

Investigation of oxidative stress on vascular and cardiac damage in animal model and humans

PhD Thesis

Zsolt Sárszegi M.D.

Doctoral School leader:Sámuel Komoly M.D., Ph.D., DSC

Programme leader:.....Erzsébet Róth M.D. Ph.D., DSC

Supervisor:.....Balázs Sümegi Ph.D., DSC

Attila Cziráki M.D., Ph.D.



University of Pécs, Medical Faculty
Heart Institute, Department of Cardiology
Doctoral School of Medical Sciences

Pécs
2012

1. Introduction

Cardiovascular disease constitutes a major and increasing health burden in developed countries. Although treatments have progressed, the development of novel treatments for patients with cardiovascular diseases remains a major research goal. Among the cardiovascular risk factors arterial stiffness and endothelial dysfunction are believed to be most important. On the other hand the most common pathophysiologic causes of heart disease are ischemic-reperfusion injury and direct toxic effect leading to apoptosis or necrosis of cardiomyocytes. Among others the oxidative stress plays a key role in all of these different pathophysiological processes. Understanding the physiological and pathophysiological roles of reactive oxygen species and oxidative stress may help to investigate potential protective drugs decreasing the cardiovascular morbidity and mortality.

1.1 Oxidative stress and myocardial damage

Oxidative stress is among major apoptotic stimuli in ischemic heart disease. During ischemia the respiratory cytochromes become redox-reduced, allowing them to directly transfer electrons to oxygen. Reactive oxygen species (ROS) are therefore excessively generated from a likely mitochondria source and then precipitate DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and other direct cellular injuries, consequently launching apoptosis in cells.

ROS are highly reactive oxygen moieties that arise from electrons from the mitochondrial respiratory chain or through the activity of intracellular oxidases, including NADPH oxidase (NOX) and xanthine oxidase. A number of antioxidants are in charge to remove excessive ROS and to maintain a physiological redox balance ((Halliwell et al 1985). Various remodelling stimuli (e.g., neurohormones, growth factors, and cytokines) that are released in response to cardiac injury enhance ROS production by activating ROS-generating enzymes and/or decreasing the antioxidant defense capacities, which results in a net increase of ROS (oxidative stress) (Dhalla et al 1994, 1996, Hill et al 1996). Excessive ROS may directly induce cellular injury via oxidation of DNA, lipids, and proteins associated with cell death, different diseases and premature aging. ROS also participate in cell signaling through activation of redox-sensitive signaling cascades. Thereby, they initiate both protective (adaptive) and damaging (maladaptive) cellular events.

Role of signal mechanisms in cardiomyocytes' damage

ROS-associated proapoptotic effects

ROS can selectively trigger intracellular signaling cascades that are linked to programmed cell death. In brief, such signaling includes the ROS-dependent activation of apoptosis signalling kinase (ASK-1), p38, and c- Jun-N-terminal kinase (Ichijo et al 1997, Remondino et al 2003), which play a key role in stress-induced apoptosis in the heart (Yamaguchi et al 2003) and are responsible for the regulation of downstream targets such as the Bcl-2 family proteins, p53 and caspases (Matsuzawa et al 2005). Besides this activation of

proapoptotic signaling, ROS can directly trigger the mitochondrial death pathway in a process referred to as “ROS-induced ROS release,” which describes the ROS-induced oxidative burst that rises from the mitochondrial electron transport chain and is associated with the dissipation of the mitochondrial membrane potential, an event generally believed to be a point-of-no-return in cell death (Gustafsson 2008).

Nowadays we have many evidences that the JNK and p38 are double-edged swords. JNK has both protective and pathological roles in ROS-induced processes in cardiomyocytes. Through the use of a JNK-specific inhibitor JNK activity was shown to play a pivotal role in myocyte apoptosis after ischemia/reperfusion. In contrast, many other studies demonstrated a critical role for JNK in myocyte survival and cardioprotection. JNK is reported to interact with proapoptotic Bax and Bad on mitochondrial membrane. However, other prosurvival pathways, including Akt, also are targeted by JNK. Therefore, Kaiser et al reported enhanced myocyte survival after ischemia/reperfusion injury when JNK activity was genetically activated or inhibited in the heart. These seemingly contradictory and confusing results underscore the complexity of the JNK pathway in cell death regulation in the heart.

The p38 pathway is involved in the regulation of myocyte contractility and cell death. Activation of p38 leads to suppressed contractility without affecting intracellular calcium cycling. The negative inotropic effect of p38 activity appears to be an epigenomic phenomenon because it is both rapid and reversible. Indeed, secondary modification of sarcomere proteins is observed in p38-activated heart associated with reduced force generation in isolated myofilaments. It is highly controversial whether p38 pathway is cardiac protective or prodeath in the heart. In many studies, inhibiting p38 activity in cultured myocytes or intact heart decreased apoptotic cell death under stress stimulation such as pressure overload or ischemia/reperfusion. Inhibition of p38 is consistently observed to improve cardiac function and to reduce remodelling in the heart after ischemia/reperfusion injury or infarction. However, a report also showed that such beneficial effect was not observed in pigs, suggesting a certain degree of species specificity. On the other hand, specific activation of p38 in the heart is not sufficient to induce myocyte apoptosis. Lastly, cardiac-specific inactivation of p38 leads to enhanced apoptosis in response to pressure overload. Therefore, p38 activity can be both protective and detrimental to myocyte survival in a stressor-specific manner.

ROS-associated prosurvival signaling

Generally in parallel to the before mentioned proapoptotic signaling, ROS mediate the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathways. Both of these pathways have been involved in cell growth and survival in various cell types, including cardiomyocytes. Similar to other mitogen-activated protein kinase pathways, the MEK/ERK pathway can be activated by ROS of either exogenous or endogenous origin. The MEK/ERK pathway is also an important mediator of cell survival as previously described in other cell types as well as more recently in cardiomyocytes (Bueno 2000, Kwon 2003). The probably more classical mediator of cell survival is the PI3K/Akt pathway (Cantley 2002). Stimulation of different receptors in cardiomyocyte, included Gq-proteincoupled receptors, insulin- and

insulin-like growth factor 1-linked tyrosine kinase receptors, could activate Akt which is associated with cardioprotection. Activation of PI3K/Akt inhibits apoptosis in myocardial cells exposed to hypoxia in vitro and in rodent hearts after ischemia-reperfusion in vivo. Similar to the MEK/ERK pathway, Akt can be activated by ROS, and ROS-mediated Akt activation has been implicated in cell survival. Both necrosis and apoptosis are involved in cardiomyocyte death after ischemia/ reperfusion. Ischemia/reperfusion enhances activation of caspase-3, -8, -9 and translocation of Bax and Bcl-2 in the myocardium. Apoptotic process can convert to necrotic process when essential co-factors for apoptosis are lacking. ATP is one of such co-factors, and switching from apoptosis to necrosis by inhibition of mitochondrial ATP production, which has been shown in non-cardiac cells.

1.2 Oxidative stress and endothelial dysfunction

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is a naturally occurring L-arginine analogue derived from the proteolysis of proteins containing methylated arginine residues. It is synthesized when arginine residues in the nuclear proteins are methylated through the action of the protein arginine methyltransferases (PRMTs). ADMA is an inhibitor of NOS; SDMA is not. ADMA inhibits the three isoforms of NOS. It can also uncouple the enzyme, generate superoxides, and it interfaces with other targets in the cell. Numerous studies suggest that an elevated plasma level of ADMA is associated with endothelial dysfunction and is a risk factor for several human diseases, such as hyperhomocysteinemia, hypertension, coronary artery disease, peripheral arterial occlusive disease, pulmonary hypertension, and preeclampsia. It has previously demonstrated that ADMA concentration-dependently increased oxidative stress measured as superoxide production by cultured human endothelial cells. ADMA also activated the oxidant-responsive transcription factor NF—kappa B, resulting in enhanced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and endothelial adhesiveness for monocytes. MCP-1 and interleukin-8 (IL-8) are major chemokines for leukocyte trafficking and were found to be highly expressed in human atherosclerotic lesions. Recently it has been reported that cellular senescence, the limited ability of primary human cells to divide when cultured in vitro, is accelerated by increased oxidative stress, and it is reduced by NO donor treatment.

