláris remodelling befolyásolása PARP-gátló kezeléssel

Hipertenzív betegekben a szisztolés vérnyomás (SBP) és a pulzusnyomás a két legfontosabb prognosztikai marker. Nagy epidemiológiai tanulmányok (MRFIT és UKPDS) eredményei azt igazolták, hogy a 110 Hgmm-es SBP felett egyenes arányosság igazolható a vérnyomás és a kardiovaszkuláris események gyakorisága között [198, 199].

Vizsgálatainkhoz spontán hipertenzív patkánytörzset (SHR) használtunk. Az SHR ideális állatmodell a krónikus nyomásterhelés által kiváltott kardiovaszkuláris károsodások különböző fázisainak tanulmányozására, hiszen a még stabil, kompenzatórikus hipertrófia kialakulása időben igen jól elkülönül a manifeszt szívelégtelenségbe való átmenetel fázisától. A perzisztens hipertónia az SHR állatok 6-8 hetes korára kifejlődik. Ezt követi a stabil hipertenzió és a kompenzatórikus hipertrófia kialakulásának hosszú periódusa. Mindenesetre 6 hónapos életkorra már masszív balkamra hipertrófia és vaszkuláris változások észlelhetők. A szívelégtelenség az első életévet követően kezd kialakulni és 18 hónapos korra az állatok nagy részénél már súlyos, végstádiumú szívelégtelenség észlelhető jelentős halálozási rátával [22, 200, 201]. Az alább ismertetett vizsgálataink során fiatal, de már hipertóniás SHR-eket (10 hetes életkor) használtunk. A mintegy 6 hónapos kezelés végén pedig a hipertenzív célszervkárosodások (hipertenzív szívbetegség és encephalopathia, illetve vaszkuláris remodelling) kialakulását, illetve a PARP-gátlásnak azokra kifejtett protektív hatását vizsgáltuk.

6.3.1. A PARP-gátlás védő hatása a hipertenzió-kiváltotta nagyér átépüléssel szemben

A magas vérnyomás esetén az emelkedett intraluminális nyomás következtében létrejött emelkedett ciklikus circumferentialis mechanikai falfeszülés a legfontosabb pathogenetikai tényező a vaszkuláris remodelling kialakulásában [202, 203]. Az érfali sejtek a mechanotranszdukciónak nevezett folyamat segítségével észlelik és alakítják át biológiai válasszá ezt a mechanikai változást [204]. Ezért a legnyilvánvalóbb védekezési lehetőség a hipertenzív érfali átépüléssel szemben nyilvánvalóan magának a vérnyomásnak a csökkentése. Azonban a vérnyomáscsökkentő gyógyszerek mellékhatásai, illetve magának a vérnyomáscsökkentésnek – a következményes átmeneti hypoperfúzió miatti – kellemetlen tünetei (szédülés, fejfájás, gyengeség) gyakran akadályát képezik a célvérnyomás elérésének [35]. A magas vérnyomás betegség kezelésének optimalizálása, a hipertónia által okozott szervkárosodások kialakulásának megelőzése érdekében történtek kísérletek, amelyek a vérnyomás csökkentése nélkül, illetve azt kiegészítve kísérlik meg e patológias folyamat blokkolását [205].

Mivel az oxidatív stressz fontos szerepet tölt be a hipertónia pathogenezisében és számos állatkísérletes modellben biztató eredményeket észleltek a használatukkal [205-207], egyes scavengerként működő antioxidánsok (C és E vitamin, β -carotén) nagy betegszámú klinikai vizsgálatokig is eljutottak, azonban ezek eredménye nem erősítette meg az alapkutatási eredményeket [77, 208]. Ennek ellenére az oxidatív stressz egyéb módon történő befolyásolása hatékony lehet a remodelling mérséklésében.

A PARP-1 enzim gátlása által a scavenger molekuláktól eltérő módon is befolyásolható a sejtek oxidatív státusza, ráadásul PARP enzim a jelátviteli folyamatokra és a transzkripció faktorokra is jelentős hatással bír és ezáltal is modulálhatja a vaszkuláris remodellinget [64, 97, 98].

A PARP-gátlás potenciális hatékonyságát a remodelling gátlásában tovább erősítheti az a tény is, hogy korábbi munkánk során L-2286 használatával sikerült mérsékelni a hipertenzív kardiopátiából manifeszt szívelégtelenségbe való átmenetet, noha a vérnyomásra érdemi hatást nem gyakorolt [97, 209].

Jelen munkánkban az L-2286 kezelés szintén nem befolyásolta az állatok vérnyomását (28. és 35. ábra), ellenben csökkentette a hipertónia okozta érfalkárosodást. Az érfali

remodellinget érfal megvastagodás, emelkedett vaszkuláris tónus, fokozott érfali kontraktilitás és a vaszkuláris compliance csökkenése jellemzi. A struktúra megváltozásának legkönnyebben igazolható jele az érfal megvastagodása. Ultrahangos méréseink során a hipertóniás állatok arteria carotisában az intima-media vastagság (IMT) növekedését észleltük (35. ábra), mely szoros korrelációt mutat a későbbi vaszkuláris események (AMI és stroke) gyakoriságával [210].

Az L-2286 kezelés azonban nem csak a hipertónia-indukálta érfalmegvastagodást csökkentette, hanem javította a nagyerek falának rugalmasságát is, melynek meghatározására az aorta stiffness indexet (ASI) használtuk (28. ábra). Az érfal vastagságát és elasztikus tulajdonságait a simaizomsejtek, valamint a kollagén mennyisége határozza meg [211]. Az érfali kollagén mennyiségét elektronmikroszkópiával és a fénymikroszkópos metszetek Masson's trikróm szerinti festésével vizsgáltuk. Mindkét módszerrel jelentős vaszkuláris fibrózist láttunk a kezeletlen hipertóniás állatok esetén (SHR-C csoport). Az elektronmikroszkópos felvételeken a fibrózis invazivitása is ábrázolódott, mivel ezen állatokban a kollagénkötegek a bazál membránt károsítva betörtek a lumenbe. L-2286 kezeléssel biztosított farmakológiai PARP-gátlás azonban mindezen folyamatokat jelentős mértékben csökkentette és védelmet biztosított a hipertenzív érkárosodás kialakulásával szemben (29. és 35. ábra).

Az érfal struktúráján és funkcióján kívül az érfali belhártya, az endotél is károsodik. A hipertenzív állatokban (SHR-C) csökkent vazorelaxációs választ láttunk ACh-ra, mely az endotélfüggő vazodilatáció mediátora. Az endotél diszfunkció kialakulásának az oxidatív stressz és az NO mennyiségének csökkenése áll a háttérben [212]. L-2286 kezelés (SHR-L) hatására javult az endotél-függő vazorelaxáció képessége a nem kezelt SHR állatokhoz képest (36. ábra).

6.3.2. A PARP-gátlás hatása a hipertenzív szívbetegség kialakulására

Ebben a vizsgálatunkban a magas vérnyomás betegség korai szövődményét, a balkamra hipertrófiával és még jó szisztolés balkamra funkcióval jellemezhető hipertenzív szívbetegség kialakulását, illetve PARP-gátlásnak e folyamatra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Korábban már igazoltuk, hogy a PARP-gátlás megakadályozza a hipertenzív

kardiopátiának szívelégtelenségbe történő progresszióját [98], azonban nincs adat arról, hogy a hipertónia korai következményének, a hipertenzív szívbetegségnek a kialakulását miként befolyásolja a PARP enzim gátlása. A kísérlet során az előző kísérletsorozathoz hasonlóan fiatal, de már emelkedett vérnyomású SHR patkányokat és koregyeztetett normotenzív WKY állatokat használtunk.

Vizsgálatunk során az irodalmi adatokkal egyező módon [22, 213] 6 hónapos életkorra az SHR állatokban jelentős balkamra hipertrófia kialakulását észleltük, melyet gravimetriás paraméterek és echocardiographiás mérések (balkamrai falvastagságok, RWT és kalkulált bal kamrai tömeg) is igazoltak (10-12. ábra). Szívelégtelenség jelei azonban ebben a stádiumban még nem voltak észlelhetők, a BNP mennyisége nem emelkedett meg az SHR állatokban a normotenzívekhez képest (10. ábra). Ezzel összhangban és az irodalmi adatokkal egyező módon a szisztolés balkamra funkció sem csökkent a fiatal hipertenzív állatokban [22, 182, 183] a kiindulási értékhez viszonyítva. L-2286 kezelés az eddigi vizsgálatainkkal egyező módon nem csökkentette az állatok vérnyomását, ennek ellenére jelentősen mérsékelte a balkamra hipertrófia jeleit (10-12. táblázat).

Korábbi vizsgálatok (posztinfarktusos, idős SHR) során a manifeszt szívelégtelenség stádiumában a fibrózis fokának csökkenése volt elérhető PARP-gátló kezeléssel [64, 97]. Jelen munkánkban a célszervkárosodások kialakulásának korai fázisát vizsgálva azt találtuk, hogy L-2286 a remodelling korai fázisában is képes volt a miokardiális intersticiális fibrózist mérsékelni és késleltetni a hipertenzív szívbetegség kialakulását (22. ábra).

6.3.3. L-2286 kezelés védő hatása a magas vérnyomás okozta központi idegrendszeri károsodásokkal szemben

Egy újabb vizsgálatunkban a magas vérnyomás betegségnek a központi idegrendszerre gyakorolt hatását és az L-2286 kezelés védő hatásának feltérképezését tűztük ki célul. A magas vérnyomást, mint oki tényezőt a PARP-gátló kezelés nem befolyásolta

számottevően (28. és 35. ábra). Azonban a nyaki nagyerek struktúráját és funkcióját kedvezően befolyásolta az L-2286 kezelés.

A KIR-ben magas vérnyomás következtében lezajló változások jellemzésére a dorzális hippocampust választottuk. A dorzális hippocampus régiója jól jelzi a hipertenzió, valamint a következményes oxidatív stressz hatására végbemenő patológiás elváltozásokat, ezért vizsgálata a szakirodalomban széles körben elfogadott [158].

A hipertenzív patkányok agyában az agykamrák tágulatát láttuk, emellett a dorzális hippocampus jellegzetes elváltozásokat mutatott SHR állatokban (38. ábra). A mediolateralis tengely rövidülése, a gyrus dentatus deformációja a csúcsi rész ellapulásával volt a leginkább szembevetendő elváltozás a hipertenzív állatok agyában, mely eltéréseket primeren valószínűleg a 3. agykamra és az oldalkamra kitágulása által kifejtett nyomás okozott (SHR-C). Farmakológiai PARP-gátlás nem csökkentette jelentősen ezen malformációk kialakulását (SHR-L), azonban a hippocampust ellátó erek struktúrája sokkal intaktabbak voltak ezen állatokban, mint az SHR-C csoportban. Kontroll SHR állatokban ezen erek lumene irreguláris és sokfelé észlelhető lacunaris perivaszkuláris fehérállomány károsodások is. Ez utóbbi elváltozások WKY állatokban nem voltak kimutathatók, L-2286 kezelt SHR-ekben pedig jóval ritkábban fordultak elő (40. ábra F).

Mikroszkóposan a CA1 régióban az oxidatív sejt-, illetve DNS károsodás következtében kialakuló piramissejt vesztés mértékének a meghatározásakor (40. ábra B és C) az irodalmi adatoknak megfelelően azt találtuk, hogy hipertenzív állatokban lényegesen alacsonyabb volt a sejtszám a normotenzívékéhez képest [214]. L-2286 kezelés hatására azonban hipertenzív állatokban a piramissejtek száma magasabb maradt a kezeletlen állatokhoz képest.

A piramissejt vesztés mellett SHR állatokban az astroglia aktivációja figyelhető meg, mely a BBB létrehozásában, javításában játszik szerepet [30, 159](40. ábra F). Az astrociták száma nem különbözött jelentősen a különböző patkány törzsek között, azonban méretük megnőtt, illetve a perivaszkuláris immunoreaktivitás mértéke is fokozódott SHR állatokban. Krónikus L-2286 kezelés csökkentette az astroglia sejtek számát, méretét és perivaszkuláris felszaporodásuk mértékét SHR állatokban (SHR-L), mely a stressz mértékének csökkenéseként értékelhető.

6.4. A farmakológiai PARP-gátlással kiváltott kardioprotekció mértékének összehasonlítása már igazolt hatású komparátor molekulákkal

A krónikus élőállat modellekből származó eredményeknek van a legnagyobb jelentősége az alapkutatásban, amennyiben a közeljövő potenciális kezelési lehetőségeit és targeteit kívánjuk azonosítani. Azonban az így nyert eredmények jelentősége is akkor mérhető csak fel igazán, ha a kísérleti, új hatásmechanizmust képviselő molekula hatását, hatékonyságát egy már bizonyított, sőt ideálisan a humán klinikai gyakorlatban is hatékonyan alkalmazott kezeléssel hasonlítjuk össze. A PARP-gátló kezelés hatékonyságát kétféle szívelégtelenség modellben ezért hasonlítottuk össze már igazoltan előnyös hatású komparátor molekulákéval.

Posztinfarktusos szívelégtelenség modellben az ACE-gátló enalapril választottuk, mint összehasonlító molekulát. Az ACE-gátlás a szisztolés szívelégtelenség preventív kezelésének a legfontosabb és legrégebben alkalmazott pillére [2]. Vizsgálatunk tervezésekor az ACE-gátlók közül az enalaprillal állt rendelkezésre a legtöbb evidencia (pl. CONSENSUS, SOLVD) [215, 216], ezért esett a választás erre a hatóanyagra. Az alkalmazott dózist pedig az alapján választottuk ki, hogy krónikus élőállat modellekben mi volt a leggyakabban alkalmazott dózis [217-220].

Toxikus (antraciklin-indukálta) szívelégtelenség modellben egy másik molekulával, a jól ismert antioxidáns hatású szuperoxid dizmutáz mimetikummal, a TEMPOL-al történt a PARP-gátlás összehasonlítása. Mivel az antraciklin kezelés mellett kialakuló kardiotoxicitás a fokozott szabadgyök képződés (elsősorban szuperoxid anion, illetve a Fenton reakció során hidroxil gyök) következtében kialakuló apoptotikus sejthalál következménye [221], így az időben jól behatárolható oxidatív stressz elleni védelemben scavenger molekulák alkalmazása logikus terápiás opciónak tűnik. Az általunk az összehasonlításra kiválasztott molekula, a TEMPOL hatékonyságát antraciklin indukálta kardiotoxicitás kivédésében több munkacsoport is igazolta korábban [222, 223].

6.4.1. Az enalapril és az L-2286 hatékonyságának összehasonlítása posztinfarktusos szívelégtelenség modellben

Izoproterenollal kiváltott szívelégtelenség modellben a gravimetriával és echocardiographia során meghatározott balkamra hipertrófiát jelző paraméterek (VW, VW/BW, VW/TL, Septum, PW vastagság) mind enalapril, mind L-2286 kezelés során jelentősen csökkentek a kezeletlen ISO állatokhoz képest. Ráadásul a szisztolés balkamra funkciót jelző EF és FS a PARP-gátló kezelésben részesülő állatok esetében lényegesen jobb maradt, mint ACE-gátlás esetében (3. és 4. táblázat). A PARP-gátló L-2286 tehát kísérletes állatmodellünkben egyenértékű, sőt bizonyos paraméterek esetén hatékonyabb védő hatást mutatott a szívelégtelenség kialakulásával szemben, mint a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazott enalapril.