ADMA is known to upregulate several components of microvascular RAS, leading to increased production of angiotensin II, which then activates NADPH oxidase and increases ROS production (Veresh 2008). ADMA improves the p38 mitogen-activated protein kinase activity in human coronary artery endothelial cells, which may provide a link between ADMA and RAS, because ACE protein expression has been shown to be regulated by p38 mitogen-activated protein kinase.

ADMA regulates endothelial permeability and endothelial barrier function. Several possible mechanisms have been proposed to explain the effects of ADMA on endothelial barrier function. A previous study indicated that ADMA increased pulmonary endothelial permeability both in vitro and in vivo, and that this effect was mediated by nitric oxide, acting via protein kinase G and independent of ROS formation. Others have demonstrated that ADMA compromises the integrity of the glomerular filtration barrier by altering the bioavailability of nitric oxide and superoxide, and that nitric oxide (NO)- independent

activation of soluble guanylyl cyclase preserves the integrity of this barrier under conditions of NO depletion (Sharma 2009).

Vascular oxidative stress has been reported to mediate vascular remodelling. Either vascular remodelling or increased redistribution of collagen and elastin in vascular wall play an important role in pathophysiological processes. Connection between ROS and collagen synthesis is well defined. Ang II-induced procollagen- α 1 (I) expression was inhibited by $O_2^{\cdot-}$ scavengers and NADPH oxidase inhibitors. Moreover, Ang II-induced procollagen- α 1(I) levels were decreased in cells overexpressing SOD1. These findings have important implications for disease states associated with remodelling of the vasculature. Moreover, fibrillar collagen accumulation could conceivably contribute to vascular stiffness and changes in vascular compliance. The arterial stiffness closely related to functional changes of smooth muscle of arteries and deposition of collagen and elastin in large artery wall also. Vasoactive mediators can alter vessel diameter by up to 30% independent of changes of blood pressure and peripheral resistance. This fact proves the significant dynamic contribution of vascular smooth muscle to large artery stiffness.

Clinical assessment of arterial stiffness may be determined by analysis of pulse wave velocity and augmentation index. These parameters are derived from analysis of central and peripheral pressure waveform. Central arterial pressure waveforms essentially vary from peripheral pulse wave because changes in vessel stiffening throughout the vascular tree cause location-dependent changes in the pressure waveform. In addition, central arterial waveforms will be influenced by the reflective wave phenomenon as described by Nichols and O'Rourke (2005). The systolic waveform leaves the aortic root and passes to the periphery, where smaller arterioles provide multiple points of reflection. A resulting 'reflective' wave is generated and returns to central arteries (O'Rourke and Kelly 1993). In healthy individuals with healthy compliant arteries, the reflective wave will go back to the central vasculature in diastole and augment diastolic coronary arterial blood flow. The speed of the advancing wave is termed pulse wave velocity (PWV) (Lehmann et al 1998). With advancing age, a combination of increased reflective capacity at peripheral sites and faster PWV within stiffened vessels causes premature augmentation of the systolic waveform, forming a 'late systolic peak' on waveform analysis. This explains the differences between the brachial and aortic pressure waveforms, which may be as high as 20 mmHg (Pauca et al 1992). The central pressure waveform is important in view of determining left ventricular workload, which is relatively independent of the brachial pressure.

A technique involves the use of an applanation tonometer able to noninvasively record the peripheral pulse pressure wave and generate a corresponding central arterial waveform to record the radial pulse wave. Applanation tonometry causes partial flattening of the arterial wall and equilibration of intra-arterial circumferential pressure. The accuracy of arterial tonometry in recording peripheral waveforms has been described by previous investigators who evaluated waveforms derived from noninvasive tonometry and direct arterial puncture (Cohn et al 1995). The central arterial waveform can subsequently be derived from the peripheral waveform using a validated generalized transfer factor (Takazawa et al 1998). This is then expressed in terms of an Augmentation Index (AIx) which can be used to assess vascular stiffness. Pulse wave analysis has more recently been used as a noninvasive tool to assess endothelial function (Wilkinson, Hall, et al 2002).

The analysis of PWV uses a similar system that calculates pulse wave propagation velocity between two sites, commonly the carotid and femoral pulses, or carotid and radial (Oliver and Webb 2003), although brachial-ankle PWV has been assessed by some (Katayama et al 2004). Pulse wave velocity is inversely proportional to vessel stiffness and distensibility. In order to assess pulse transit time a correlation point is identified within the pressure waveform, which may be the foot of the pressure wave (using SphygmoCor system) or the point of maximal upstroke (using Complior system) (Millasseau et al 2005). Elevation of PWV leads to augmentation of the ascending aortic systolic waveform as previously outlined, resulting in higher left ventricular afterload and amplification of pulse pressure (Nichols 2005). Pulse wave analysis and PWV are both noninvasive simple techniques that can be used to assess vascular stiffness in research and clinical settings. Using PWA and PWV, vascular stiffness has been assessed and identified as an independent risk marker for cardiovascular mortality (Laurent et al 2001; Meaume et al 2001) and cerebrovascular events (Laurent and Boutouyrie 2005), and has a prognostic value equivalent to currently available biomarkers.

Myocardium- and endothel- protection with antioxidants

Several studies have reported beneficial effects of a therapy with antioxidant agents, including trace elements and other antioxidants, against the endothelial dysfunction, ischemia-reperfusion injury in heart or in cases of cardiotoxic agent induced myocardial damage. Antioxidants act through one of three mechanisms to prevent oxidant-induced cell damages. They can reduce the generation of ROS, scavenge ROS, or interfere with ROS-induced alterations. Modulating mitochondrial activity is an important possibility to control ROS production. Hence, using different drugs to reduce fatty acid oxidation and of trace elements such as zinc and selenium as antioxidants, and physical exercise to induce mitochondrial adaptation, contribute to the prevention of ROS-related cardiac and endothelial dysfunction. The paradigm that inhibiting the overproduction of superoxides and peroxides would prevent cardiac diseases has been difficult to verify using conventional antioxidants like vitamin E or catalytic antioxidants such as SOD/CAT mimetics. Although the beneficial effects of several antioxidant agents were varified in animal models, the favourable effects failed in some large multicenter randomised human trials. So this fact inspires to discover newer antioxidant agents treating oxidative stress effectively.

3. Aim of the study

The aim of our study was double: (i) to investigate the protective effect of new antioxidant and PARP-inhibitor nicotinic amidoxime derivate BGP-15 to imatinib-induced cardiotoxicity in animal model and (ii) to assess the beneficial effect of physical exercise on endothel function considering oxidative stress. In detail,

1. to identify the mechanism by which imatinib induces cardiotoxicity and to determine how BGP-15 can modulate these processes to perform its cytoprotective effects
2. to investigate how imatinib can compromise energy metabolism in Langendorff perfused rat heart, and can whether BGP-15 counteract these effects
3. to identify the possible role of JNK and p38 MAP kinase activation in the imatinib- induced cardiotoxicity, and suggests that BGP-15 by suppressing these MAP kinases and by the activation of PI-3-kinase Akt pathways can ameliorate imatinib-induced cardiotoxicity.
4. to investigate the effect of single bout maximal physical exercise on oxidative stress, asymmetric dimethylarginine, a competitive inhibitor of eNOS.
5. to evaluate the effect of physical exercise on arterial stiffness in well-trained swimmers and runners.

2. Experimental study

BGP-15, a PARP-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt-GSK-3beta pathway and suppressing JNK and p38 MAP kinase activation

2.1 Introduction

Imatinib-mesylate (Gleevec), a potent specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase, has been used successfully for the treatment of advanced-phase chronic myeloid leukemia (CML) (Deninger et al 2005, Cohen et al 2002, Czechowska et al 2005) Bcr-Abl is a constitutively active tyrosine kinase in leukemic cells and activates several signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K/Akt). BCR-ABL also activates pro-survival pathways in leukemic cells including Jak-STAT and Grb2-ERK signaling pathways (Van Etten 2004), which can lead to increased spontaneous and DNA damage-induced proliferation frequency.

Although the detection of imatinib related cardiotoxicity has been based largely on physical examination and medical history, the laboratory based evidence is still missing. A comprehensive study was published by Kerkela et al (2006), showing that imatinib treated patients developed chronic heart failure, which could be modelled on C57BL6 mice as well after prolonged administration of imatinib. The underlying mechanisms of cardiotoxicity involved the activation of endoplasmic reticulum (ER) stress response, the collapse of the mitochondrial membrane potential, the release of cytochrome c into the cytosol, a reduction

in cellular ATP content and cell death (Kerkela et al 2006). Further evidence of congestive heart failure development has been reported by another clinical study, which investigated the toxicity of imatinib in sixteen CML and GIST patients (Park 2006), and strengthened the presumption of cardiotoxicity (Orphanos 2009).

In vitro experiments revealed that at least two different pathways, one involving caspase activation and another one is PARP-1 enzyme mediated pathway, coexisted in imatinib induced apoptosis (Moehring 2005). The treatment of BaF3BA cells with a broad caspase inhibitor alone was not sufficient to completely block imatinib induced apoptosis, however, co-administration with PARP-inhibitor PJ34 resulted in an increased cytoprotection (Moehring 2005). Consequences of pathophysiological PARP-1 enzyme activation in cardiomyocytes have been well established (Szabó 2005, Pacher 2007). Over-activation of PARP-1 enzyme can induce rapid cellular NAD⁺ and ATP pool depletion leading to mitochondrial dysfunction and can suppress the activity of the PI-3-kinase-Akt pathway resulting in necrotic or apoptotic cell death. Mitochondrial dysfunction in turn can further impair energy metabolism and increase mitochondrial ROS production manifesting in lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. Earlier studies demonstrated the beneficial effect of BGP-15 on oxidative stress (Halmosi 2001, Szabados 2002). BGP-15 is a nicotinic amidoxime derivate which was originally developed against insulin resistance. BGP-15 is a potent insulin sensitizer (Literáti-Nagy B 2009). Data generated by our group showed that multitarget agent BGP-15 successfully inhibited the activation of PARP-1 enzyme and protected the mitochondria from oxidative damage under condition of ischemia-reperfusion on a Langendorff rat heart model (Halmosi 2001, Szabados 2002).

The aim of our study was to identify the mechanisms by which imatinib induces cardiotoxicity in a Langendorff perfused rat heart model and to determine how PARP inhibitor and antioxidant agent BGP-15 can modulate these processes. We investigated whether imatinib mesylate administration could lead to oxidative stress and alterations in cardiac energy metabolism and the ability of BGP-15 to counteract these effects. We studied the possible role of JNK and p38 MAP kinase activation in imatinib induced cardiotoxicity, and the potential beneficial effect of BGP-15 on these processes.

2.2 Materials and methods

Experimental animals

Male Wistar rats weighting 300g to 350g were used for this study. The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Heart perfusion

Retrograde aortic perfusion was maintained with a modified phosphate free- Krebs–Henseleit (KH) buffer. After a non-recirculating washout period of 10 min, hearts underwent 60 minute perfusion. Imatinib and/or BGP-15 were administered into the perfusion medium at the beginning of baseline perfusion. Heart perfusion models were distributed into 4 groups

with 10 perfused heart model in each group: 1. normoxic control group, 2. normoxic perfusion with BGP-15, 3. normoxic perfusion with imatinib and 4. normoxic perfusion with BGP-15 and imatinib. Hearts were freeze-clamped at the end of each perfusion.

NMR spectroscopy and data analysis

Cardiac energy metabolism was monitored *in situ* during the perfusion by ^{31}P NMR spectroscopy through quantification of creatine phosphate ($\delta=0.0$ ppm). NMR spectra were recorded with a Varian $^{\text{UNITY}}$ INOVA 400 WB instrument (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). ^{31}P measurements (161.90 MHz) of the perfused hearts were run at 37°C in a Z•SPEC 20 mm broadband probe (Nalorac Co., Martinez, CA, USA), applying WALTZ proton decoupling ($\gamma\text{B}_2 = 2$ kHz) during the acquisition only. Field homogeneity was adjusted following the ^1H signal ($w_{1/2} = 10\text{--}15$ Hz). Spectra were collected with a time resolution of 3 min by accumulating 120 transients in each FID. 45° flip angle pulses were employed after a 1.25 s recycle delay, and transients were acquired over a 10 kHz spectral width in 0.25 s, and the acquired data points (5000) were zero-filled to 16 K. Under the above mentioned circumstances the relative concentrations of the species can be taken proportional to the peak areas. Peak areas were determined by deconvolution of simulated spectra fitted to experimental spectra obtained after referencing ($\delta=0$ for creatine phosphate) and baseline correction using Vnmr 6.1C software (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Amounts of individual metabolite levels in each spectrum were expressed as their ratio to the first creatine phosphate (PCr) amount.

Lipid peroxidation

Determination of thiobarbituric acid reactive-substances (TBARs) in the heart was performed according to a modified method of Serbinova et al (1989).

Protein oxidation

Fifty milligrams of freeze-clamped perfused heart tissue were homogenized with 2 ml 10% trichloroacetic acid (TCA) The protein carbonyl content was determined by means of the 2,4-dinitrophenyl-hydrazine-method (Butterfield 1997).

Western blot analysis

Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking (2 h with 3% non-fat milk in Tris-buffered saline) membranes were probed overnight at 4°C with antibodies (1:1000 dilution) recognising the following antigens: GAPDH, pAkt, pGSK-3 β , pERK $_{1/2}$, pp38, pJNK and anti-PARP. Quantification of band intensities (E_{540}) of the blots was performed by a DU-62 spectrophotometer equipped with a densitometry attachment (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) and ImageJ (public

domain) software. Data representing three independent experiments are expressed as percentage of the untreated control (mean \pm S.E.M.).

2.3 Results

Under our experimental conditions creatine phosphate levels of untreated Langendorff perfused rat hearts showed a slight decrease during the 60-minute perfusion. Cardiac PCr levels were decreased by 18% compared to untreated hearts when 20 mg/l imatinib was added to the perfusate. Co-administration of imatinib and BGP-15 revealed that BGP-15 in a concentration of 200 mg/l was able to prevent the decrease of imatinib induced PCr levels. Administration of BGP-15 alone increased cardiac PCr levels over the normoxic values (Fig.1.). The change of ATP concentration followed a similar pattern to the change in creatine phosphate level in our investigated time period. Imatinib treated hearts showed significant decrease in ATP levels whereas co-administration with BGP-15 successfully prevented this effect. ATP levels in the presence of BGP-15 alone were not significantly different from untreated, control cases (Fig.2.). Inorganic phosphate showed moderate increase during the perfusion reaching 15-20% of the normoxic PCr level after 30 min (data not shown).