6.4.2. A TEMPOL és az L-2286 hatékonyságának összehasonlítása antraciklin indukálta toxikus szívelégtelenség modellben

Toxikus szívelégtelenség modellben összehasonlítva a PARP-gátló L-2286 és a scavenger hatású TEMPOL hatékonyságát a szívelégtelenség kialakulásával szemben azt találtuk, hogy mindkét molekula hatékony védő hatással rendelkezett.

Mindkettő csökkentette a doxorubicin kiváltotta szisztolés (EF, FS, MPI) és diasztolés (E/E', MPI) szívfunkció romlását. Mindkét csoportban csökkentek a szívelégtelenség súlyosságát jelző paraméterek értékei (nedves/száraz tüdő arány, BNP), továbbá javult az állatok túlélése. PARP-gátlás azonban a túlélés és a nedves/száraz tüdő arány vonatkozásában szignifikánsan jelentősebb védő hatással rendelkezett, mint a TEMPOL kezelés (8. és 9. táblázat; 19. ábra).

6.5. A PARP-gátlás kardiovaszkuláris protektív hatásának molekuláris és szubcelluláris aspektusai

A krónikus stresszfaktorok hatására bekövetkező szív- és érrendszeri átépülés, valamint a szívelégtelenség mérséklése hátterében az L-2286 kezelés számos szubcelluláris organelum funkcióját és molekuláris folyamatot modulál. Ezek egymással szoros ok-okozati viszonyban állnak, ezért az alábbi struktúrálás ugyan meglehetősen mesterséges, de didaktikai okból szükséges.

6.5.1. A PARilácó és az oxidatív stressz befolyásolása PARP-gátló kezeléssel

Az L-2286 hatását a PARP enzim aktivitására sejtkultúrán történt jellemzés mellett minden krónikus állatmodellben megvizsgáltuk. A PARP enzim aktivitását a fehérjék, legtöbb vizsgálatban magának a PARP-nak az autoPAR-ilációjával jellemeztük. A PAR-iláció mértéke már a korai kardiális és vaszkuláris remodelling kialakulása során jelentősen megnőtt, ami a késői szervkárosodás, a manifeszt szívelégtelenség stádiumában még tovább emelkedett. A PARP enzim aktivációjának legerősebb triggere az oxidatív stressz következtében kialakult egyes láncú DNS törés [87-90], ezért figyelmet fordítottunk a DNS károsodás igazolására.

Az irodalmi adatokkal és a PARP aktivációval egyező módon azt találtuk, hogy a szívizomzatban IR során, valamint krónikus állatmodellekben a miokardiumban, az érfalban és a központi idegrendszerben egyaránt a szabad gyökös károsodás masszív jelei voltak észlelhetők [40, 41, 45, 51, 54, 137, 147, 185] (31., 36. és 39. ábra). Emelkedett volt a lipid peroxidációra jellemző TBAR anyagok, illetve a 4-HNE szintje. A fehérjék oxidatív károsodására utaló karboniláció (aldehid és keton csoportok mennyisége) mértéke mellett a nitrozatív stressz által kiváltott fehérjekárosodás mértékét jelző nitrotirozin (NT) szintje is jelentősen megnőtt.

A DNS oxidatív károsodásának a 8-oxoguanozin egy elfogadott mérője [224]. A 8-oxG a PARP aktivációval parallel módon emelkedett volt saját adatunk szerint a krónikus stressz modellekben.

Eredményeink az irodalmi adatokkal egyezően azt mutatják, hogy nemcsak akut (IR), hanem krónikus stressz (hipertenzió, toxikus faktorok, posztinfarktusos állapot) mellett

is az oxidatív sejtkárosodás jelei észlelhetők a kardiovaszkuláris rendszerben [40-42, 45-48].

Irodalmi, illetve munkacsoportunk korábbi adatai szerint az oxidatív stressz-indukálta DNS károsodás következtében aktiválódik a nukleáris poli(ADP-ribóz)polimeráz enzim, melynek szerteágazó celluláris hatásai vannak [64, 94, 225, 226]. A PARP aktiváció egy energiahányos állapotot hoz létre, poszttranszlációs módon módosítja a fehérjék funkcióját, kedvezőtlen módon befolyásolja az intracelluláris jelátviteli faktorok aktivitását, illetve a mitokondriumokat károsítva szekunder módon további szabad gyökök termelődését indukálja [64, 94, 227].

SHR állatokban az oxidatív stressznek számos forrása ismert. A mitokondriális légzési lánc mellett fokozott a xanthin oxidáz mennyisége és aktivitása is [76, 228]. Az endotélben és a perivaszkuláris szövetekben a $O_2^{\cdot-}$ termelődés jelentős forrása a a szétkapcsolt eNOS és a NOX enzim [185]. A fokozott szuperoxid anion szint jelentősen csökkenti a vazodilatátor hatású NO, biohasznosulását és ezáltal endotél diszfunkcióhoz, az értónus fokozódásához, illetve a szövetek vérellátottságának csökkenéséhez vezet [209]. SHR állatok carotisában ennek megfelelően mi magunk is azt észleltük, hogy az endotél-függő (ACh-indukálta) vazorelaxációs képesség jelentősen csökkent a normotenzív állatokhoz képest (36. ábra).

L-2286 kezelés mind akut, mind krónikus stressz szituációkban jelentősen csökkentette a PARP enzim aktivitását (17., 23., 30. és 40. ábra), ezért a PARP-gátlás hatására csökken a mitokondriális ROS-indukálta másodlagos ROS termelődés, ezért mind az érrendszerben, mind az ellátott szövetekben (miokardium, agy) mérséklődtek a szabad gyökök károsodás jelei és következményei, csökkentek a lipidek, a fehérjék és a DNS oxidatív károsodás markerei.

Az érfalban kiváltott protektív, antioxidáns hatás következtében az endotél-dependens vazorelaxáció szignifikánsan javult L-2286 kezelés hatására a kezeletlen hipertenzív állatokhoz képest párhuzamosan a csökkent érfali NT tartalommal (36. ábra).

6.5.2. Farmakológiai PARP-gátlás hatása a kötőszövetes átépülésre

A fokozott szabadgyök termelődés több receptor és számos jelátviteli út aktiválásával indítja el a kardiovaszkuláris remodelling folyamatát. Ezek közé tartoznak az α és β

adrenerg receptorok, az Ang II AT1 receptora, valamint a MAP kinázok, egyes PKC izoenzimek és bizonyos transzkripciós faktorok (pl. NF- κ B) [45, 229].

Az általunk vizsgált krónikus élőállat modellek túlnyomó többségében a vizsgált szervek (szív, illetve a nagyerek fala) hipertrófiával, megvastagodással reagáltak az őket ért tartós stresszre. Gravimetriás, valamint echocardiographiás vizsgálattal a balkamra falának hipertrófiája volt igazolható posztinfarktusos és krónikus emelkedett utóterhelés (SHR) által indukált szívelégtelenség modelleinkben. Emellett a hipertenzió által indukált korai szervkárosodásokat, a hipertenzív szívbetegséget és a vaszkuláris remodellinget vizsgálva fiatal SHR állatokban az aorta és a carotis falának megvastagodása (IMT) és az érfal merevségének (ASI) fokozódása volt észlelhető.

Az intersticiális fibrózis az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék, így a kollagén és a fibronectin lerakódása a sejtek között. A fibrózis a károsodott szövetek és sebek gyógyulását segíti elő, azonban ha jelentős mértékűvé válik a folyamat, akkor a szervek és szövetek működészavarához, szervelégtelenséghez vezethet [230, 231]. A remodelling, elsősorban a maladaptív/patológiás remodelling folyamatának vezető szövettani folyamata a fibrózis, az intersticiális kollagén akkumuláció. A fentebb felsorolt kardiovaszkuláris károsodások, az érfali és miokardiális átépülés hátterében masszív fibrózis volt észlelhető Masson's trikróm festéssel (10., 16., 22., 29. és 35. ábra). A nagyerek falában elektronmikroszkópia is megerősítette a jelentős fokú kollagén lerakódást. Emellett azt is igazolta, hogy az érfali fibrózis SHR állatokban invazivitást mutat, a kollagén kötegek áttörik az endotél sejtek rétegét és az ér lumenében domborodva thrombogén felszínt képeznek, ami már az akut vaszkuláris események (pl. stroke) veszélyét is magában hordozza (29. ábra).

Az antraciklin kezeléssel kiváltott toxikus szívelégtelenség esetén ugyan nem észleltünk balkamra hipertrófiát a többi modellel ellentétben, ellenkezőleg, a balkamrai tömeg szignifikánsan csökkent a szívizomsejtek apoptózisa miatt. Azonban irodalmi adatok alapján itt is jelentős kötőszövetes átépülés észlelhető a szívizomvesztés mellett [188, 232].

Farmakológiai PARP-gátlás L-2286 kezeléssel mérsékelte a hipertenzív szívbetegség és a vaszkuláris remodelling kialakulását SHR állatokban, valamint a megakadályozta a manifest szívelégtelenség kifejlődését posztinfarktusos, toxikus és hipertenzív szívelégtelenség modellekben. E védő hatásban az antifibrotikus effektus minden esetben központi fontosságúnak bizonyult.

A fibrózis folyamatának elindításában jelentős szerepe van a mechanikai stressz mellett a neurohumorális faktoroknak, illetve az oxidatív stressznek is. A kiváltó szignáloknak a sejtmag felé továbbításában és a transzkripció folyamatának elindításában azonban számos jelátviteli és transzkripciós faktor is részt vesz [28, 45, 148, 173]. Az általunk is vizsgált jelátviteli faktorok mennyiségében/aktivitásában észlelt változások a következő fejezetben kerülnek részletezésre.

6.5.3. A remodellingben és a sejttúlélésben szerepet játszó intracelluláris jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitásának befolyásolása L-2286 kezeléssel

Az a megfigyelésünk, hogy a PARP-gátlóval kezelt spontán hipertenzív állatokban (SHR-L) jelentősen csökkent a balkamra hipertrófia mértéke és a carotis artéria falvastagsága annak ellenére, hogy az L-2286 kezelés nem csökkentette az állatok vérnyomását, hangsúlyozza egyéb tényezők, így a jelátviteli faktorok szerepét a fenti folyamatokban.

6.5.3.1. Jelátviteli faktorok a kötőszövetes átépülés hátterében

A szerin/threonin kinázok családjába tartozó protein kináz C (PKC) hatására a szívben akutan gyors kontraktilitásváltozás, krónikus esetben pedig balkamrai remodelling alakul ki. Többféle PKC izoforma létezik, a konvencionális izoformák közé az α , a β I, β II és γ tartoznak, az újszerűek közé a PKC δ és ϵ , míg az atípusosak közé a ζ és a ι/λ izoformok tartoznak [233].

Különböző stresszfolyamatok során (iszkémia, hipertónia, szívelégtelenség) a legtöbb izoforma mennyisége és aktivitása megemelkedik [234-237]. A kardiovaszkuláris rendszerben a legnagyobb mennyiségben a PKC α található meg, melynek a remodellingben érdemi szerepe nincs, azonban negatívan befolyásolja a szív kontraktilitását, rontja a diasztolés funkciót és fokozza az erek vazokonstriktív képességét [104, 238].

A PKC β izoformájának azonban már jelentős szerepe van a patológiás remodelling és a szívelégtelenség kialakulásában. PKC β overexpressziójakor ugyanis jelentősen fokozódik az intersticiális kollagén lerakódás mértéke, valamint csökken a szív

kontraktilitása. Ennek hatására, valamint az L-típusú Ca^{2+} -csatornák működésének befolyásolása által fokozódik a kamrai ritmuszavarok és a hirtelen szívhalál veszélye is [239-242].

A PKC β aktiválódása jelen tudásunk szerint a fibrózis folyamatában központi szerepet játszó faktorok (TGF- β , CTGF) termelődésének fokozásán keresztül képes kiváltani a patológiás remodelling folyamatát [243-245], mely végül az érintett szerv elégtelen működéséhez vezet.

Posztinfarktusos szívelégtelenség modellünkben vizsgálva az infarktuson átesett kezeletlen állatokban az össz PKC aktivitás, valamint a PKC α/β II izoformák foszforiláltsága jelentősen emelkedett a kontroll állatokéhoz képest. Mind a PARP-gátló kezelés (L-2286), mind az ACE-gátló (enalapril) alkalmazása jelentősen csökkentette ezen szignalizációs faktorok aktivitását, azonban az L-2286 hatása kifejezettebbnek bizonyult a komparatív vizsgálatban (11., 14-15. ábra). Ezen pozitív változásokkal megegyező módon a szívizomzat kötőszövetes átépülésének mérséklődését is észleltük. Ráadásul az echocardiographia során a kezelt csoportokban (ISO+L, ISO+E) a szisztolés balkamra funkció csökkenése is jelentősen mérséklődött. E pozitív hatás hátterében az egyik lehetséges magyarázat a negatív inotróp hatású PKC α gátlása lehetett.

A PKC δ is aktiválódik/up-regulálódik stressz szituációk hatására [233]. Szerepet játszik a hipertónia hatására kialakuló vaszkuláris remodelling folyamatában [245], továbbá a szív patológiás remodellingjét és a manifeszt szívelégtelenség kialakulását is előmozdítja a SERCA2 downregulációja, egyes MAP kinázok (JNK, p38-MAPK) aktivitásának növelésén, a mitokondriális szabad gyök termelődés fokozásán és az apoptózis indukálásán keresztül [246-252].

Az irodalmi adatokkal egyező módon szívelégtelenség modellben a posztinfarktusos állatokban a PKC δ aktivitása emelkedett, melyet a farmakológiai intervenció (PARP-gátló kezelés) szignifikánsan mérsékelni tudott (11. és 14. ábra). Ezzel párhuzamosan változtak a kardiovaszkuláris rendszerben a fibrotikus folyamatok is kísérletes rendszereinkben.

Az atípusos PKC izoformák (PKC λ/ζ) foszforiláltsága is az előzőekhez hasonló módon változott meg vizsgálataink során, a PARP-gátló kezelés ugyanis jelentősen mérsékelte a szívelégtelenség által indukált emelkedett foszforiláltsági állapotot (14. ábra). A PKC λ és ζ izoformáinak kardiális hatásairól egyelőre ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Az azonban igazolódott, hogy emelkedett aktivitásuk következtében az

érfalban megnő a simaizomsejtek mennyisége és a meglévő sejtek hipertrófiáznak, ezáltal az atípusos izoformák szerepet játszanak a hipertónia során az érfali megvastagodás (IMT) és a megemelkedett artériás stiffness (ASI) kialakításában [253]. A kalcium independens PKC izoforma, a PKC ϵ aktivitása vizsgálataink során ellentétesen változott a többi izoformával (15. ábra). Stressz hatására volt a legalacsonyabb a PKC ϵ foszforiláltsága, amit a farmakológiai PARP-gátlás jelentősen növelt (az ACE-gátlás hatása kevésbé volt kifejezett). Ez különösen a PKC δ esetében fontos, mivel irodalmi adatok alapján a PKC ϵ a PKC δ negatív regulátora, így annak az előbbiekben taglalt mennyiségi és foszforiláltsági változásaiért is részben ez az izoenzim a felelős [254, 255]. A PKC ϵ ezáltal antagonizálja a PKC δ negatív hatásait. Indirekt módon mérsékli a MAPK aktivitást, gátolja a stresszfaktorok által provokált remodellinget, antiapoptotikus hatású. Antiapoptotikus hatását részben a fiziológias mitokondriális működés megőrzésével éri el, részben az mPTP-re gátló hatásával. Mindkét hatás eredményeképp mérséklődik az oxidatív stressz során a mitokondriális fehérjék (pl. citokróm c) kiáramlása a citoszólba és ezáltal csökken az apoptózis folyamata [255-258].