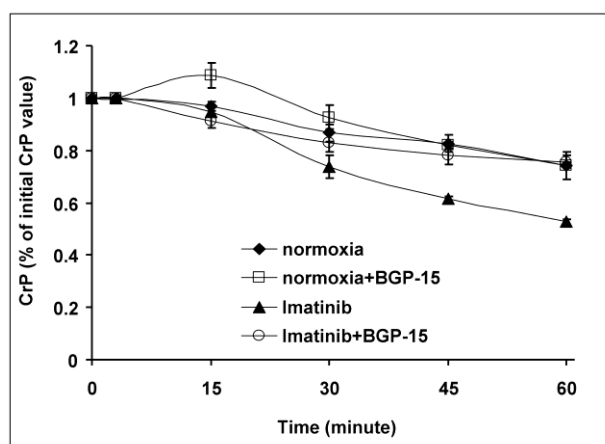


Fig.1. Effect of BGP-15 and/or Imatinib on cardiac creatine phosphate levels in Langendorff perfused rat hearts. Creatine phosphate amounts, determined by *in situ* ^{31}P NMR spectroscopy, are expressed as their ratio to initial creatine phosphate amount. Values are given as means \pm SEM. ($p < 0.01$)

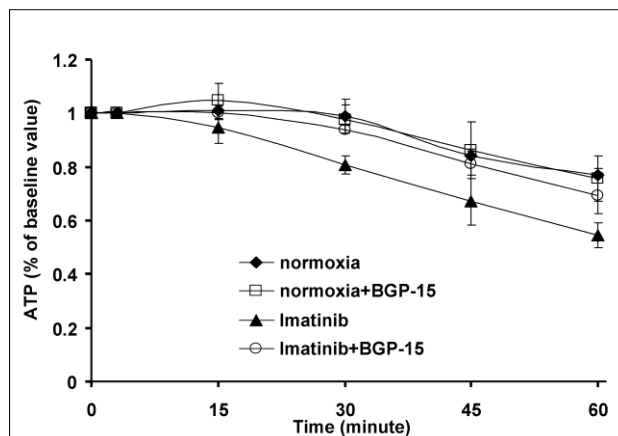


Fig.2. Effect of BGP-15 and/or Imatinib on cardiac ATP levels in Langendorff perfused rat hearts. ATP amounts, determined by *in situ* ^{31}P NMR spectroscopy, is expressed as their ratio to initial ATP amount. Values are given as means \pm SEM. ($p < 0.01$)

Determination of lipid peroxidation after one hour normoxic perfusion showed that administration of imatinib significantly ($p < 0.01$) increased thiobarbituric reactive substance (TBARS) formation compared to untreated hearts. On the other hand, when both imatinib and BGP-15 were present in the perfusate, the formation of TBARS was significantly diminished. BGP-15 alone did not alter TBARS formation (Fig.3.). In the case of protein oxidation we observed that presence of imatinib markedly elevated the level of protein-bound aldehyde groups as compared to untreated hearts. This phenomenon was significantly inhibited ($p < 0.01$) by the co-administration of imatinib and BGP-15. However, BGP-15 alone had no significant influence on the level of protein oxidation (Fig. 4).

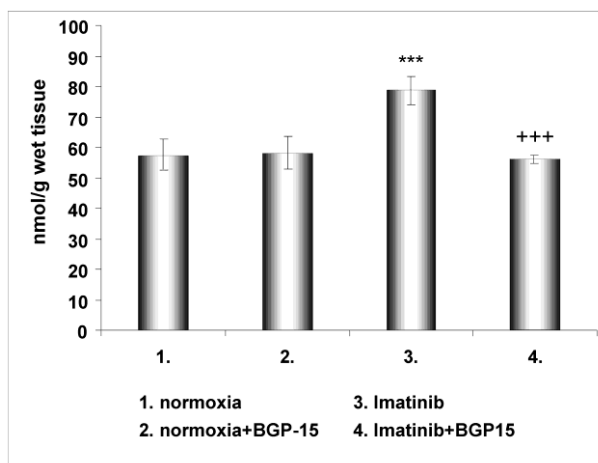


Fig.3. Effect of BGP-15 on imatinib induced lipid peroxidation in Langendorff perfused rat hearts. The figure demonstrates the quantity of thiobarbituric reactive substances in various animal groups. Values are given as means \pm SEM. (***) $p < 0.001$ compared to normoxic levels, (+++) $p < 0.001$ compared to imatinib treated levels).

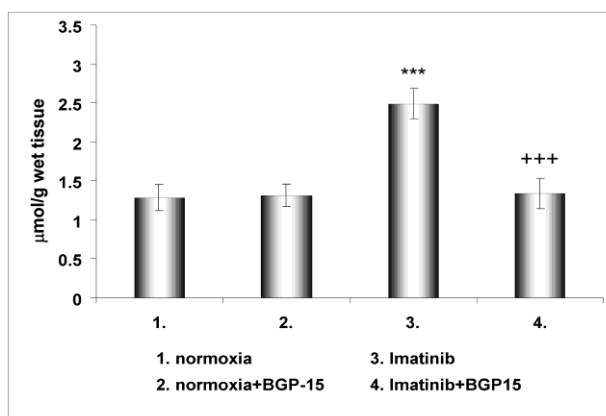
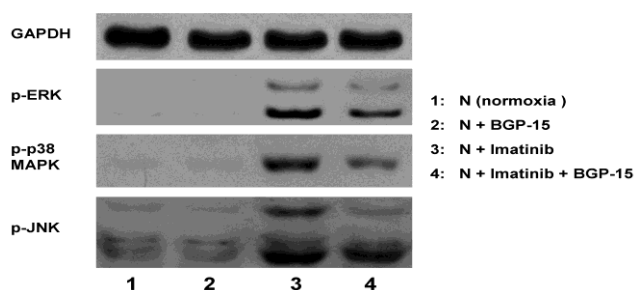


Fig.4. Effect of BGP-15 on imatinib induced protein oxidation in Langendorff perfused rat hearts. The figure demonstrates the protein carbonyl content in various groups. Values are given as means \pm SEM. (***) $p < 0.001$ compared to normoxic levels, (+++) $p < 0.001$ compared to imatinib treated levels).

Akt, GSK-3 β , ERK, JNK and p38-MAPK phosphorylation were examined by Western blot in the following samples: without treatment (normoxia) (1), treatment with BGP-15 (2), imatinib (3) and with imatinib+BGP-15 (4). Imatinib induced the activation of MAP kinases (ERK1/2, p38 and JNK). JNK and p38 MAP kinase contribute to cell death (Baines 2005), and inflammatory reactions (Gil 2007) therefore could play a significant role in the imatinib induced cardiotoxicity. BGP-15 in the presence of imatinib suppressed the activation of JNK and p38 MAP kinase, and this effect of BGP-15 could be significant in its protective role (Fig.5).

A.



B.

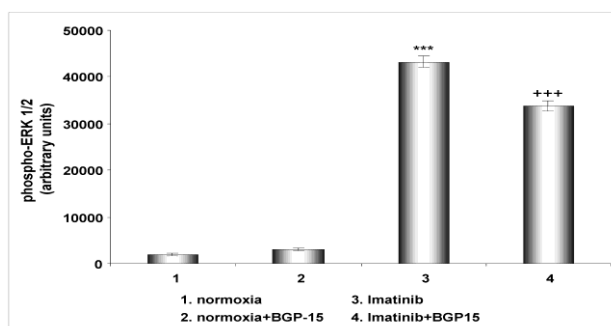
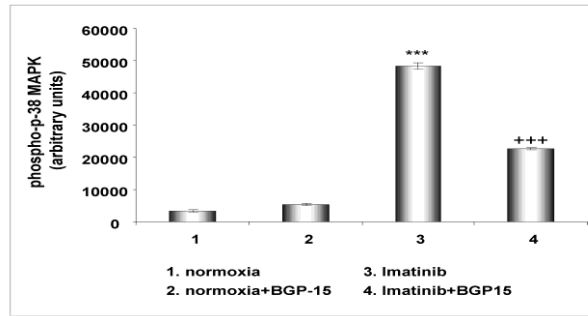


Fig.5. Phosphorylation of ERK, JNK and p38-MAPK in Langendorff perfused (60 min) rat hearts under normal conditions (normoxia), after treatment with BGP-15, with imatinib and with BGP-15+imatinib.

A: Representative Western blot analysis of ERK, JNK, p38-MAPK phosphorylation and densitometric evaluations are shown. B

C.



D.

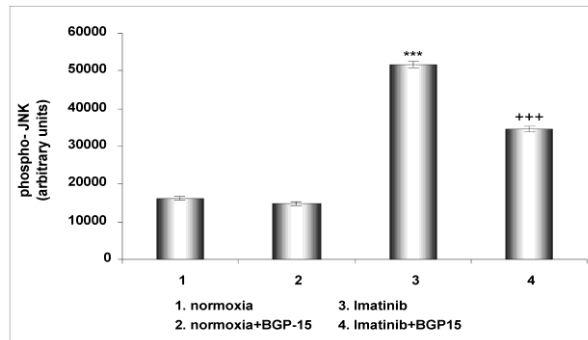
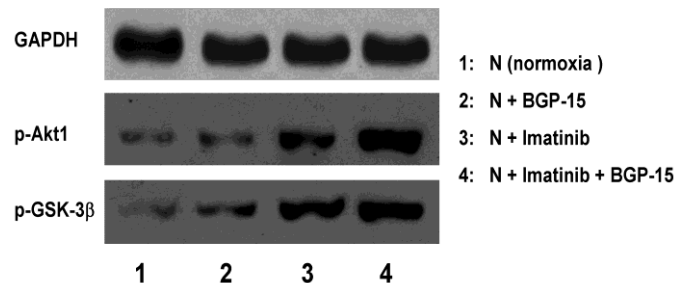


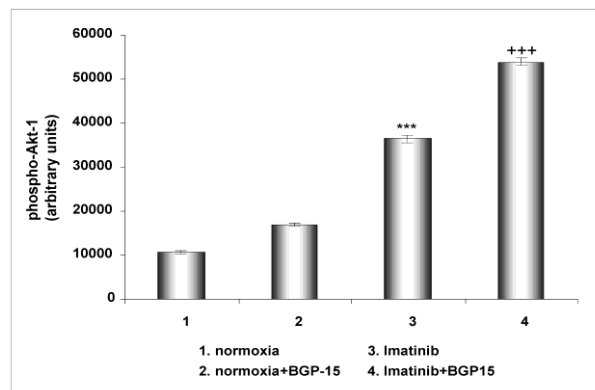
Fig.5 C: densitometric evaluations are shown of p38-MAPK and D: densitometric evaluations are shown of p-JNK: Values are given as means \pm SEM. (***) $p < 0.001$ compared to normoxic levels, +++ $p < 0.001$ compared to imatinib treated levels).

Imatinib induced the phosphorylation of Akt and GSK-3 β , but in the presence of imatinib BGP-15 further induced the phosphorylation of these kinases (Fig.6). Phosphorylation and activation of Akt in the myocardium may play a protective role under stress conditions by maintaining mitochondrial membrane integrity (Tapodi 2005) and by phosphorylation and inactivation of GSK-3 β (Liang 2003).

A.



B.



C.

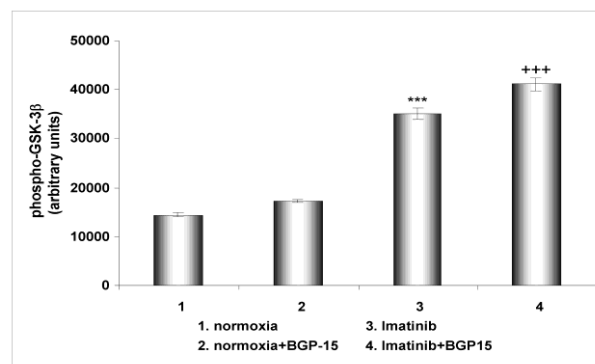
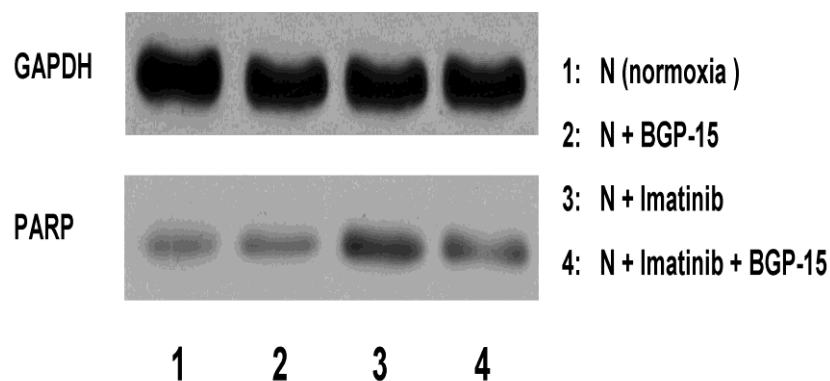


Fig.6. Phosphorylation of Akt1 and GSK-3β in Langendorff perfused (60 min) rat hearts under normal conditions (normoxia) and after treatment with BGP-15, with imatinib and with BGP-15+imatinib.

A: Representative Western blot analysis of p-Akt1, and p-GSK-3β phosphorylation and densitometric evaluation is shown. B: p-Akt1 and C: p-Gsk3beta. Values are given as means ± SEM. (***) $p < 0.001$ compared to normoxic levels, +++ $p < 0.001$ compared to imatinib treated levels).

One hour perfusion with imatinib resulted robust PARP-1 activation. BGP-15 administered alone had no effect of PARP activation, but when co-administered with imatinib successfully reduced the effect of imatinib on PARP-1 activation (Fig.7).

A.



B.

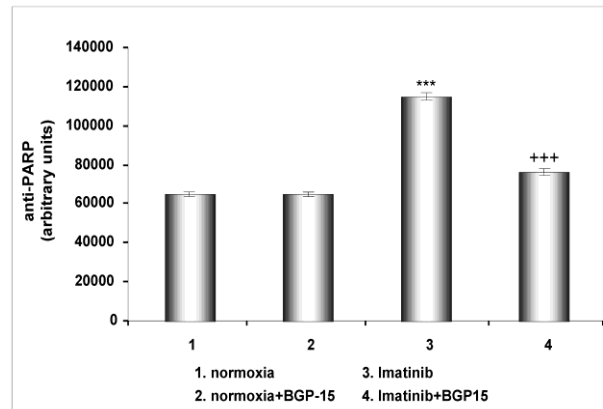


Fig.7. Effect of BGP-15 on imatinib-induced PARP-1 activation under normal conditions (normoxia) and after treatment with BGP-15, with imatinib and with BGP-15+imatinib. Representative Western blot analysis of PARP(A.) and densitometric evaluation (B.) are shown. Values are given as means \pm SEM (***) $p < 0.001$ compared to normoxic levels, +++ $p < 0.001$ compared to imatinib treated levels). ($n=3$ in each group)

2.4 Discussion

To date our study is a pioneering work to elaborate the effect of BGP-15 on imatinib induced energy run-down, oxidative damages and signaling mechanisms on an isolated Langendorff perfused rat heart model. BGP-15 is a nicotinic amidoxime derivate originally developed against insulin resistance. Studies investigating the effects of BGP-15 revealed that this multitarget agent is a potent cardioprotectant under conditions of ischemia-reperfusion by inhibiting overactivation of PARP-1 enzyme and stabilizing the mitochondria, thus preventing ROS generation along the mitochondrial respiratory chain (Halmosi et al 2001, Toth et al 2010, Kovacs et al 2004). Furthermore hepatoprotective (Nagy et al 2010), nephroprotective (RÁCZ et al 2002) and neuroprotective (BÁRDOS et al 2003) effects of BGP-15 were also published. Recently BGP-15 has been introduced as a potent insulin sensitizer (LITERÁTI-NAGY2003, 2010).