A PKC egyes izoformái mellett az MKP-1 - MAPK rendszer is komoly szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer kötőszövetes átépülésében. A MAP kinázok tagjainak aktivitását krónikus stressz, például hipertónia során az angiotenzin II által fokozott szabad gyök termelődés, a fokozott mechanikai igénybevétel, illetve neurohumorális faktorok növelik. A MAP kinázok azután egy olyan transzkripció programot indítanak el, aminek sejtproliferáció, hipertrófia, vaszkuláris simaizomsejt migráció, fibrózis és a stresszelt szövetben észlelt gyulladás illetve sejthalál a következménye.

Irodalmi adatokból ismert, hogy oxidatív stressz hatására fokozódik az ASK1 aktivitása, mely a sejthalál mellett a fibrózis elindításában is fontos szerepet játszik. Ez utóbbiban downstream targetei a MAP kináz család két tagja, a JNK és a p38-MAPK [259, 260].

TGF- β 1 a kardiovaszkuláris fibrózis központi szereplője, mely egyfelől az ALK-5 és Smad2/3 útvonalon keresztül fejti ki hatását. A Smad útvonalon kívül azonban egyéb útvonalak aktiválásával is képes kifejteni profibrotikus hatását. A TGF- β a TGF- β -aktiválta kináz 1-en (TAK1), illetve a Ras-on keresztül a MAP kinázok aktivitását is fokozza [261-267].

A ROS is fokozza a fibrózist a TGF- β és a MAPK-ok aktivációjának köszönhetően. Ezek a faktorok fokozzák ugyanis a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) expresszióját. A PAI-1 a primer funkciója mellett az ECM lebontásában is szerepet játszó plazminogén működését is gátolja. A plazminogén pedig direkt, illetve indirekt módon a MMP-k aktiválásával fejt ki antifibrotikus hatását. A PAI-1 expressziójának megemelkedését számos fibrózissal járó betegség esetében sikerült kimutatni [268-275].

Ezzel egyezően a MAPK tagjainak fokozott aktivitását észleltük SHR állatok nagyereiben (30. ábra), mely együtt járt az érfal megvastagodásával, merevebbé válásával, valamint egy markáns és invazív fibrózissal [276]. Normál körülmények között a különböző szövetekben az MKP-1 - mely defoszforilálja és így gátolja a MAPK aktivitását - csak igen alacsony koncentrációban mutatható ki, azonban stressz szituációkban egy negatív feed-back szabályozás miatt a MAPK rendszer emelkedett aktivitása a DUSP-1 gén fokozott átíródásán keresztül megemeli a mennyiségét [277]. Rádásul a MAP kinázok különféle mechanizmusokon keresztül szabályozzák az MKP-1 stabilitását és aktivitását is. Ezáltal az SHR-C állatokban a normotenzívekhez képest észlelt megemelkedett MKP-1 mennyiség a MAPK rendszer aktivitásához kötött. Munkacsoportunk korábbi sejtkultúrás (nem kardiális sejteken) eredményei alapján oxidatív stressz során a PARP-1 az MKP-1 expresszió negatív regulátora lehet [249, 276]. A PARP-1 ugyanis megváltoztatja az aktiváló transzkripciós faktor-4 (ATF4) DNS kötő képességét [155]. Ezért az L-2286 nevű PARP-gátló alkalmazásával SHR állatokban észlelt csökkent MAPK aktivitás háttérében álló magasabb MKP-1 szint a PARP-enzim blokkolásának direkt következményének tekinthető (33. és 37. ábra). Ugyanakkor ez a hatás csak stressz szituáció során észlelhető, normotenzív állatokban nem, hiszen ott nincs érdemi PARP-aktiváció.

A remodelling folyamata során emelkedik a gyulladásos mediátorok (TNF- α , IL-1 β , IL-6) szintje is. A folyamat elindításában az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódása központi jelentőségű [278]. Az NF- κ B a sejtet érő különféle stressz szituációk következtében, így az oxidatív stressznek a következtében aktiválódik. Ezért és mivel a PARP-1 fontos koregulátora az NF- κ B-nek a gyulladásos folyamatokban [157], ennek a transzkripciós faktornak az aktivitását is meghatároztuk. Kezeletlen hipertenzív állatokban a PARP-1 aktivációval párhuzamosan az NF- κ B mennyisége és nukleáris transzlokációja is jelentősen fokozódott a normotenzív állatokhoz képest (34. és 37. ábra).

Az endotél réteg sérülésének és a károsodott barrier funkciónak köszönhető a PARP-1 és NF- κ B aktiváció, valamint a proinflammatorikus mediátorok megemelkedett expressziója a vaszkulátúrában [279]. A gyulladás következtében aztán az indukálható NOS (iNOS) termelt NO fokozza az ONOO⁻ termelődését, ami aztán további PARP aktivációhoz vezet [280]. A PARP-1 a koregulátor szerepen túlmenően úgy is fokozza az NF- κ B transzkripció aktivitását, hogy megnöveli a transzkripció faktor magbeli szintjét azáltal, hogy gátolja az interakcióját a nukleáris export receptor CRM1-el PARiláció segítségével [281]. Ennek eredményeképp az NF- κ B bent marad a sejtmagban. L-2286 kezelés hatására ez a folyamat jelentősen csökken az NF- κ B celluláris szintje, illetve nukleáris transzlokációja, hiszen gyakorlatilag kimutathatatlan volt a sejtmagban. Ennek következtében csökken a gyulladásos folyamatok intenzitása és csökken a nitrozatív sejtkárosodás. Ezek a hatások is szerepet játszhattak az endoteliális védő hatás és a fibrotikus remodelling kialakulásával szemben.

6.5.3.2. Sejt túlélésben szerepet játszó jelátviteli faktorok

Egyre több adat mutatja, hogy a PI3K/Akt-1/GSK-3 β út a legfontosabb sejt túlélést elősegítő (ún. prosurvival) jelátviteli útvonal. Downstream targeteinek köszönhetően szerteágazó hatásai vannak, melyek a sejtekben, így a kardiovaszkuláris rendszer legfontosabb sejt típusaiban (szívizomsejtek, endotél sejtek, vaszkuláris simaizomsejtek) is a fiziológiás növekedést, a stressz hatásokkal szembeni védő hatás kialakulását és a sejtek metabolizmusának javítását szolgálják. Emellett járulékos, másodlagos hatásoknak köszönhetően antiinflammatorikus és antifibrotikus hatással is rendelkezik [100-102, 106, 225].

A sejtet érő oxidatív vagy mechanikai stressz hatására ezen útvonal foszforilációja fokozódik, aktivitása nő (kivéve a GSK-3 β -t, ahol a foszforiláció funkcióvesztéssel jár) [282]. Jelentős szerepe van a fiziológiás stressz (pl. fizikai aktivitás) hatására bekövetkező adaptív hipertrófia kialakulásában. Még jelentős fokú konstitutív aktiváció esetén sem megy át a fibrózissal, apoptózissal, illetve csökkent szisztolés és diasztolés szívfunctióval jellemezhető maladaptív hipertrófiába [1]. Átmeneti, sőt a szívizomsejtekben kiváltott konstitutív aktiváció hatására is csak adaptív hipertrófia alakul ki jó balkamra functióval, mely nem progrediál maladaptív hipertrófiába és

szívelégtelenségbe [1, 283]. Ennek hátterében számos folyamat kedvező befolyásolása áll.

Az Akt-1 részben az eNOS aktiválásán keresztül, részben az mTOR-on aktiválásán keresztül fokozza az érújdonképződés mértékét [103, 284, 285]. Az mTOR az S6K1 foszforilálásán keresztül fokozza a HIF1 α transzlációját és következményesen növeli a hipoxia stressz fehérjék (VEGF, PDGF) transzkripcióját. Az érújdonképződés hatására a hipertrofizált miokardium vérellátása megfelelő marad, ennek hiányában azonban jelentős miokardium területek válnak iszkémiássá, ahol az energiahány miatt a sejtek diszfunkcionálissá válnak, súlyosabb esetben pedig sejthalál következtében csökken a kontraktilis sejtek száma [286-288].

Az Akt-1 aktivációja emellett csökkenti a szívben mind a kaspáz dependens, mind a kaspáz independens apoptózis folyamatát [289, 290]. A „RISK” szignalizációs útvonal tagjaként a PI3K-Akt jelátviteli faktorok gátolják a mitokondriumokban az mPTP nyitását ezáltal véd a sejthalál kialakulásával szemben. A prosurvival hatás döntően ennek köszönhető [291].

Emellett az Akt-1 a FOXO transzkripciós (FRKH) faktorokat is foszforilálja. A foszforiláció hatására a FOXO fehérjék eltávolításra kerülnek a sejtmagból, ezáltal gátlódik a FOXO-mediálta proapoptotikus gének transzkripciója [292, 293]. Csökken a FasL termelődése, mely a FasR-on keresztül indítja el az apoptózis extrinsic útvonalát. A FasL fokozza emellett a proinflammatorikus citokinek mennyiségét is (TNF- α , IL-1 β , IL-6), ezáltal fokozva a fibrózis mértékét. Ezért a FasL mennyiségének csökkenése az Akt-1 aktiváció hatására antifibrotikus hatású [294]. Emellett az Akt-1 a MMP-ok mennyiségének és aktivitásának növelése által is csökkenti az intersticiális fibrózis mértékét [295].

Vizsgálataink során számos modellben határoztuk meg az Akt-1 és a GSK-3 β foszforiláltságában bekövetkezett változásokat (13., 17., 20., 24. és 30. ábra). Az irodalmi adatokkal egyező módon csaknem minden szívelégtelenség modellben, illetve a vaszkuláris és miokardiális remodelling vizsgálata során a stressz hatására a mindkét faktor foszforiláltsága szignifikánsan emelkedett. Ez alól csak az idős, már manifeszt, végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő állatok jelentettek kivételt, itt mindkét faktor foszforiláltsága csökkent volt a kezeletlen SHR csoportban (SHR-C) a normotenzívekhez képest (17. ábra). Irodalmi adatok alapján igen előrehaladott betegség esetén pontosan ez

a változás várható. Túlélési vizsgálatunk során közel 80 %-os volt ebben a csoportban a mortalitás, mivel ezen állatokban valóban igen súlyos szívelégtelenség alakult ki [101]. PARP-gátló kezelés mellett az Akt-1 foszforiláltsága jelentősen tovább fokozódott minden krónikus állatmodellünkben (illetve a csökkenés helyett lényegében normalizált értéket láttunk idős szívelégtelen SHR állatokban). Egyes munkákban a kontroll nem stresszelt csoportban is adva az L-2286-ot, szintén emelkedett foszforilációt észleltünk az Akt-1/GSK-3 β esetében. Ez alapján felmerül, hogy a PARP-gátlás direkt hatással bír ezen faktorok foszforilációjára.

E hatásnak szerepe lehet a szívelégtelenség kialakulásának és a különböző hipertenzív célszerv károsodások késleltetésében az antiapoptotikus és a metabolizmust kedvezően befolyásoló hatásnak köszönhetően. Az apoptózis gátlását agyi mintákban a TUNEL pozitív sejtek számának meghatározásával jellemeztük. SHR állatokban jelentősen emelkedett ezen sejtek száma (40. ábra). A folyamat hátterében a kaszpáz independens apoptotikus faktornak, az AIF-nak a nukleáris transzlokációja emelkedett volt. L-2286 kezelés mellett azonban ezek az elváltozások mérséklődtek (32. és 37. ábra). Toxikus és hipertenzív szívkárosodás esetén a FKHR foszforiláció is az Akt-1/GSK-3 β mintázatnak megfelelően változott (20. és 24. ábra). Az L-2286 kezelés az FKHR transzlokáción keresztül a gyulladásos mediátorok szintjét, valamint következményesen a kötőszövetes átépülés mértékét is csökkentette.

6.5.4. PARP-gátlás hatása a hősokk fehérjék szintjére

A sejtekben különböző stresszorok (túl magas hőmérséklet, oxigénhiány, oxidatív stressz, energiahány és acidózis) hatására transzkripciós faktorok - pl HSF-1 – aktiválódásán keresztül fokozódik a hősokk fehérjék termelődése [296]. A hősokk fehérjéket molekulatömegük (10-110 kDa) alapján csoportosítjuk. Intracellulárisan jelen vannak a sejtplazmában, a sejtmagban és a mitokondriumban, illetve az extracelluláris térben is mérhetők. Legjellemzőbb feladatuk dajkafehérjeként más fehérjék kedvező térszerkezetének kialakítása (molekuláris chaperonok), illetve a különféle noxák által denaturált fehérjék konformációját is rendezik [297, 298].

A hősokk fehérjéknek jelentős hatása van a kardiovaszkuláris rendszerben is, ezt a Hsp90, Hsp84, Hsp70, a Hsp27 és 20 esetében is igazolták [298]. Kedvezően modulálják az erek vazorelaxációs képességét. A Hsp90 mind az eNOS-hoz, mind az sGC-hez kapcsolódhat,

melyen keresztül javul az érrelaxáció [299]. A hősokk fehérjék emellett megvédik a szívizomzatot különféle stressz szituációkban, így pl. iszkémia-reperfúzió során. Ennek hátterében részben a mitokondrium struktúrájára és a mitokondriális légzési lánc fehérjéinek funkciójára gyakorolt kedvező hatás áll [300-302].

Vizsgálatunkban fiatal SHR állatokban a kónikusan emelkedett vérnyomás hatására nem nőtt meg érdemben a Hsp 72 és 90 celluláris mennyisége a normotenzív állatokhoz képest (23. ábra). Feltehetően az alacsony intenziású, még viszonylag korai stádiumú szervkárosodás miatt nem észleltünk komolyabb változást. PARP-gátló kezelés L-2286 adásával a két vizsgált fehérje közül a Hsp90 esetében szignifikánsan megemelte a fehérje mennyiségét, mely szerepet játszhatott a mitokondriális védő hatás kialakításában és a kardiovaszkuláris szervkárosodások csökkenésében.

Doxorubicin indukálta szívelégtelenség modellben azonban ennél jelentősebb változásokat észleltünk. Az irodalmi adatokkal egyezően a krónikus doxorubicin kezelés kiváltotta jelentős celluláris stressz hatására mindkét általunk vizsgált Hsp szintje megnőtt [302, 303] (21. ábra). Ebben a modellben a PARP-gátló L-2286 szignifikánsan tovább növelte mind a Hsp72, mind a Hsp90 mennyiségét, sőt a normotenzív állatokban is megnőtt L-2286 kezelés hatására a celluláris szintjük. Ez alapvetően két lehetőséget vet fel. Egyfelől lehetséges lenne, hogy az L-2286-nak a saját – PARP-gátlástól független – hatása lenne a Hsp expresszió fokozására. Másfelől viszont felmerülhet, hogy a PARP-gátló kezelés direkt módon befolyásolja a hősokk fehérjék expresszióját. Ez utóbbi felvetést támasztja alá Zingeralli és munkatársai által publikált adat, miszerint PARP-1^{-/-} állatokban stressz hatására fokozódik a hősokk fehérjék expressziója a vad típushoz képest [304].

A hősokk fehérjék által kiváltott citoprotekcióban szerepet játszhat a prosurvival jelátviteli faktorok aktiválása is. Irodalmi adatok alapján a Hsp90 és Hsp72 az Akt-1 aktivációját okozza stressz szituációkban [302, 305, 306]. Fan és munkacsoportja szerint egy másik hősokk fehérje, a Hsp20 overexpressziója a szívben részben az Akt-1 aktivációja révén csökkenti a DOX-indukálta sejtkárosodást [302]. Felmerül tehát a lehetőség, hogy az általunk a legkülönbözőbb modellekben a farmakológiai PARP-gátlás mellett észlelt Akt-1 aktiváció hátterében is részben a Hsp-k expressziójának növekedése áll. Emellett Shinohara szerint a Hsp72 defoszforilálja és inaktíválja a JNK-t, mely apoptózist indukál, fokozza a fibrózist és így maladaptív hipertrófiához és végeredményben szívelégtelenség kialakulásához vezet. Doxorubicin indukálta

szívelégtelenség modellben mi magunk is ezzel egyező módon a JNK aktivitásának csökkenését észleltük a PARP-gátlót kapó állatokban.

6.5.5. A PARP-gátlás hatása a sejt energetikai jellemzőire, valamint a mitokondrium funkcionális és struktúrális változásaira

A sejtek sorsát befolyásoló válaszreakciók többsége a mitokondriumra konvergál és direkt, vagy indirekt módon befolyásolja azok struktúráját és funkcióját [307]. Azonban akut és krónikus stressz szituációkban eltérő mechanizmusok lehetnek a dominánsak. A Berger által leírt sejthalál, a „parthanatos” akut stressz hatására következik be. A DNS károsodás következtében a PARP-1 enzim jelentős aktivációja következik, mely a sejt NAD^+ tartalmának drámai csökkenéséhez és metabolikus katasztrófához, valamint nekrotikus sejthalálhoz vezet [308].

Később kerültek leírásra az akceptor fehérjéről levált PAR polimerek szignalizációs hatásai. A sejtmagból a mitokondriumba transzlokálódva elindítják az AIF kibocsátását, mely kromatin kondenzációt indukál. Vizsgálatok igazolták az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és a JNK aktiválódás szerepét is ezen folyamatban, mivel elősegítik az OMM permeabilizációját [309]. Vizsgálataink során hipertenzív állatok aorta és carotis falában az AIF nukleáris transzlokációja figyelhető meg konfokális mikroszkóppal (32. és 37. ábra). A központi idegrendszerben, a dorzális hippocampusban pedig az apoptotikus (TUNEL+) piramissejtek számának emelkedését észleltük ezen állatokban (40. ábra). PARP-1 enzim gátlása L-2286 alkalmazásával jelentősen gátolta az AIF transzlokációt, valamint ezzel párhuzamosan az apoptotikus sejthalált is. A PARP-gátlás ezen védő hatásának hátterében több folyamat is állhat. Először is az energia konzerváló hatás és a mitokondriális védő hatás következtében mérséklődött másodlagos szabadgyök termelődés gátlásán keresztül mediálódhat ez a hatás [90, 94]. Ezt a hatást támasztja alá az ex vivo szívperfúziós kísérletekben észlelt pozitív energetikai hatás is. A reperfúzió során ugyanis a magas energiájú foszfát szintek (ATP és CrP) PARP-gátló kezelés mellett gyorsabban és komplettebb módon álltak helyre (6. ábra). Emellett ISO-indukálta szívelégtelenség modellben a kezeletlen posztinfarktusos állatokhoz képest az L-2286 kezelt állatok mitokondriumaiban a légzési lánc fehérjéinek aktivitása is magasabb volt (8. ábra). A mitokondriális légzési lánc (ETC) aktivitása pedig ismerten fordítottan arányos az általa termelt szabad gyökök mennyiségével [310]. Alapvető kérdés, hogy egy

nukleáris faktor, mint a PARP enzim, hogyan képes a mitokondriumban hatást kifejteni. Erre utalóan munkacsoportunk már korán kimutatta a PARP-gátlás direkt mitokondriális védő hatását [94]. Ennek háttérében más munkacsoportok a PAR jelenlétét igazolták, amit Amati és csoportja eredményei szerint magának a PARP-1 enzimnek a sejtmagból a mitokondriális mátrixba történő átjutása magyaráz a mitofilinnel való interakció által [303].

A csökkent szabadgyök termelődés következtében az oxidatív sejtkárosodás foka is egyértelműen mérséklődött. Csökkent a lipoproteinek, a lipidek és a DNS károsodása az érfalban, az agyban és a szívizomzatban (31., 36. és 39. ábra). Különösen az idegszövetben – mely nagy mennyiségben tartalmaz telítetlen zsírsavakat – a sejtembrán és a myelin hüvely megfelelő védelme az oxidatív stressz hatásaival szemben kritikus a megfelelő funkció szempontjából. Az oxidatív stressz mérséklése PARP-gátló kezelés mellett javította a sejtek és magának az állatnak a túlélését is a már említett PAR mag-mitokondrium közti szignalizációja következtében kiváltott AIF transzlokáció mérséklése által. Számos tanulmány igazolta azt, hogy a farmakológiai PARP-gátlás stressz szituációkban az Akt-1 aktiváción keresztül stabilizálja az OMM-et [225]. Az MKP-1 expresszió fokozásán keresztül pedig annak permeabilizációját is csökkenti, hiszen csökkenti a MAPK család sejthalált előmozdító tagjainak (JNK és p38 MAPK) aktivitását [155].

A mitokondrium egy dinamikus sejtorganellum, mely a mitokondriális minőségkontroll folyamata során a hasadás útján kis egységekké hasad szét, illetve a fúzió során nagy mitokondriumokat, illetve mitokondriális hálózatokat képez [117, 120, 307].

SHR állatok szívizomsejtjeinek mitokondriumaiban jelentős változásokat találtunk a mitokondriumok méretében, egy masszív eltolódás volt ugyanis észlelhető a fragmentált fenotípus irányába (25. és 26. ábra). A fokozott fragmentáció jelensége a nyomásterhelésnek és a következményes krónikus oxidatív stressznek köszönhető és részben természetes védő hatása is van, hiszen a sejt ezáltal szabadul meg a károsodott mitokondriumoktól, melyek fokozott ROS termelés következtében tovább tudnák károsítani a többi mitokondriumot és végső soron a sejtet [307, 312]. Ugyanakkor a károsodott mitokondriumok előtt is többféle út állhat, van ugyanis esély a transzmembrán potenciál és az életképesség helyreállítására és végül a fúzió folyamatával újra képes kapcsolódni a retikuláris mitokondrium hálózathoz. Ha azonban a transzmembrán

potenciál összeomlik, az az OPA1 proteolitikus hasításához vezet, mely akadályát képezi az újbóli kapcsolódást a normális mitokondriumok hálózatával. Ekkor ezek a nem életképes organellek a mitofágia folyamata során eliminálódnak [312-315]. Azon megfigyelésünk, miszerint az OPA1 szint jelentősen csökken a hipertrófiás szívizomzatban (27. ábra) azt mutatja, hogy krónikusan stresszelt (pl. hipertenzív) állatmodellünkben egyértelmű mitokondrium károsodás jelei észlelhetők, mely egybevághat más tanulmányok eredményével is, ahol szívelégtelenség/CMP modellekben is csökkent volt a fúziós fehérjék mennyisége [313, 315]. Krónikus PARP-gátló kezelés (L-2286) jelentősen mérsékelte a fragmentáció mértékét, csökkent ugyanis a mitokondrium töredékek száma, megnőtt a mitokondriumok átlagos mérete, és a méretbeli eloszlásuk közelített a normálishoz, a normotenzív állatokban észlelthez. Ugyanakkor a fúziós fehérje, az OPA-1 szintjében csak egy enyhe, nem szignifikáns emelkedés volt látható a kezelt SHR-C állatokhoz képest. Így feltehetően egy más mechanizmus felelős azért, hogy a kezelt állatokban (SHR-L) normális méretűek maradtak a mitokondriumok és a belső membrán krisztáinak szerkezete is megőrzött maradt. Például a DRP1 excesszív transzlokációja a mitokondrium felszínére szintén kiválthatja a kriszták remodellingjét Ca^{2+} dependens módon, egy egyelőre ismeretlen mechanizmus által. A DRP1 transzlokáció fő hatása emellett a fokozott mitokondriális fragmentáció előmozdítása (25. és 27. ábra).

Könnyen belátható, hogy a mitokondriális minőségkontroll folyamatának (fisszió, fúzió, mitofágia) radikális befolyásolása ugyan akut stressz (IR) során előnyös lehet, krónikus gátlás esetén azonban a károsodott mitokondriumoknak, a károsodott mtDNS-nek a felszaporodásához, ezáltal pedig csökkent ATP és fokozott ROS termelődéshez vezet [313, 316]. Krónikus modellekben a mitokondrium állapotának direkt védelme, a ROS indukálta másodlagos ROS termelődés gátlása és az OMM stabilizálása lehet az az út, amely célravezető és biztonságos lehet. Ezáltal is elérhető a fisszió és a fúzió fiziológiai egyensúlyának a fenntartása [94]. Véleményünk szerint elsősorban ez állhat az L-2286 azon hatásának a hátterében, hogy csökkentette az IFM mitokondriumok fragmentációját.

Ugyanakkor a PARP enzim direkt hatással is lehet a fissziót szabályozó DRP1 aktivitására. A DRP1 GTP-áz aktivitása és mitokondriális transzlokációja, mely SHR állatokban fokozódott, számos poszttranszlációs módosítás hatására változhat. Az AMP-dependens protein kináz/PKA útvonal konstitutív módon foszforilálja a DRP1 GTP-áz effektor doménjében, a szerin 637 pozícióban, mely az enzim funkcióját blokkolja. A

calcineurin azonban ezzel ellentétes hatást fejt ki, defoszforilálja a DRP1-et az S637-on, felszabadítva azt a gátlás alól. Ez is egy lehetséges mechanizmus lehet a hipertrófia során észlelt fokozott fragmentáció hátterében [317, 318].

Emellett a sejt metabolizmus és a mitokondriális morfológia kölcsönösen szabályozza egymást különféle stressz (hypoxia, éhezés, glukóz terhelés) során. A differenciált szívizomsejtek elsősorban zsírsav oxidációval nyerik az energiát, a megtermelt ATP 70-80%-a így képződik, a többi cukor, laktát és keton testek égetésével. Iszkémia során (pl. a remodelling/szívelégtelenség során a miokardium elégtelen vaszkularizáltsága következtében) a glukóz égetése kerül előtérbe, mivel így magasabb lesz az egységnyi oxigén elfogyasztásával termelt ATP mennyisége [319, 320].

A mitokondriumok metabolikus inflexibilitása is jelentős tényező lehet a remodelálódott szívnek manifeszt szívelégtelenségbe való progressziójában. PARP-1 jelentős aktiválódása során a NAD^+ mennyisége, elérhetősége a sejtben jelentősen lecsökken. Ezáltal stresszelt miokardiumban a sirtuinok funkciója károsodik, mivel ezek működéséhez szintén NAD^+ -ra van szükség [321, 322]. A SIRT1 funkció gátlása a $\text{PGC1}\alpha$ -n keresztül a mitokondriális homeosztázisra, így a biogenezis folyamatára, a szubsztrát flexibilitásra és egyéb metabolikus aktivitására így a mitokondriális ROS detoxifikálására is hatással van [323, 324]. Farmakológiai PARP-1 enzim gátlás ezeket a kedvezőtlen változásokat is eliminálhatja a stresszelt szövetekben, mely szintén szerepet játszhat a metabolikus jólét és a struktúrális integritás fenntartásában a kezelt SHR állatokban (SHR-L).

6.6. Rezveratrol hatása a posztinfarktusos remodelling és szívelégtelenség kialakulására

Korábbi vizsgálatok szerint a rezveratrol előkezelés csökkenti az izoproterenol-indukálta szívinfarktus és a kötőszövetes átépülés mértékét patkányokban [325]. Emellett munkacsoportunk egy korábbi munkájában az alkoholmentes vörösbor kivonat pozitív hatását igazolta posztinfarktusos szívelégtelenség modellben [326]. Jelen vizsgálatunkban a rezveratrol hatását vizsgáltuk a szív struktúrális és funkcionális átépülésére, valamint az oxidatív stresszre és a jelátviteli faktorokra izoproterenol által indukált posztinfarktusos szívelégtelenség modellben. ISO-kezelt állatokban a balkamrai falvastagságok, üregméretek jelentősen emelkedtek a kontroll állatokhoz képest, a szisztolés balkamra funkció (EF) pedig csökkent az ISO kezelés után. Ennek megfelelően a szívelégtelenséget jelző biomarker, a plazma BNP szint is magasabb volt a posztinfarktusos állatokban (41. ábra). Ezen eredményeink egyeznek a korábban publikált adatainkkal [64]. Rezveratrol kezelés azonban megőrizte a szisztolés balkamra funkciót és csökkentette a szívelégtelenség súlyosságát (14. táblázat).

Az echocardiographiás és gravimetriás paraméterek által jelzett kardiális remodelling háttérben jelentős kollagén lerakódás volt látható a szövettani vizsgálat során (43.A ábra). A károsodott szívizomzat helyét hegszövet vette át. Ennek a folyamatnak van ugyan pozitív vonatkozása is, mivel stabilizálhatja a kamrafalat, azonban a negatív következmények között szerepelnek a diasztolés és szisztolés funkció romlása mellett a kamrai ritmuszavarok is. Vizsgálatunkban a rezveratrol kezelés mellett a fibrózis mértéke jelentősen kisebb volt, mint a kezeletlen posztinfarktusos állatok esetén (43.A ábra).

Az irodalmi adatok egyértelműen arra utalnak, hogy a ROS központi szerepet játszik a szívelégtelenség kialakulásában [327]. Ezzel egyező módon fokozott nitro tirozin (NT) festődést észleltünk a posztinfarktusos állatokban, melyet rezveratrol kezelés jelentősen csökkentett (43.B ábra). Ez a jelenség arra utalhat, hogy rezveratrol kezelés csökkenti a miokardiális ROS termelődését. A rezveratrolnak ezt az antioxidáns hatását többféle szívelégtelenség modellben vizsgálták már, például hipertenzív [328], nyomásterhelés [329, 330], miokarditisz [331], vagy kemoterápia-indukálta [332, 333] illetve genetikai szívelégtelenség modellekben [334].