Earlier studies performed on myocardium cell cultures confirmed that imatinib treatment might lead to the collapse of mitochondrial membrane potential and the loss of membrane integrity (Kerkela et al 2006). The significant decrease of mitochondrial membrane potential plays a pivotal role in the development of cardiotoxicity (Van Etten 2004). Earlier data clearly defined the structural damage of mitochondria detected by electron microscopy both in human myocardial histological samples and animal models after imatinib treatment. The connection between the deterioration of mitochondrial function and ATP depletion is also well demonstrated. A well-known cytostatic agent, Herceptin causes 35% decrease in myocardial ATP level, contrary to imatinib, which generates 65% decline in ATP concentration. The reduction of ATP level may significantly run down many cellular processes. Earlier studies show that both necrotic and apoptotic cell death coexist in cultured cardiomyocytes. This fact may introduce apoptosis as an ATP-dependent process.

Our study is a pioneering work in that it has elaborated energy run-down in isolated, perfused Langendorff rat heart-model. Using ^{31}P NMR spectroscopy, we managed to show significant ATP and creatine-phosphate depletion in perfused rat heart *in situ*. The detection of energy-depletion after long-time imatinib administration has been well established by earlier reports. By perfusing the heart imatinib-containing solution we have shed light on a new aspect of a relatively quick energy run-down. Accordingly, it is worth to note that not only long-term administration but also its “acute phase” effect of imatinib can deteriorate cellular reactions in general. Energy depletion may compromise the cardiac function and can lead to a compensatory remodelling and heart failure (Pálfi et al 2006). ATP-depletion may also compromise ion transports, mainly increase the cytoplasmic free Ca^{2+} level. The increased level of calcium in cytoplasm causes an increase in the level of calcium in mitochondria, which can lead to mitochondrial permeability pore formation and enhanced mitochondrial ROS production, which then causes enhanced oxidative damages (Murphy 2006). Mitochondrial damages can lead to the activation of apoptotic pathways, which can result in the loss of cardiomyocytes in the damaged heart regions (Subramanian et al 2010). The increase in ROS production and the imbalance of ion concentrations can lead to the rupture of plasma membrane and necrotic cell death. BGP-15 protects the mitochondrial membrane system against oxidative damages (Nagy 2010). This effect of BGP-15 can be crucial in the heart, because mitochondrial energy production is predominant (Balaban 2009), and the protection of the mitochondrial membrane system as well as the membrane potential is prerequisite of active mitochondrial ATP production. Therefore stress conditions were induced by different mechanisms, in all these cases BGP-15 decreased oxidative damages. These data suggested that BGP-15 had significant mitochondrial protecting effects (Halmosi et al 2001, Szabados 2002, Nagy 2010), regarding to protection against mitochondria related apoptotic pathway (Hori 2009) Our data show that the imatinib induced significant oxidative damage in the heart (Fig. 4 and 5), could be reversed by BGP-15, and this observed effect is in good agreement with the mechanism found in ischemic-reperfusion models (Halmosi et al 2001, Szabados 2002, Nagy 2010).

Kerkala et al. showed in cultured cells that imatinib treatment induced the activation of the endoplasmic reticulum (ER) stress response, the collapse of the mitochondrial membrane potential, the release of cytochrome c into the cytosol, a reduction in cellular ATP content and cell death. In our perfused heart system we found oxidative damages, ATP depletion and the effect of imatinib treatment on signaling pathways, which can lead to cell death (Fig. 1-6). The activation of JNK and p38 MAP kinase as a consequence of imatinib treatment can play significant role in the mitochondrial depolarization and the activation of mitochondrial related apoptotic pathway (Duplain 2006). The role of p38 and Akt activation in the cardiotoxic effect is controversial, because these signaling pathways were not dysregulated in other studies (e.g. Kerkala et al). This discrepancy should be laid on the different model system. Furthermore the dose of imatinib was higher than the regular plasma concentration in humans, therefore the direct toxic effect of imatinib must be considered. However Akt activation could be explained theoretically because excessive ROS generation inactivates intracellular PTEN which normally inhibits PI3-kinase-Akt pathway. Therefore inhibition of PTEN could activate Akt pathway. In our model p38 pathway was activated also. Earlier studies clearly defined

that imatinib treatment induces ER stress response which enhances JNK and p38 activation via IRE1-ASK1 pathway. During the imatinib induced oxidative stress oxidation of the Ask1 inhibitor thioredoxins lead to the activation of Ask1 kinase, which is an upstream kinase of JNK and p38 MAP kinases (Matsuzawa 2008). A consequence, the modulation of these kinases can provide a mechanism by which we could protect the heart during imatinib treatment. Here, we showed that by combining BGP-15 with imatinib we could prevent the imatinib induced activation of JNK and p38 MAP kinase in the heart and prevent the oxidative stress and as well as ATP depletion (Fig.2. 4-6). The protective mechanism of BGP-15 is likely mediated by mitochondrial protection, because our previous data indicated that BGP-15 did not interfere with the ER stress response (Nagy 2010), while our other data indicated a mitochondrial protective effect of BGP-15. Furthermore, we found that BGP-15 activated PI-3-kinase Akt pathway, which is a well-known cytoprotective pathway. Akt activation protects cells by preventing the collapse of mitochondrial membrane system in oxidative stress (Tapodi et al 2005) which is the further evidence of BGP-15-mediated mitochondria protecting effect. In this paper we used the well-known cytostatic agent imatinib mesylate to induce cardiotoxicity in perfused Langendorff rat hearts, and tried to identify mechanism of cardiotoxicity *in situ*. Our data showed for the first time that imatinib induced oxidative stress compromised energy metabolism and the activation of potentially cell death inducing kinases (JNK and p38 MAP kinases). These data raised the possibility that the modulation of these pathways could prevent the toxic cardiac effect of imatinib mesylate.

Imatinib treatment leads to a rapid increase in poly(ADP-ribosyl)ation (PAR), preceding the loss of mitochondrial membrane integrity and DNA fragmentation. It is also important to note that the inhibition of PAR in imatinib-treated cells partially prevented cell death to an extent comparable to that observed after caspase inhibition (Moehring 2005). Previous data showed that BGP-15 protected cells in oxidative stress by protecting the mitochondrial membrane system (Halmosi 2001, Nagy 2010)], which suppressed the activation of nuclear poly-ADP-ribosylation. Our data support the earlier findings that imatinib treatment induces PARP activation. Furthermore, we demonstrated that BGP-15 was protected against PARP activation and the toxic cardiac effect of imatinib *in situ*.

The mechanism by which BGP-15 prevented the imatinib-induced cardiotoxicity is likely regarded to its mitochondrial protective role, because BGP-15 counteracted the oxidative stress induced effect of imatinib and prevented the imatinib mesylate induced activation of JNK and p38-MAP kinase. Furthermore, BGP-15 attenuated PARP-1 activation and induced the activation of PI-3-kinase – Akt pathway, which can also contribute to the mitochondrial protection (Fig.8).

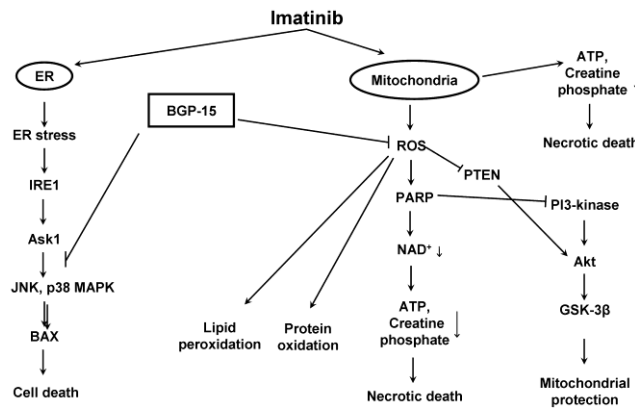


Fig.8. Molecular mechanisms of imatinib mesylate-induced cell death and possible regulatory points of BGP-15. Imatinib induces ER stress leading to activation IRE1-Ask1 pathway and further activation of JNK and p38 MAPK. Releasing of BAX and imatinib itself induce mitochondrial membrane depolarisation leading to ATP depletion, cytochrome c (Cyt c) release, and features of necrotic and apoptotic cell death. During mitochondrial damage excessive ROS generation enhances PARP-1 activation leading to NAD⁺ and ATP depletion, which eventually cause necrosis. Furthermore ROS-mediated PTEN inactivation could activate PI3-Akt pathway. Inhibition of PARP-1 activity suppresses both processes leading to attenuation of NAD⁺ depletion, mitochondrial protection and cell survival.