A nagy mennyiségű ROS képződés a különféle intracelluláris jelátviteli útvonalak modulálásával indítja el a kardiális remodelling folyamatát, apoptózist és nekrozist okozva

[335]. Jelen vizsgálatunkban a rezveratrolnak az ERK1/2, a p38-MAPK, valamint az Akt-1 és GSK-3 β jelátviteli faktorokra gyakorolt hatását vizsgáltuk, melyek a fenti folyamatokban fontos szerepet játszanak [336-338]. Az Akt aktiváció gátolja a szívizomsejtek apoptózist és a sejteket a túlélés irányába tereli iszkémia során [339]. Prosurvival hatását a Bcl-2 család fehérjéinek és a GSK-3 β -nak a foszforilációja révén fejezi ki [340]. Az Akt-1 a fiziológias (adaptív) remodelling kulcsmolekulája és fontos szerepe van a patológiás remodelling kialakulásának megakadályozásában is [336]. Vizsgálatunkban az Akt-1 és a GSK-3 β foszforilációja minden kezelt csoportban emelkedett a kezeletlenekhez képest és az ISO + RES csoportban volt a legmagasabb (44. ábra). Rezveratrol tovább emeli tehát ezen prosurvival faktorok ISO-indukálta emelkedését. Xi és mtsai igazolták, hogy iszkémia-reperfüzió során a rezveratrol kardioprotektív hatása hátterében GSK-3 β foszforilációnak fontos szerepe van [341].

A MAP kinázoknak a sejttúlélésre gyakorolt hatásával kapcsolatban az irodalomban ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre [124, 336, 337, 342-345]. A különféle extra- és intracelluláris stressz szignálok foszforilálják és aktiválják a MAP kinázokat [338]. A rezveratrol hatását izolált szívizomsejteken vizsgálva Becatti és mtsai azt találták, hogy rezveratrol a SIRT1 aktiválásán keresztül csökkenti a p38-MAPK aktivitását és védik a sejteket az oxidatív károsodástól [346]. Gao és mtsai állatmodellben igazolták, hogy rezveratrol csökkenti a diabetesz-indukálta kardiális diszfunkciót az AT1R-ERK/p38 MAPK jelátviteli úton keresztül [347]. Jelen munkánkban azt találtuk, hogy a p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} és az ERK1/2^{Thr183-Tyr185} foszforiláció (és aktivitás) megemelkedett az ISO-kezelt csoportokban és rezveratrol kezelés jelentősen csökkentette aktivitásukat (45. ábra). Ezen változások hátterében felmerül a MAPK foszfatáz-1 (MKP-1) mennyiségének modulálása is, mely a MAP kinázok aktivitásának fő regulátora [338, 345, 348]. Vizsgálatunkban ezzel egyező módon az MKP-1 mennyiségének az emelkedése volt látható a rezveratrol kezelt csoportokban (45. ábra).

A COX-1-el ellentétben a COX-2 fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, az atheroszklerózis és a tumor képződés során [349-352]. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a COX-2 upregulációt a p38-MAPK és az ERK1/2 aktiválódása váltja ki [352]. A tartós COX-2 aktiváció aztán a szívizomsejtek halálához, a szívfunctió csökkenéséhez és szívelégtelenséghez vezet. A rezveratrol hatását a COX-2 aktivitásra még nem vizsgálták korábban. Jelen vizsgálatunk során azonban posztinfarktusos szívelégtelenség modellben azt igazoltuk, hogy a rezveratrol kezelés csökkenti az ISO-indukálta COX-2 aktivációt (46. ábra). Korábbi in vivo és humán vizsgálatok azt igazolták, hogy szívelégtelenségben

megemelkedik az iNOS expressziója [353]. Az iNOS miokardiális overexpressziója egérben fokozza a peroxinitrit termelődést [354-357], amelynek a mennyisége a mi eredményünk szerint is jelentősen megemelkedett izoproterenol kezelés hatására. A magas NT szint pedig circulus vitiosusként tovább növelheti az iNOS mennyiségét [358] (43.B ábra). Ezáltal az iNOS a COX-2-höz hasonlóan fontos szerepet tölt be a posztinfarktusos szívelégtelenég kialakulásában [359]. Az iNOS expresszió – hasonlóan a COX-2 expressziójához – szintén szintén szoros korrelációt mutat a MAP kinázok foszforilációjával [360-362]. Vizsgálatunkban az ISO-indukálta fokozott iNOS expressziót a rezveratrol kezelés (46. ábra) csökkentette, mely szintén szerepet játszhatott a remodellinget mérséklő hatás kialakulásában.

6.7. A rezveratrol hatása posztinfarktusos stabil koronária betegek szívfunkciójára és laborparamétereire

Tanulmányunkban 40 posztinfarktusos betegnél vizsgáltuk a rezveratrol lehetséges kardioprotektív hatását. Korábbi kísérletekben a rezveratrol kedvezően befolyásolta a vazorelaxációs válaszokat, a vérlemezke aggregációt és a szérum lipid paramétereket. A csökkent vazorelaxációs válasz, mely már az ateroszklerózis korai stádiumában is megfigyelhető, a károsodott endotél funkciónak tulajdonítható. Az endotél diszfunkció a későbbiekben manifeszt kardiovaszkuláris betegségek (ISZB, ACS) kialakulását okozza [363]. Számos tanulmány igazolta a rezveratrol kedvező hatását az endotél funkcióra [12, 13, 16, 17, 364], azonban ezek a megfigyelések állatmodellekben, in vitro humán ereken [12], vagy pedig a rezveratrol egyszeri bevétele alapján történtek. Vizsgálatunkban az endotél funkcióját a flow-mediálta vazodilatáció (FMD) módszerével jellemeztük, mely szignifikáns mértékű javulást mutatott a 3 hónapos rezveratrol kezelést követően (47. ábra). Korábbi kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy az FMD javulása az NO termelődés fokozódásán keresztül jön létre [12, 13, 363].

A hemoreológiai paraméterek szerepe az ateroszklerózis kialakulásában jól ismertek [138, 363]. Korábbi kísérletek során in vitro modellekben már bizonyították a rezveratrol

vérlemezke aggregáció gátló hatását, mely az aggregációt gátló prosztaglandinok termelődésének fokozásával [365] magyarázható. Ezen kívül kimutatták, hogy gátolja az I-es típusú kollagén mRNS-ének expresszióját és koncentrációfüggő módon csökkenti a kollagén indukálta vérlemezke aggregációt [366]. Betegeink nagy része (80%) a vizsgálat során aspirin terápiában részesült (15. táblázat). A 3 hónapos vizsgálati periódus alatt a placebo csoportban észlelt fokozott trombocita aggregáció a kifejlődő aspirin rezisztencia kialakulásával magyarázható, mely vizsgálatunk szerint nagymértékben csökkenthető volt rezveratrol kezeléssel (16. táblázat). Mindezek alapján a rezveratrolnak szerepe lehet az aspirin rezisztencia megelőzésében [367].

A vörösvértest deformabilitásnak fontos szerepe van a koronária mikrocirkulációban, hiszen a kapillárisok átlagos átmérője kisebb a vörösvértestek átmérőjénél, tehát a csökkent vörösvértest deformabilitás ronthatja a koronária keringést [367]. A placebo csoportban a vörösvértest deformabilitás csökkenését észleltük, mely deformabilitas csökkenés a rezveratrol kezelt csoportban nem jelentkezett (16. táblázat).

Az emelkedett szérum LDL-koleszterin szint károsítja az endotél sejteket és központi szerepet játszik az ateroszklerózis kialakulásában is [368]. Az irodalmi adatok nem egyértelműek a rezveratrol lipid csökkentő hatását tekintve [11, 369]. Tanulmányunkban a rezveratrol csökkentette az LDL-koleszterin szintet, valamint nem szignifikáns mértékben az összkoleszterin szintet is, de más lipid paraméterekre nem volt hatással (16. táblázat).

Számos állatmodellben kimutatták, hogy a rezveratrolnak direkt védő hatása van a kardiomiocitákra [11, 370]. Echocardiographiás vizsgálataink során a rezveratrol kezelt csoportban a bal kamra szisztolés funkció lényegében nem változott, a bal kamra diasztolés funkciójában azonban szignifikáns javulást észleltünk (48. ábra). Utóbbi összefüggésben állhat a rezveratrol állatkísérletek során észlelt intersticiális fibrózist gátló hatásával.

7. KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A PARP-1 enzim gátló L-2286 molekula sejt kultúrás, izolált szervperfúziós és in vivo szívinfarktus modellekben egyaránt hatékonyan mérsékelte az oxidatív sejt károsodás (doxorubicin, illetve IR) fokát és csökkentette a nekrosis mértékét már alacsony, 1-10 μ M koncentrációtartományban is.

2. A PARP-1 enzim farmakológiai gátlásával késleltethető volt a legfontosabb etiológiai faktorok (posztinfarktusos, hipertenzív, toxikus) által indukált szívelégtelenség kialakulása. Kezelés hatására megtartott maradt a szív struktúrája, a szisztolés, valamint diasztolés funkció, nem emelkedett a szívelégtelenséget jelző biomarker - a BNP - szintje és a kezeletlen állatokhoz képest lényegesen jobb volt a PARP-gátlóval kezelt állatok túlélése.

3. A hipertónia okozta szervkárosodások kialakulásának korai stádiumában is protektív hatású volt a PARP-gátlás. Jelentősen mérsékelte ugyanis az L-2286 kezelés a hipertenzív szívbetegség és a vaszkuláris remodelling kialakulását, valamint a központi idegrendszeri károsodások mértékét annak ellenére, hogy az SHR állatok vérnyomását nem csökkentette.

4. Az L-2286 védő hatása egyenértékűnek, illetve bizonyos paraméterek (pl. szisztolés balkamra funkció, túlélés) tekintetében előnyösebbnek bizonyult, mint egyes széles körben alkalmazott komparátor molekuláké (pl. ACE-gátló).

5. A PARP-gátlásnak a kardiovaszkuláris rendszerben kialakuló sejtvesztéssel, fibrózissal és funkciócsökkenéssel járó patológiás remodellinggel szembeni protektív hatása jelen vizsgálataink szerint az ortodox hatáson (NAD^+ tartalom prezervációja) kívül számos intracelluláris folyamat befolyásolásának lehetett a következménye.

- a. Az L-2286 PARP-gátló hatásának köszönhetően csökkenti az oxidatív sejtkárosodás mértékét jelző paramétereket a másodlagos, ROS-indukálta ROS termelődés gátlásán keresztül.
- b. A szív és az érfali átépülés mérséklése háttérében az érfali kollagén lerakódás, illetve a szívizomzatban az intersticiális fibrózis fokának csökkentése volt a legszembetűnőbb változás az L-2286 kezelt állatokban.
- c. PARP-gátló kezelés csökkenti a szívizomzatban, illetve az érfalban a legtöbb PKC izoforma (PKC α , PKC β , PKC δ , PKC λ , PKC ξ) aktivitását, illetve az MKP-1 enzim fokozott expresszióján keresztül gátolja a MAP kinázok aktivitását. Ezen változások döntő fontosságúak a maladaptív hipertrófia és a szívelégtelenség kialakulásának kivédésében.
- d. L-2286 kezelés emellett fokozza a legfontosabb prosurvival jelátviteli faktorok és útvonalak aktivitását (PI3K/Akt-1/GSK-3 β , PKC ϵ). A következményes mitokondriális védő hatás és antiapoptotikus hatás javítja a stresszhatásnak kitett sejtek életkilátásait. Ennek az egyes szervek (szív, nagyerek, agy) szintjén a struktúra és a funkció javulása, míg az egyén szintjén a túlélés javulása a következménye.
- e. Farmakológiai PARP-gátlás hatására megnőtt a hősokk fehérjék (Hsp72 és Hsp90) mennyisége, melynek következtében mérséklődik az oxidatív sejtkárosodás által kiváltott fehérjekárosodások mértéke.
- f. A PARP-gátlás csökkenti a sejtet érő stressz hatására létrejövő mitokondrium fragmentáció mértékét a Drp-1 mitokondriális felhalmozódásán keresztül. Ennek hatására a mitokondriumok méretének eloszlása és a mitokondrium ultrastruktúrája a fiziológiához hasonló marad. Következésképpen javul a mitokondriumok funkciója, a légzési lánc fehérjéinek aktivitása, illetve gátlódik az apoptózis.

6. A PARP enzim gátlása eredményeink alapján tehát egy ígéretes terápiás lehetőség lehet a szívelégtelenség megelőzésében és kezelésében. Emellett a hipertenzív szervkárosodások kivédésében is szerepet kaphat főleg azon betegekben, akiknél a

célvérnyomás elérésére valamilyen okból (panaszok, az antihipertenzív gyógyszerek mellékhatásai, stb.) miatt nehézségekbe ütközik.

7. A természetes polifenol rezveratrol mérsékli a posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulását kisállat modellben. Csökkenti a balkamra hipertrófia mértékét és javítja a balkamra funkciót. Ennek hátterében az oxidatív stressz és a kollagén lerakódás mérséklődése észlelhető, valamint a remodellingben szerepet játszó szignalizációs faktorok kedvező befolyásolása igazolható.

8. Rezveratrol posztinfarktusos koronária betegekben az alkalmazott gyógyszeres szekunder prevenciós kezelés mellett további kardioprotektív hatással rendelkezik: javítja a balkamrai diasztolés funkciót, az endotél funkciót, csökkenti az LDL-koleszterin szintet és védő hatást biztosít a posztinfarktusos betegekben észlelt kedvezőtlen hemoreológiai változásokkal szemben.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol.* 2012; 21: 365–371.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016; 37(27): 2129–2200.
3. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275: 1557-1562.
4. Higgins AY, O'Halloran TD, Chang JD. Chemotherapy-induced cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2015; 20(6): 721-30.
5. Simon G. Pearse, Martin R. Cowie. Heart failure: classification and pathophysiology. *Medicine.* 2014; 42 (10): 556-561.
6. Task Force Members, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2013; 34(38): 2949-3003.
7. Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol.* 2013; 168(2): 934-45.
8. Wilson PW. An epidemiologic perspective of systemic hypertension, ischemic heart disease, and heart failure. *Am J Cardiol.* 1997; 80(9B): 3J-8J.
9. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 2016; 37(29): 2315-81.
10. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992; 339: 1523-6.
11. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5: 493-506.

12. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int J Cardiol.* 2005; 105: 209-15.
13. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 106: 1652-8.
14. Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta.* 1996; 246: 163-82.
15. Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007; 6: 168-73.
16. Silan C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31: 897—902.
17. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P et al. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005; 12: 596-600.
18. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2013; 34: 2159-2219.
19. Haider AW, Larson MG, Franklin SS, Levy D. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure as predictors of risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med.* 2003; 138: 10-16.
20. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology* 2014; 11: 507–515.
21. Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2011; 123: 327-334.
22. Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, Murohara T. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens Res* 2005; 28: 601-609.
23. Alpert NR, Mulieri LA. Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the

- rabbit. A characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles. *Circ Res.* 1982; 50: 491–500.
24. Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Knauer S, Strauer BE. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation.* 1993; 88: 993–1003.
 25. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990; 322: 1561–1566.
 26. Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35: 580–586.
 27. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, Meverden RA, Roger VL. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA* 2006; 296: 2209-2216.
 28. Lee RM, Dickhout JG, Sandow SL. Vascular structural and functional changes: their association with causality in hypertension: models, remodeling and relevance. *Hypertens Res.* 2017; 40(4): 311-323.
 29. Hardigan T, Yasir A, Abdelsaid M, Coucha M, El-Shaffey S, Li W, Johnson MH, Ergul A. Linagliptin treatment improves cerebrovascular function and remodeling and restores reduced cerebral perfusion in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016; 311(3): R466-77.
 30. Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM. The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 304: H1598-614.
 31. Gutiérrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elízaga J, Lerman A, Fernández-Avilés F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2013; 34(41): 3175-81.
 32. Fox KA, Clayton TC, Damman P, Pocock SJ, de Winter RJ, Tijssen JG, Lagerqvist B, Wallentin L; FIR Collaboration. Long-term outcome of a routine versus selective invasive strategy in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome a meta-analysis of individual patient data. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(22): 2435-45.
 33. Kaithoju S. Ischemic Stroke: Risk Stratification, Warfarin Treatment and Outcome Measure. *J Atr Fibrillation.* 2015; 8(4): 1144. doi: 10.4022/jafib.1144. eCollection 2015.

34. Deedwania PC. Blood pressure control in diabetes mellitus: is lower always better, and how low should it go? *Circulation*. 2011; 123: 2776-2778.
35. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2017 Nov 13. pii: HYP.0000000000000066. doi: 10.1161/HYP.0000000000000066. [Epub ahead of print]
36. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995; 41: 1819-28.
37. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142: 231-55.
38. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, Muscari A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press*. 2008; 17: 70–77.
39. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1995; 6(3-4): 205-28.
40. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003; 91: 7A–11A.
41. Moreira PI, Honda K, Liu Q, Santos MS, Oliveira CR, Aliev G, et al. Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr Alzheimer Res*. 2005; 2(4): 403-8.
42. Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkani MA. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006; 4(3): 215-27.
43. Marczin N, Bundy RE, Hoare GS, Yacoup M. Redox regulation following cardiac ischemia and reperfusion. *Coron Art Dis*. 2003; 14: 123-133.
44. Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol*. 2001; 36: 1503–18.
45. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007; 49: 241–248.

46. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*. 1991; 65: 245–248.
47. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1996; 148: 291–300.
48. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res*. 2000; 86: 152–157.
49. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Utsumi H, Nakamura R, et al. Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. *Cardiovasc Res*. 2001; 49: 103–109.
50. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999; 85: 357–363.
51. Sawyer DB, Colucci WS. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: “oxygen wastage” revisited. *Circ Res*. 2000; 86: 119–120.
52. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 181–189.
53. Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem*. 2003; 278: 12094–12100.
54. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 15565–15570.
55. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 2164–2171.
56. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation*. 2000; 101: 899–907.
57. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1201–1209.

58. Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, et al. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 2364–2370.
59. Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Ann Rev Cell Biol.* 1991; 7: 453–478.
60. Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 909–916.
61. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 2001; 88: 529–535.
62. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5: 731–740.
63. Baines CP, Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38: 47–62.
64. Palfi A, Toth A, Hanto K, Deres P, Szabados E, Szereday Z, et al. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3 β pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41: 149–159.
65. Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A. Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res.* 2009; 105: 1204–1212.
66. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; 23: 2369–80.
67. Chen CJ, Fu YC, Yu W, Wang W. SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430: 798–803.
68. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 310–321.
69. Marks AR. Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res.* 2000; 87(1): 8–11.

70. Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science*. 2011; 333: 1440–1445.
71. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001; 89: 201–210.
72. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res*. 1998; 82: 482–495.
73. Xu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: Still alive. *Can J Cardiol*. 2006; 22(11): 947–951.
74. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: Specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285: R277-97.
75. Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 243-53.
76. Shirakura T, Nomura J, Matsui C, Kobayashi T, Tamura M, Masuzaki H. Febuxostat, a novel xanthine oxidoreductase inhibitor, improves hypertension and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016; 389(8): 831-8.
77. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44: 248-52.
78. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: Role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19: 1245-54.
79. Kedziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, Kornatowski T, Motyl J, Szadujkis-Szadurski L, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 635-41.
80. Cracowski JL, Baguet JP, Ormezzano O, Bessard J, Stanke-Labesque F, Bessard G, Mallion JM. Lipid peroxidation is not increased in patients with untreated mild-to-moderate hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 286-8.

81. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 2004; 17: 852-60.
82. Jialal I, Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: Don't throw out the baby with the bath water. *Circulation* 2003; 107: 926-8.
83. Abrescia P, Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 159-71.
84. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003; 361: 2017-23.
85. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992; 70: 593-9.
86. Inoue N, Takeshita S, Gao D, et al. Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 155: 45-52.
87. Hui Ling Ko, Ee Chee Ren. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules.* 2012; 2(4): 524–548.
88. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 1999; 342: 249–268.
89. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol.* 2010; 53(3-4): 77-87.
90. Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(1): 12-9.
91. Posavec Marjanović M, Crawford K, Ahel I. PARP, transcription and chromatin modeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 63: 102-113.
92. Leung AKL. Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture. *JCB* 205(5) 613-619.
93. Aredia F, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochem Pharmacol.* 2014; 92(1): 157-63.
94. Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol.* 2001; 59(6): 1497-505.

95. Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Brace LE, Kassahun H, SenGupta T, Nilsen H, et al. Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction. *Cell*. 2014; 157(4): 882-896.
96. Xu A, Szczepanek K, Hu Y, Lesnefsky EJ, Chen Q. Cardioprotection by modulation of mitochondrial respiration during ischemia-reperfusion: role of apoptosis-inducing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 435(4): 627-33.
97. Bartha E, Solti I, Kereskai L, Lantos J, Plozer E, Magyar K, et al. PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: 501-510.
98. Deres L, Bartha E, Palfi A, Eros K, Riba A, Lantos J, et al. PARP-Inhibitor Treatment Prevents Hypertension Induced Cardiac Remodeling by Favorable Modulation of Heat Shock Proteins, Akt-1/GSK-3b and Several PKC Isoforms. *PLoS One* 2014; 9(7): e102148.
99. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. 1998; 17(9): 2596-606.
100. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem*. 1999; 274(15): 10595-602.
101. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015; 89(9): 1401-38.
102. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005; 115(8): 2108–2118.
103. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*. 2004; 10(3): 248–254.
104. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003; 92(8): 912–919.

105. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010; 128(1): 191–227.
106. Rengo G, Cannavo A, Liccardo D, Zincarelli C, de Lucia C, Pagano G, et al. Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of beta blocker therapy on cardiac function, angiogenesis and remodeling in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2013; 6(6): 1259–1267.
107. Xueqing Ba, Nisha Jain Garg. Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *Am J Pathol.* 2011; 178(3): 946–955.
108. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008; 80(1): 30–39.
109. Griffiths ER, Friehs I, Scherr E, Poutias D, McGowan FX, Del Nido PJ. Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139(6): 1609–1617.
110. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010; 88(1): 40–50.
111. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 2013; 19: 753–759.
112. Mughal W, Dhingra R, Kirshenbaum LA. Striking a balance: Autophagy, apoptosis, and necrosis in a normal and failing heart. *Curr Hypertens Rep.* 2012; 14: 540–547.
113. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science.* 2009; 324 (5923): 98–102.
114. Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41: 1884–1889.
115. Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, Dhalla NS. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2016; 21(2): 213–21.
116. Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, Dejean LM. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(4): 616–22.

117. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev.* 2009; 89: 799–845.
118. Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, Rojo M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 2005; 6: 853–859.
119. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1201: 34-9.
120. Ong SB, Hall AR, Hausenloy DJ. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(4): 400-14.
121. Kulcsar G, Kalai T, Osz E, P. Sar C, Jeko J, Sumegi B, Hideg K. Synthesis and study of new 4-quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Arkivoc.* 2003; 121-131.
122. Hideg K, Kálai T, Sümegi B. Quinazoline derivatives and their use for preparation of pharmaceutical compositions having PARP-Enzyme inhibitory effect. WO2004/096779, Hung Pat PO301173.
123. Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res.* 1994; 75(1): 105-13.
124. Pálfi A, Tóth A, Kulcsár G, Hantó K, Deres P, Bartha E, et al. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315(1): 273-82.
125. Lopez N, Varon, Diez J, Fortuno MA. Loss of myocardial LIF receptor in experimental heart failure reduces cardiotrophin-1 cytoprotection. A role for neurohormonal agonists? *Cardiovasc Res.* 2007; 75: 536–545.
126. Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, et al. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(8): 1756–8.
127. Jamieson MJ, Gonzales GM, Jackson TI, Koerth SM, Romano WF, Tan DX, et al. Evaluation of the IITC tail cuff blood pressure recorder in the rat against intraarterial pressure according to criteria for human devices. *Am J Hypertens.* 1997; 10(2): 209-16.

128. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004; 17(2): 161-7.
129. Yap SC, Nemes A, Meijboom FJ, Galema TW, Geleijnse ML, ten Cate FJ et al. Abnormal aortic elastic properties in adults with congenital valvular aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2008; 128(3): 336-41.
130. Huang A, Koller A. Endothelin and prostaglandin H₂ enhance arteriolar myogenic tone in hypertension. *Hypertension*. 1997; 30(5): 1210-5.
131. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001; 23(4): 291-9.
132. Vincze A, Mázló M, Seress L, Komoly S, Abrahám H. A correlative light and electron microscopic study of postnatal myelination in the murine corpus callosum. *Int J Dev Neurosci*. 2008; 26(6): 575-84.
133. Sharma A, Singh M. Effect of ethylisopropyl amiloride, a Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on cardioprotective effect of ischaemic and angiotensin preconditioning. *Mol Cell Biochem*. 2000; 214: 31-38.
134. Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU ed) 1974, 2nd English ed., 2: 574-579, Academic Press, London.
135. Forster G, Bernt E, Bergmeyer HU. Creatine kinase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU ed), 1974, 2nd English ed, 2: 784-793, Academic Press, London.
136. Serbinova E, Khwaja S, Reznick AZ, Packer L. Thiocctic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused Langendorff heart. *Free Radic Res Commun*. 1992; 17: 49-58.
137. Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tertbutyl-alpha-phenylnitrone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 674-678.
138. Marton Zs, Horvath B, Alexy T, Kesmarky G, Gyevnar Zs, Czopf L et al. Follow-up of hemorheological parameters and platelet aggregation in patients with acute coronary syndromes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003; 29: 81-94.
139. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340: 1111-5.
140. Chan L, Shaw AG, Busfield F, Haluska B, Barnett A, Kesting J et al. Carotid artery intimal medial thickness, brachial artery flow-mediated vasodilation and

- cardiovascular risk factors in diabetic and non-diabetic indigenous. *Atherosclerosis*. 2005; 180: 319-26.
141. Douglas PS, Khandheria B, Stainback RF, Weissman NJ, Brindis RG, Patel MR et al. ACCF/ASE/ACEP/ASNC/SCAI/SCCT/SCMR 2007 appropriateness criteria for transthoracic and transesophageal echocardiography: a report of the American College of Cardiology Foundation Quality Strategic Directions Committee Appropriateness Criteria Working Group, American Society of Echocardiography, American College of Emergency Physicians, American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, and the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance endorsed by the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(2): 187-204.
 142. Morimoto A, Nishikimi T, Yoshihara F, Horio T, Nagaya N, Matsuo H, et al. Ventricular adrenomedullin levels correlate with the extent of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension*. 1999; 33(5): 1146-52.
 143. Fang WJ, Wang CJ, He Y, Zhou YL, Peng XD, Liu SK. Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1 α deacetylation. *Acta Pharmacol Sin*. 2018; 39(1): 59-73.
 144. Goncalves GK, Caldeira de Oliveira TH, de Oliveira Belo N. Cardiac hypertrophy and brain natriuretic peptide levels in an ovariectomized rat model fed a high-fat diet. *Med Sci Monit Basic Res*. 2017; 23: 380-391.
 145. Wang J, Liu X, Sentex E, Takeda N, Dhalla NS. Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H2277-H2287.
 146. Wachtell K, Bella JN, Liebson PR, Gerds E, Dahlöf B, Aalto T, et al. Impact of different partition values on prevalences of left ventricular hypertrophy and concentric geometry in a large hypertensive population : the LIFE study. *Hypertension*. 2000; 35: 6-12.
 147. Hall ED, Detloff MR, Johnson K, Kupina NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004; 21(1): 9-20.
 148. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013; 2013: 808353.

149. Xu J, Shi GP. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(11):2106–19.
150. Harrison DG, Gongora MC, Guzik TJ, Widder J. Oxidative stress and hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2007; 1(1): 30–44.
151. Xie JJ, Yu X, Liao YH, Chen J, Yao R, Chen Y, et al. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition attenuates atherosclerotic plaque development in ApoE^{-/-} mice with hyperhomocysteinemia. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(5): 641-53.
152. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1147: 233–41.
153. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001; 107(1): 7-11.
154. Racz B, Hanto K, Tapodi A, Solti I, Kalman N, Jakus P, et al. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49: 1978-88.
155. Hocsak E, Szabo V, Kalman N, Antus C, Cseh A, Sumegi K, et al. PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. *Free Radic Biol Med*. 2017; 108: 770-784.
156. Manetsch M, Che W, Seidel P, Chen Y, Ammit AJ. MKP-1: a negative feedback effector that represses MAPK-mediated pro-inflammatory signaling pathways and cytokine secretion in human airway smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2012; 24(4): 907-13.
157. Zingarelli B, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Kong S, Aronow BJ. Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury. *Mol Med*. 2003; 9(5-8): 143-53.
158. Sabbatini M, Catalani A, Consoli C, Marletta N, Tomassoni D, Avola R. The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: an animal model of vascular dementia? *Mech Ageing Dev*. 2002; 123(5): 547–59.
159. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005; 50(4): 427-34.
160. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2013; 18(5): 607-22.

161. Gilad E, Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C. Protection by inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase against oxidant injury in cardiac myoblasts in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(9): 2585-97.
162. Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengellér Z, Salzman AL, Szabó C. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovasc Res.* 1997; 36(2): 205-15.
163. Docherty JC, Kuzio B, Silvester JA, Bowes J, Thiemermann C. An inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase activity reduces contractile dysfunction and preserves high energy phosphate levels during reperfusion of the ischaemic rat heart. *Br J Pharmacol.* 1999; 127(6): 1518-24.
164. Szabados E, Literati-Nagy P, Farkas B, Sumegi B. BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(8): 937-45.
165. Kovacs K, Toth A, Deres P, Kalai T, Hideg K, Sumegi B. Myocardial protection by selective poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Exp Clin Cardiol.* 2004; 9(1): 17-20.
166. Farkas B, Magyarlaki M, Csete B, Nemeth J, Rablóczy G, Bernath S, et al. Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(5): 921-32.
167. Veres B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, et al. Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(8): 1373-82.
168. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309–1312.
169. Varbiro G, Veres B, Gallyas F Jr, Sumegi B. Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(4): 548-58.
170. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, et al. Study Group on Diagnosis of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology. The EuroHeart Failure survey programme - a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J.* 2003; 24: 442-463.

171. Pacher P, Liaudet L, Mabley J, Komjati K, Szabo C. Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40: 1006-1016.
172. Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003; 24: 883-896.
173. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*. 2000; 135: 316-323.
174. Magubane M, Michel FS, Erlwanger KH, Norton GR, Woodiwiss AJ. Prevention of beta-adrenergic-induced adverse cardiac remodeling by gonadectomy in male but not female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017; 70(3): 202-209.
175. Patel P, Parikh M, Shah H, Gandhi T. Inhibition of RhoA/Rho kinase by ibuprofen exerts cardioprotective effect on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol*. 2016; 791: 91-98.
176. Sysa-Shah P, Sørensen LL, Abraham MR, Gabrielson KL. Electrocardiographic Characterization of Cardiac Hypertrophy in Mice that Overexpress the ErbB2 Receptor Tyrosine Kinase. *Comp Med*. 2015; 65(4): 295–307.
177. Boukens BJ, Rivaud MR, Rentschler S, Coronel R. Misinterpretation of the mouse ECG: ‘musing the waves of *Mus musculus*’. *J Physiol*. 2014; 592(Pt 21): 4613–4626.
178. Speerschneider T, Thomsen MB. Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013; 209(4): 262-71.
179. Ogawa Y, Itoh H, Nakao K. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide family. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; 22: 49-53.
180. Hystad ME, Klinge R, Spurkland A, Attramadal H, Hall C. Contrasting cardiac regional responses of A-type and B-type natriuretic peptide to experimental chronic heart failure. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 299-309.
181. Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem*. 2004; 50: 33-50.
182. Ito N, Ohishi M, Yamamoto K, Tatara Y, Shiota A, Hayashi N, et al. Renin Angiotensin inhibition reverses advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2007; 20: 792–799.

183. Meurrens K, Ruf S, Ross G, Schleef R, van Holt K, Schluter KD. Smoking accelerates the progression of hypertension-induced myocardial hypertrophy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2007; 76: 311–322.
184. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Circ. J.* 1963; 27: 282–93.
185. Sarkar O, Li Y, Anand-Srivastava MB. Nitric oxide attenuates overexpression of *Gia* proteins in vascular smooth muscle cells from SHR: Role of ROS and ROS-mediated signaling. *PLoS One.* 2017; 12(7): e0179301.
186. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79(10): 3310–4.
187. Nishio M, Sakata Y, Mano T, Ohtani T, Takeda Y, Miwa T, et al. Beneficial effects of bisoprolol on the survival of hypertensive diastolic heart failure model rats. *Eur J Heart Fail.* 2008; 5: 446–453.
188. Christiansen S, Autschbach R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006; 30: 611–616.
189. Szenczi O, Kemecsei P, Holthuijsen MF, van Riel NA, van der Vusse GJ, Pacher P, et al. Poly(ADP-ribose)polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69: 725–732.
190. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 318–328.
191. Zamorano JL, Lancellotti P, Muñoz DR, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016; 37 (36): 2768–2801.
192. Neilan TG, Jassal DS, Scully MF, Chen G, Deflandre C, McAllister H, et al. Iloprost attenuates doxorubicin induced cardiac injury in a murine model without compromising tumor suppression. *Eur Heart J.* 2006; 10: 1251–1256.
193. Deres P, Halmosi R, Toth A, Kovacs K, Palfi A, Habon T, et al. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45: 36–43.

194. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H1466–H1483.
195. Morrissey C. Echo for diastology. *Ann Card Anaesth*. 2016; 19(Supplement): S12-S18.
196. Salemi VM, Pires MD, Cestari IN, Cestari IA, Picard MH, Leirner AA, Mady C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artif Organs*. 2004; 28(4): 332-7.
197. Lakoumentas JA, Panou FK, Kotseroglou VK, Aggeli KI, Harbis PK. The Tei index of myocardial performance: applications in cardiology. *Hellenic J Cardiol*. 2005; 46(1): 52-8.
198. Multiple risk factor intervention trial research group. Multiple risk factor intervention trial, risk factor changes and mortality results. *JAMA*. 1997; 277: 582-594.
199. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352: 837-853.
200. Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res*. 2000; 41(6): 605-12.
201. Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev*. 2002; 7(1): 71-88.
202. Ali MH, Mungai PT, Schumacker PT. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2006; 291: L38-L45.
203. Ali MH, Schumacker PT. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit. Care Med*. 2002; 30: S198-S206.
204. Birukov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxid. Redox Signal*. 2009; 11: 1651-1667.

205. Dikalov SI, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 305(10): H1417-27.
206. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ. Res*. 2001; 89(5): 408-14.
207. Liu J, Ormsby A, Oja-Tebbe N, Pagano PJ. Gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor to the vascular adventitia attenuates medial smooth muscle hypertrophy. *Circ. Res*. 2004; 95: 587-594.
208. Morris CD, Carson S. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U. S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med*. 2003; 139(1): 56-70.
209. Pacher P, Mabley JG, Soriano FG, Liaudet L, Szabó C. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to the endothelial dysfunction associated with hypertension and aging. *Int J Mol Med*. 2002; 9: 659-664.
210. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115(4): 459-67.
211. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol*. 2005; 90(4): 449-55.
212. Csiszar A, Pacher P, Kaley G, Ungvari Z. Role of oxidative and nitrosative stress, longevity genes and poly(ADP-ribose) polymerase in cardiovascular dysfunction associated with aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005; 3: 285-291.
213. McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004; 63: 283-292.
214. Amenta F, Tomassoni D. Treatment with nicardipine protects brain in an animal model of hypertension-induced damage. *Clin Exp Hypertens*. 2004; 26(4): 351-61.
215. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med*. 1987; 316(23): 1429-35.

216. SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1991; 325(5): 293-302.
217. Yang Z, Yu X, Cheng L, Miao LY, Li HX, Han LH, Jiang WP. Effects of enalapril on the expression of cardiac angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 in spontaneously hypertensive rats. *Arch Cardiovasc Dis*. 2013; 106(4): 196-201.
218. Zhang BQ, Wang G, Zhang JP, Hu JY, Xiao R, Lei ZY, et al. Protective effects of enalapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, on multiple organ damage following scald injury in rats. *Biotechnol Appl Biochem*. 2012; 59(4): 307-13.
219. Lee KM, Kang HA, Ko CB, Oh EH, Park M, Lee HY, et al. Differential gene expression profiles in spontaneously hypertensive rats induced by administration of enalapril and nifedipine. *Int J Mol Med*. 2013; 31(1): 179-87.
220. Cagalinec M, Kyselovic J, Blaskova E, Bacharova L, Chorvat D Jr, Chorvatova A. Comparative study of the effects of lacidipine and enalapril on the left ventricular cardiomyocyte remodeling in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(4): 561-70.
221. Langer SW. Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects. *Cancer Manag Res*. 2014; 6: 357-63.
222. Monti E, Cova D, Guido E, Morelli R, Oliva C. Protective effect of the nitroxide tempol against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21(4): 463-70.
223. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*. 2007; 7(2): 160-4.
224. Dong M, Vongchampa V, Gingipalli L, Cloutier JF, Kow YW, O'Connor T, Dedon PC. Development of enzymatic probes of oxidative and nitrosative DNA damage caused by reactive nitrogen species. *Mutat Res*. 2006; 594(1-2): 120-34.
225. Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, Bogнар Z, Wittmann I, Gallyas F Jr, et al. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-

- ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35757-35775.
226. Molnár A, Tóth A, Bagi Zs, Papp Z, Édes I, Vaszily M, et al. Activation of the poly(ADP-ribose)polymerase pathway in human heart failure. *Mol Med.* 2006; 12: 143-152.
227. Zhou HZ, Swanson RA, Simonis U, Ma X, Cecchini G, Gray MO. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain complex I function in reperfused mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(2): H714-23.
228. Elks CM, Mariappan N, Haque M, Guggilam A, Majid DS, Francis J. Chronic NF- κ B blockade reduces cytosolic and mitochondrial oxidative stress and attenuates renal injury and hypertension in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 296(2): F298-305.
229. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α . *Proc Natl Acad Sci. USA* 2006; 103: 10086–10091.
230. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 12: 771–785.
231. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 12: 786–801.
232. Hang P, Zhao J, Sun L, Li M, Han Y, Du Z, Li Y. Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(4): 685-696.
233. Steinberg SF. Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda).* 2012; 27(3): 130-9.
234. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999; 99: 384–391.

235. Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest.* 1997; 99: 55–61.
236. Kang MY, Zhang Y, Matkovich SJ, Diwan A, Chishti AH, Dorn GW. Receptor-independent cardiac protein kinase C α activation by calpain-mediated truncation of regulatory domains. *Circ Res.* 2010; 107: 903–912.
237. Takeishi Y, Jalili T, Ball NA, Walsh RA. Responses of cardiac protein kinase C isoforms to distinct pathological stimuli are differentially regulated. *Circ Res.* 1999; 85: 264–271.
238. Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL, Kitazawa T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol.* 2001; 535(Pt 2): 553–64.
239. Alden KJ, Goldspink PH, Ruch SW, Buttrick PM, Garcia J. Enhancement of L-type Ca²⁺ current from neonatal mouse ventricular myocytes by constitutively active PKC- β II. *Am J Physiol.* 2002; 282: C768–C774.
240. Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Gennan D, Fishman GI, Buttrick PM. Expression of protein kinase C- β in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2189–2195.
241. Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick DM, Li Z, Wakasaki H, Kranias EG, et al. In vivo phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase C β II decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts. *J Clin Invest.* 1998; 102: 72–78.
242. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, et al. Targeted overexpression of protein kinase C β II isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 9320–9325.
243. Connelly KA, Kelly DJ, Zhang Y, Prior DL, Advani A, Cox AJ, et al. Inhibition of protein kinase C- β by ruboxistaurin preserves cardiac function and reduces extracellular matrix production in diabetic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2009; 2: 129–137.

244. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, et al. Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C β 2 activation and diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 2709–2718.
245. Kanashiro CA, Khalil RA. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25(12): 974–85.
246. Churchill EN, Szweda LI. Translocation of δ PKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 439: 194–199.
247. Guo J, Cong L, Rybin VO, Gertsberg Z, Steinberg SF. Protein kinase C- δ regulates the subcellular localization of Shc in H₂O₂-treated cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 299: C770– C778.
248. Guo J, Sabri A, Elouardighi H, Rybin V, Steinberg SF. Alpha1-adrenergic receptors activate AKT via a Pyk2/PDK-1 pathway that is tonically inhibited by novel protein kinase C isoforms in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2006; 99: 1367–1375.
249. Heidkamp MC, Bayer AL, Martin JL, Samarel AM. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Apoptosis by Protein Kinase C ϵ and δ in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. *Circ Res*. 2001; 89: 882–890.
250. Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, et al. Inhibition of δ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*. 2003; 108: 2304–2307.
251. Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI, Mochly-Rosen D. Protein kinase C δ activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem*. 2004; 279: 47985–47991.
252. Porter MJ, Heidkamp MC, Scully BT, Patel N, Martin JL, Samarel AM. Isoenzyme-selective regulation of SERCA2 gene expression by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 2003; 285: C39–C47.
253. Liou YM, Morgan KG. Redistribution of protein kinase C isoforms in association with vascular hypertrophy of rat aorta. *Am J Physiol* 1994; 267: C980–9.

254. Gray MO, Zhou HZ, Schafhalter-Zoppoth I, Zhu P, Mochly-Rosen D, Messing RO. Preservation of base-line hemodynamic function and loss of inducible cardioprotection in adult mice lacking protein kinase C- ϵ . *J Biol Chem*. 2004; 279: 3596–3604.
255. Klein G, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Oppermann D, Shukla P, Quint A, et al. Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKC ϵ . *Circ Res*. 2005; 96: 748–755.
256. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008; 321: 1493–1495.
257. Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes ϵ protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 12798–12803.
258. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res*. 1997; 81: 404–414.
259. See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44: 1679–1689.
260. Tsujimoto I, Hikoso S, Yamaguchi O, Kashiwase K, Nakai A, Takeda T, et al. The antioxidant Edaravone attenuates pressure overload induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2005; 45: 921–926.
261. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003; 425: 577–584.
262. Lakos G, Takagawa S, Chen SJ, Ferreira AM, Han G, Masuda K, et al. Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. *Am J Pathol*. 2004; 165: 203–217.

263. Zhan M, Kanwar YS. Hierarchy of molecules in TGF-beta1 signaling relevant to myofibroblast activation and renal fibrosis. *Am J Physiol. Ren Physiol.* 2014; 307: F385-F387.
264. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011; 29: 196–202.
265. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 2002; 21: 3749–3759.
266. Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, Nichols B, Shiwen X, Black CM, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB J.* 2002; 16: 1949–1951.
267. Vayalil PK, Iles KE, Choi J, Yi AK, Postlethwait EM, Liu RM. Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 293: L1281–L1292.
268. Samarakoon R, Chitnis SS, Higgins SP, Higgins CE, Krepinsky JC, Higgins PJ. Redox-induced Src kinase and caveolin-1 signaling in TGF- β 1-initiated SMAD2/3 activation and PAI-1 expression. *PloS One.* 2011; 6: e22896.
269. Liu RM, Choi J, Wu JH, Gaston Pravia KA, Lewis KM, Brand JD. et al. Oxidative modification of nuclear mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is involved in transforming growth factor beta1-induced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2010; 285: 16239–16247.
270. Lardot C, Heusterpreute M, Mertens P, Philippe M, Lison D. Expression of plasminogen activator inhibitors type-1 and type-2 in the mouse lung after administration of crystalline silica. *Eur Respir J.* 1998; 11: 912–921.
271. Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res.* 1995; 77: 493–504.
272. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, et al. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2010; 65: 334–340.