3. Clinical investigation

Effect of acute physical exercise on vascular regulation, oxidative stress, ADMA and arterial stiffness

3.1 Introduction

Among the cardiovascular risk factors, arterial stiffness and endothelial dysfunction are believed to be the most important. Regular endurance exercise is associated with lower cardiovascular risk in middle-aged and older patients (Blair et al 1989, Manson et al 2002, Mora et al 2007). The mechanism of this beneficial effect is not understood exactly. Earlier studies demonstrate various impact of exercise to arterial stiffness, oxidative stress and endothelial dysfunction.

Oxidative stress, defined as the imbalance in production of ROS over antioxidant defense is the most important step to endothelial dysfunction. Superoxide reacts with NO synthesised by endothelial NO synthase generating oxidant peroxynitrite, which induces NO inactivation, decreases NO bioavailability and uncouples NO synthase. Previous studies suggest that oxidative stress involves enhanced NADPH oxidase activity leading to ROS overgeneration and eNOS inactivation. On the other hand eNOS activity is deeply influenced by ADMA such as competitive inhibitor.

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is a methylated arginine analogue derived from proteolysis of proteins containing methylated arginine. Elevated plasma level of ADMA is associated with endothelial dysfunction. Several previous studies suggest that elevated plasma

level of ADMA is a risk factor for numerous human diseases such as hypertension, diabetes mellitus, peripheral arterial disease, preeclampsia, coronary artery disease, renal diseases.

Production of ADMA is correlated with age and the plasma level is dependent from activity of catabolic enzyme, dimethylarginine dimethylaminohydrolase. ADMA is directly involved in the pathogenesis of atherosclerosis by influencing of oxidative stress and bioavailability of nitrogen monoxide. Furthermore previous studies suggest the connection between ADMA and rennin-angiotensin system. ADMA can increase superoxide production modulated by stimulation of angiotensin-II– NADP(H) oxidase pathway. (Veresh et al 2008).

The impact of physical exercise to endothelial function and oxidative stress was widely investigated in the two last decades. Some previous studies suggest that long term periodic physical training has a beneficial effect on elevated plasma level of ADMA. These studies demonstrate that endurance training reduces circulating ADMA level in patients with coronary artery disease (Richter 2005), type I diabetes mellitus and metabolic syndrome. (Mittermayer 2005, Gomes 2008) It proves oneself to be non-sustained when patients discard the regular physical exercise

Some studies proved that physical fitness was negatively correlated with oxidative stress markers such as lipid peroxidation, DNA oxidation and protein oxidation in postmenopausal women. Moreover higher values of antioxidant enzymes (catalase and glutathione peroxidase) were found in the fit group and the positive relationship between glutathione peroxidase and fitness variables (VO₂max, MET). This fact supports the earlier finding that regular exercise increases the antioxidant defense in reaction to sudden rise of ROS generation during a single bout of exercise. The acute physical exercise is presumed to generate free radicals by three ways: 1. during the exercise increasing of catecholamine level and its metabolism produce free radicals, 2. production of lactic acid promote conversion of superoxide into strongly damaging hydroxyl, 3. inflammatory response to muscle damage.

On the one hand antioxidant defense depends on dietary intake of antioxidant vitamins and endogenous production of antioxidant compounds and on the other hand repetitive exercise bouts can upregulate antioxidant defense. (Dékány 2006) For example in postmenopausal women the fitness capacity negatively correlates with oxidative stress level and positively with antioxidant defense (catalase and glutathion). The fitness capacity closely has bearing on blood pressure also. Higher VO₂max associates with lower protein and lipid peroxidation levels (MDA, 8OhdG). (Pialoux 2009)

Arterial stiffness is an important factor for cardiovascular performance and an independent predictor of cardiovascular risk. Moreover increased aortic augmentation index is associated with coronary artery disease. (Agabiti-Rosei 2007) Correlation between central pressures and cardiovascular risk is well known not only in patients with coronary disease but also in manifestly healthy subjects. Additionally the late systolic augmentation of the central pressure waveform is associated with an increase in left ventricular mass index independent of age and mean blood pressure (Agabiti-Rosei 2009). Some studies investigated the effect of exercise training on arterial stiffness in healthy young athletes compared to recreationally active individuals, and in patients with coronary artery disease (CAD). Augmentation index was lower in competitive endurance athletes who have higher fitness levels and who exercise at a higher intensity, for a longer duration, and more frequently as compared with recreationally

active individuals. These differences may be due to functional changes that occur as a result of training. (Edwards 2005)

Similarly in patients with CAD augmentation index was lower significantly after 12 weeks of exercise. These results suggest that endurance exercise training improves systemic arterial stiffness in individuals with CAD (Edwards 2004). But in another study, healthy youngs were investigated after 6 day endurance daily exercise, surprisingly no significant changes were observed at 75 bpm in AI(x), vascular conductance, heart rate variability or VO₂(peak). However pulse wave velocity was significantly decreased. These data indicate that changes in arterial stiffness are independent of changes in heart rate variability or vascular conductance. Relatively pure data are available regarding acute effect of single bout exercise on arterial stiffness and on endothelial function.

Marathon runners were investigated before and after marathon race. A significant fall in wave reflections was observed after marathon race, whereas aortic stiffness was not altered. Moreover, marathon runners have increased aortic stiffness and pressures, whereas wave reflections indexes do not differ compared to controls (Vlachopoulos et al 2010). The marathon running is an extreme burden for athletes. So much remains to be understood about the impact of common physical exercise on arterial stiffness and oxidative stress.

The aim of our study was to investigate the effect of single bout maximal physical exercise on oxidative stress, asymmetric dimethylarginine and arterial stiffness in well-trained swimmers and runners.

5.2 Patients and methods

5.2.1 Subjects

21 young men well-trained athletes (mean age 22.4 y ±3.4 years) were enrolled into the study after signing an informed consent. Their basic clinical characteristics are summarized in Table 1. All of the participants had normal resting electrocardiogram and echocardiogram and they did not use any medication at the time of the study.

3.2 Experimental design

Symptom-limited exercise was performed by treadmill spiroergometry (CASE 6.5, respiratory function was analysed by LF-8 system) using Bruce protocol, which increases the workload gradually every 3 min. Vital signs, blood pressure, 12-lead electrocardiogram were detected regularly. Oxygen uptake and other respiratory parameters (minute ventilation, carbon dioxide output) were measured at rest and during the exercise. Maximal oxygen uptake, maximal workload (MET) and anaerob threshold (AT) were determined during the exercise test.

Augmentation index and pulse wave velocity were measured by using of the Arteriograph (TensioMed Kft., Budapest, Hungary.) Augmentation index and pulse wave velocity were measured before and after exercise stress test at the end of recovery phase. The measurements were performed in a supine position and were accepted if the quality indicator of the

recordings was within the acceptable range (i.e., the SD of the beat-to-beat measured PWVao values was less than 1.1 m/s).

Venous blood samples were obtained before, immediately after and 4 hours after the stress test, respectively. Samples were centrifuged and serum was removed and was frozen in -20°C . Serum ADMA, SDMA, arginine levels were measured.

Quantitative determinations of peroxides were performed by Oxystat ELISA method, which measures the total peroxide concentration formed in the propagation phase of the LDL oxidation process. Blood samples were collected 2 hours later at the end of exercise stress test considering duration of propagation phase. Using the Oxystat assay the normal range exists between 0-400 $\mu\text{mol/l}$.