273. Chang W, Wei K, Jacobs SS, Upadhyay D, Weill D, Rosen GD. SPARC suppresses apoptosis of idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts through constitutive activation of beta-catenin. *J Biol Chem*. 2010; 285: 8196–8206.
274. Guo B, Inoki K, Isono M, Mori H, Kanasaki K, Sugimoto T, et al. MAPK/AP-1-dependent regulation of PAI-1 gene expression by TGF- β in rat mesangial cells. *Kidney Int*. 2005; 68: 972–984.
275. Yang C, Patel K, Harding P, Sorokin A, Glass WF. Regulation of TGF- β 1/MAPK-mediated PAI-1 gene expression by the actin cytoskeleton in human mesangial cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313: 1240–1250.
276. Magyar K, Deres L, Eros K, Bruszt K, Seress L, Hamar J, et al. A quinazoline-derivative compound with PARP inhibitory effect suppresses hypertension-induced vascular alterations in spontaneously hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(7): 935-944.
277. Ching-Yu Huang, Tse-Hua Tan. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci*. 2012; 2: 24. doi: 10.1186/2045-3701-2-24
278. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circ Res*. 2016; 119(1): 91-112.
279. Bai P, Virag L. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Lett*. 2012; 586: 3771-7.
280. Walsh SK, English FA, Crocker IP, Johns EJ, Kenny LC. Contribution of PARP to endothelial dysfunction and hypertension in a rat model of pre-eclampsia. *Br J Pharmacol*. 2012; 166: 2109-16.
281. Zerfaoui M, Errami Y, Naura AS, Suzuki Y, Kim H, Ju J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NF-kappa B upon TLR4 stimulation. *J Immunol*. 2010; 185: 1894-902.
282. Bunda S, Wang Y, Mitts TF, Liu P, Arab S, Arabkhari M, Hinek A. Aldosterone stimulates elastogenesis in cardiac fibroblasts via mineralocorticoid receptor-independent action involving the consecutive activation of Galpha13, c-Src, the

- insulin-like growth factor-I receptor, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem.* 2009; 284(24): 16633-47.
283. Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, et al. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22896–901.
 284. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 2006; 20: 3347–65.
 285. Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(6): H2836-46.
 286. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 1992; 72: 369–417.
 287. Gavin JB, Maxwell L, Edgar SG. Microvascular involvement in cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30: 2531–40.
 288. De Boer RA, Pinto YM, Van Veldhuisen DJ. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities. *Microcirculation.* 2003; 10: 113–26.
 289. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 2001; 15: 2203–2208.
 290. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38349–38352.
 291. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 47(1): 32-40.
 292. Yamamoto Y, Hoshino Y, Ito T, Nariai T, Mohri T, Obana M, et al. Atrogin-1 ubiquitin ligase is upregulated by doxorubicin via p38-MAP kinase in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2008; 79: 89–96.

293. Burgering BMT, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 689–701.
294. Iyer AK, Azad N, Talbot S, Stehlik C, Lu B, Wang L, Rojanasakul Y. Antioxidant c-FLIP inhibits Fas ligand-induced NF-kappaB activation in a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent manner. *J Immunol.* 2011; 187(6): 3256-66.
295. Guo J, Jie W, Shen Z, Li M, Lan Y, Kong Y, et al. SCF increases cardiac stem cell migration through PI3K/AKT and MMP-2/-9 signaling. *Int J Mol Med.* 2014; 34(1): 112-8.
296. Soti Cs, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 769–780.
297. Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil.* 2016; 12(4): 255-9.
298. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1998; 83(2): 117-32.
299. Antonova G, Lichtenbeld H, Xia T, Chatterjee A, Dimitropoulou C, Catravas JD. Functional significance of hsp90 complexes with NOS and sGC in endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007; 37(1-2): 19-35.
300. Jiang B, Xiao W, Shi Y, Liu M, Xiao X. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperons.* 2005; 10: 252–262.
301. Shinohara T, Takahashi N, Kohno H, Yamanaka K, Ooie T, Wakisaka O, et al. Mitochondria are targets for geranylgeranylacetone-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H1892–H1899.
302. Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, et al. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circ Res.* 2008; 103: 1270–1279.

303. Gabrielson K, Bedja D, Pin S, Tsao A, Gama L, Yuan B, Muratore N. Heat shock protein 90 and ErbB2 in the cardiac response to doxorubicin injury. *Cancer Res.* 2007; 67(4): 1436-41.
304. Zingarelli B, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR, Kong S, Aronow BJ. Differential regulation of activator protein-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury: role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(4): H1408-15.
305. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 functions down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res.* 2003; 63: 2139–2144.
306. Taniguchi Y, Ooie T, Takahashi N, Shinohara T, Nakagawa M, Yonemochi H, et al. Pioglitazone but not glibenclamide improves cardiac expression of heat shock protein 72 and tolerance against ischemia/reperfusion injury in the heredity insulin-resistant rat. *Diabetes.* 2006; 55(8): 2371-8.
307. Stetler RA, Leak RK, Gao Y, Chen J. The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33(1): 22–32.
308. Berger NA, Berger SJ. Metabolic consequences of DNA damage: the role of poly(ADP-ribose) polymerase as mediator of the suicide response. *Basic Life Sci.* 1986; 38: 357-63.
309. Douglas DL, Baines CP. PARP1-mediated necrosis is dependent on parallel JNK and Ca(2+)(+)/calpain pathways. *J Cell Sci.* 2014; 127: 4134-45.
310. Rubattu S, Pagliaro B, Pierelli G, Santolamazza C, Castro SD, Mennuni S, Volpe M. Pathogenesis of target organ damage in hypertension: role of mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2014; 16: 823-39.
311. Rossi MN, Carbone M, Mostocotto C, Mancone C, Tripodi M, Maione R, Amati P. Mitochondrial localization of PARP-1 requires interaction with mitofilin and is involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. *J Biol Chem.* 2009; 284: 31616-24.

312. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005; 8(1): 3-5.
313. Dorn GW, Kitsis RN. The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circ Res.* 2015; 116: 167-82.
314. Ong SB, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res.* 2012; 94: 190-6.
315. Ong SB, Kalkhoran SB, Hernández-Reséndiz S, Samangouei P, Ong SG, Hausenloy DJ. Mitochondrial-Shaping Proteins in Cardiac Health and Disease - the Long and the Short of It! *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017; 31: 87-107.
316. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008; 27: 433-46.
317. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , calcineurin, and NF-AT. *Cell.* 1999; 96: 611-4.
318. Santel A, Frank S. Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the fission protein DRP1. *IUBMB Life* 2008; 60: 448-55.
319. Riehle C, Abel ED. PGC-1 proteins and heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2012; 22(4): 98-105.
320. Dorn GW. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009; 81: 465-73.
321. Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012; 26: 417-32.
322. Luna A, Aladjem M, Kohn KW. SIRT1/PARP1 crosstalk: connecting DNA damage and metabolism. *Genome Integr.* 2013; 4: 6. doi: 10.1186/2041-9414-4-6.
323. Pirinen E, Canto C, Jo YS, Morato L, Zhang H, Menzies KJ, et al. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2014; 19: 1034-41.

324. Canto C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol.* 2009; 20: 98-105.
325. Chakraborty S, Pujani M, Haque SE. Combinational effect of resveratrol and atorvastatin on isoproterenol induced cardiac hypertrophy in rats. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015; 7: 233–238.
326. Palfi A, Bartha E, Czopf L, Mark L, Gallyas F Jr, Veres B et al. Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C α/β II. *J Nutr Biochem.* 2009; 20(6): 418–425.
327. Okonko DO, Shah AM. Heart failure: mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. *Nature Reviews Cardiology.* 2014; 12: 6–8.
328. Thandapilly SJ, Wojciechowski P, Behbahani J, Louis XL, Yu L, Juric D et al. Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *Am J Hypertens.* 2010; 23(2): 192–196.
329. Gupta PK, DiPette DJ, Supowit SC. Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Sci Nutr.* 2014; 2(3): 218–229.
330. Wojciechowski P, Juric D, Louis XL, Thandapilly SJ, Yu L, Taylor C, Netticadan T. Resveratrol arrests and regresses the development of pressure overload but not volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Nutr.* 2010; 140(5): 962–968.
331. Yoshida Y, Shioi T, Izumi T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ J.* 2007; 71(3): 397–404.
332. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(2): E243–E253.
333. Danz ED, Skramsted J, Henry N, Bennett JA, Keller RS. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(12): 1589–1597.
334. Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem.* 2010; 285(11): 8375–8382.
335. Park ES, Kang DH, Kang JC, Jang YC, Lee MJ, Chung HJ et al. Cardioprotective effect of KR-33889, a novel PARP inhibitor, against oxidative stress induced

- apoptosis in H9c2 cells and isolated rat hearts. *Arch Pharm Res.* 2017; 40(5): 640–654.
336. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(8): 589–600.
 337. Bogнар E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS One.* 2013; 8(6): article e65355.
 338. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *BBA Molecular Cell Research.* 2007; 1773(8): 1227–37.
 339. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation.* 2001; 104(3): 330–5.
 340. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J Bioenerg Biomembr.* 2009; 41(2): 169–180.
 341. Xi J, Wang H, Mueller RA, Norfleet EA, Xu Z. Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *European Journal of Pharmacology,* 2009; 604(1–3): 111–6.
 342. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995; 270(5240): 1326–31.
 343. Palfi A, Toth A, Kulcsar G, Hanto K, Deres P, Bartha E et al. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315(1): 273–82.
 344. Veres B, Radnai B, Gallyas F, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Sumegi B. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310(1): 247–255.
 345. Racз B, Hanto K, Tapodi A, Solti I, Kalman N, Jakus P, et al. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP1 activation. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(12): 1978–88.

346. Becatti M, Taddei N, Cecchi C, Nassi N, Nassi PA, Fiorillo C. SIRT1 modulates MAPK pathways in ischemic reperfused cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69(13): 2245-60.
347. Gao Y, Kang L, Li C, Wang X, Sun C, Li Q et al. Resveratrol ameliorates diabetes induced cardiac dysfunction through AT1R-ERK/p38 MAPK signaling pathway. *Cardiovasc Toxicol.* 2016; 16(2): 130–137.
348. Andrews CS, Matsuyama S, Lee BC, Li JD. Resveratrol suppresses NTHi-induced inflammation via upregulation of the negative regulator MyD88 short. *Sci Rep.* 2016; 6: article 34445.
349. Cipollone F, Fazia ML. COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(Suppl. 1): S26–S36.
350. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4(2): 116–123.
351. Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cellular Cardiol.* 2005; 39(3): 443–452.
352. Bujold K, Rhainds D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H. CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR γ activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res.* 2009; 83(3): 457–464.
353. Vejlsstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S et al., Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 30, no. 6, pp. 1215–1223, 1998.
354. Starling RC. Inducible nitric oxide synthase in severe human heart failure: impact of mechanical unloading. *JACC.* 2005; 45: 1425–1427.
355. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(13): 6954–6958.
356. Kumar A, Chen SH, Kadiiska MB, Hong JS, Zielonka J, Kalyanaraman B, Mason RP. Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic Biol Med.* 2014; 73: 51–59.
357. Cotton JM, Kearney MT, Shah AM. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart.* 2002; 88: 564–566.

358. Cooke CL, Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF- κ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282(2): C395–C402.
359. Lamon BD, Upmacis RK, Deeb RS, Koyuncu H, Hajjar DP. Inducible nitric oxide synthase gene deletion exaggerates MAPK-mediated cyclooxygenase-2 induction by inflammatory stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(3): H613–H623.
360. Xia Q, Hu Q, Wang H, Yang H, Gao F, Ren H et al. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis*. 2015; 6(3):e1702.
361. Chae HS, Kang OH, Lee YS, Choi JG, Oh YC, Jang HJ et al. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and inflammatory mediator expression by paeonol through the MAPKs inactivation in RAW 264.7 cells. *Am J Chin Med*. 2009; 37(1): 181–194.
362. Liou CJ, Len WB, Wu SJ, Lin CF, Wu XL, Huang WC. Casticin inhibits COX-2 and iNOS expression via suppression of NF- κ B and MAPK signaling in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2014; 158: 310–316.
363. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic Impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000; 101: 1899-906.
364. Cruz MN, Luksha M, Logman H, Poston L, Agewall S, Kublickiene K. Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H1969–75.
365. Wu CC, Wu CI, Wang WY, Wu YC. Low concentrations of resveratrol potentiate the antiplatelet effect of prostaglandins. *Planta Med*. 2007; 73: 439-44.
366. Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Med*. 2002; 9: 77-9.
367. Stef Gy, Csiszár A, Bocsa Z, Kenneth L, Ungvári Z, Endersz F, Veress G. Rezveratrol hatásának vizsgálata a trombocita aggregációra aszpirinnel kezelt betegeknél, *Cardiologica Hungarica*. 2010; 40: 99-103.
368. Simchon S, Jan KM, Chien S. Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow. *Am J Physiol*. 1987; 253(4 Pt 2): H898-903.

369. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 100: 1050-5.
370. Wang Z, Zou J, Cao KH, Hsieh TC, Huang Y, Wu JM. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med*. 2005; 16: 553-640.
371. Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, Meszaros JG. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol*. 2005; 288: H1131-8.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom szüleimnek, akik mindig hittek bennem, sok lemondással támogattak tanulmányaim során és köszönöm nekik a rendkívül bizakodó életszemléletüket. Köszönöm gimnáziumi biológia tanárom, Dr. Rékási József emberségét, következetességét és elhivatott biológia-szeretetét, melyekkel fokozatosan az orvosi pálya felé fordította érdeklődésemet.

Köszönöm TDK témavezetőmnek, Dr. Czopf Lászlónak a figyelmét, a precizításra történő nevelő szándékát. Az ő segítségével kezdődött meg kutatói pályafutásom, ő irányította figyelmemet a kísérletes kardiológia, illetve a szabad gyökös kutatások felé. A szabad gyökös folyamatok és azok befolyásolási lehetőségeinek mélyreható megismeréséért azonban már Prof. Dr. Hideg Kálmánnak† kell köszönetet mondanom. Az ő tanácsukat megfogadva csatlakoztam PhD hallgatóként Prof. Dr. Tóth Kámán „Kísérletes kardiológia” című PhD programjához.

Köszönöm Prof. Dr. Tóth Kálmánnak azt, hogy mindvégig irányította és támogatta kutatásaimat. Bátorított mindig, minden nehézség közepette. Köszönöm neki az „atyai szeretetét”. Lehetővé tette, hogy a legmodernebb biokémiai, sejtbiológiai módszerekkel felszerelt Biokémiai Intézettel kooperációban folytathattam kutatásaimat. A Biokémiai Intézet (ma Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) vezetőjének Prof. Dr. Sümegi Baláznak szeretném megköszönni rendkívüli kedvességét, türelmét, amellyel a biokémiai gondolkodásmódra megtanított. Ő terelte érdeklődésemet a direkt antioxidánsok felől a PARP rendszer vizsgálata irányába. Tóth Kálmán Professzor Úrral együtt ő tette le az alapjait a jelenleg már az SZKK-ban működő Kísérletes Kardiológiai Kutatólaboratóriumnak is.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben dolgozó kollégáknak a tudományos munkámhoz nyújtott segítségét: Prof. Dr. Gallyas Ferencnek, Dr. Berente Zoltánnak, Dr. Ósz Erzsébetnek†. Hálás vagyok Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak és Halász Helénának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségért.

Köszönetet mondok munkatársaimnak, korábbi és jelenlegi PhD hallgatóimnak, akik mellettem álltak és állnak a tudományos, gyógyító és oktató munkában, akik nélkül a

kutatómunkám töredéke sem tudott volna megvalósulni: Dr. Habon Tamásnak, Dr. Czopf Lászlónak, Dr. Szabados Eszternek, Dr. Márton Zsoltnak, Dr. Pálfi Anitának, Dr. Bartha Évának, Dr. Magyar Klárának, Dr. Deres Lászlónak, Dr. Erős Krisztiánnak, Dr. Riba Ádámnak, Dr. Gál Rolandnak, Rónaky Anikónak és Völgyiné Dózsa Tímeának.

Megköszönöm feleségem támogató türelmét, szeretetét és folyamatos áldozathozatalát, amit a nagyrészt munkaidőn kívül végzett kutatómunka rótt rá. Köszönöm végül gyermekeim szeretetét, ami értelmet ad mindannak, amit teszek.