Independent sample t tests were used to compare oxidative stress marker Oxystat, serum ADMA level, augmentation index and pulse wave velocity before and after physical exercise test. Pearson correlation coefficients between Aux, PWV and oxidative stress markers were estimated. Statistical analysis was performed with SPSS (version 15.0, SPSS Inc.)

3.3 Results

High level of $\text{Vo}_{2\text{max}}$, MET and anaerob treshold levels demonstrate that athletes were very well-trained. Serum arginine levels ($70,77 \pm 27,002$ versus $74,96 \pm 22,97$ $\mu\text{mol/l}$), serum ADMA ($0,79 \pm 0,15$ versus $0,73 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/l}$) and SDMA levels ($0,58 \pm 0,12$ versus $0,57 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/l}$) were not significantly different before and after exercise stress test. (Fig.9,10,11.) The oxidative stress response was evaluated by analyzing blood oxidized LDL level before and 2 hours later after exercise. Oxystat data show surprisingly no significant changes before and after exercise ($260,76 \pm 40,50$ versus $267,08 \pm 68,02$ $\mu\text{mol/l}$) though normally physical exercise increases oxidative stress level. (Fig.12.)

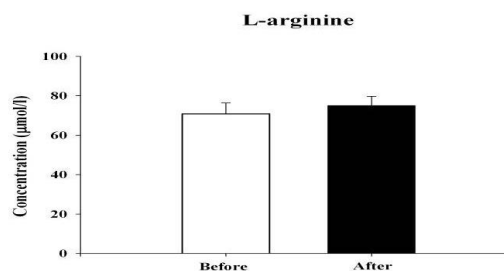


Fig. 9. Mean and SD of serum arginine ($70,77 \pm 27,00$ versus $74,96 \pm 22,97$ $\mu\text{mol/l}$) There was no significant difference before and after exercise $p < 0.49$

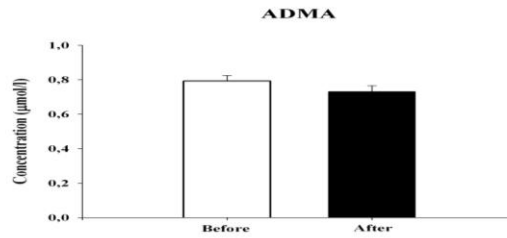


Fig. 10. Mean and SD of serum ADMA $0,79\pm0,15$ versus $0,731\pm0,16$ $\mu\text{mol/l}$. There was no significant difference before and after exercise $p<0,13$.

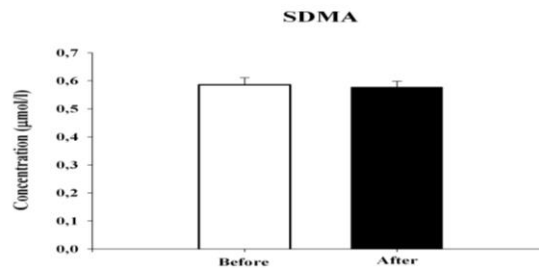


Fig.11. SDMA levels $0,58\pm0,12$ versus $0,57\pm0,10$ $\mu\text{mol/l}$ were not statistically significantly different before and after exercise stress test. $p<0,57$

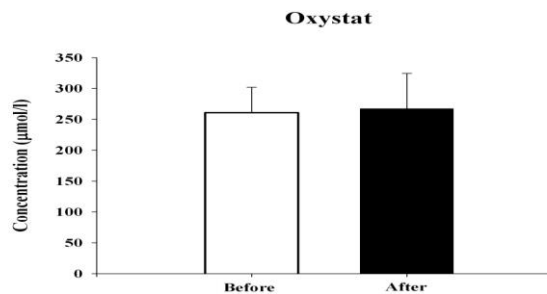


Fig.12. Mean and SD of serum oxidized LDL ($260,76\pm40,50$ versus $267,08\pm68,02$ $\mu\text{mol/l}$) There was no significant difference before and after exercise. $p<0,43$

AIX is a complex composite measurement, derived from many dynamic variables, such as PWV, ventricular contractility and the resistance of the small arteries. Both pre-test and post-test augmentation index values were in normal range. Augmentation index significantly dropped after exercise stress test compared to pre-test levels. ($-50,92\pm16,43$ versus $-70,13\pm8,589$ $p<0,001$) (Fig.13.) PWV values were not significantly differed before and after stress test. ($6,49\pm1,001$ versus $6,27\pm1,037$ $p<0,48$) and existed in normal range. (Fig.14.)

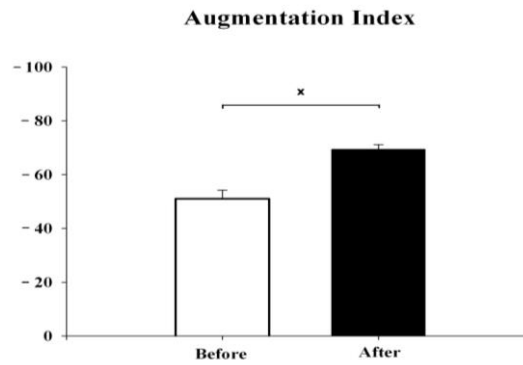


Fig. 13. Augmentation index significantly decreased after exercise compared to pre-test augmentation index $-50,9211 \pm 16,43041$ versus $-70,1316 \pm 8,58966$ $p < 0.001$

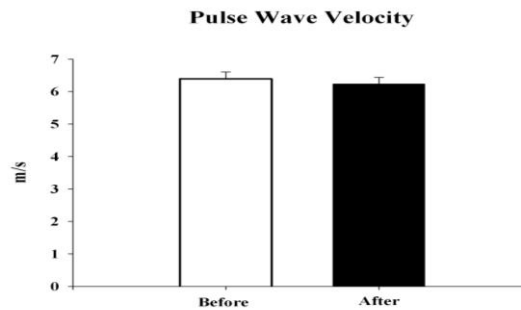


Fig. 14. Mean values of pulse wave velocity before and after exercise. There is no significant effect of exercise on PWV

5.4 Discussion

Several studies have reported that exercise training can protect against myocardial infarction in animal model and has been associated with improved survival following an ischemic event in humans. The background of protective mechanisms is not fully understood. On the one hand the endurance exercise can reduce risk factors related to cardiovascular disease, including obesity, high blood pressure, and high lipid level and insulin resistance. On the other hand the exercise training has an independent beneficial effect related to the reduction of these risk factors. Moreover earlier studies demonstrate the infarct sparing effects of exercise both during long-term (10 weeks) and short-term (1–5 days) training regimens.

Although the physiological and cardioprotective effects of exercise training have previously been documented, the signalling mechanisms that mediate these effects have not been fully understood. However, it is known that exercise training increases a number of classical signalling molecules. For instance, exercise can increase components of the endogenous antioxidant defences (i.e. superoxide dismutase and catalase), increase the expression of heat shock proteins, activate ATP-sensitive potassium (KATP) channels, increase the expression and activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) resulting in increased NO levels. (Calvert 2011) NO plays a central role in both blood delivery and the capacity of cells to

extract several substances. First, the release of NO from endothelial cells in response to shear stress induces vasodilatation of arteries in both the skeletal muscle and the heart to increase blood flow. Second, NO has been reported to alter carbohydrate metabolism in skeletal muscle through an enhancement of glucose uptake and inhibition of glycolysis. Furthermore to its effects on matching blood supply to metabolic demands during exercise, NO is also responsible for some of the atheroprotective effects of exercise through its ability to inhibit inflammatory cells and platelets from adhering to the vascular surface. Not only eNOS and NO play a key role in these processes but also asymmetric dimethylarginine, such as a competitive inhibitor of eNOS can alter the exercise induced beneficial changes. Exposure of human endothelial cells to mild or moderate shear stress causes overexpression of protein methylase-1 (PRMT-1) and the release of ADMA via activation of the NF- κ B pathway. Shear stress at higher magnitude, however, enhances the degradation of ADMA via stimulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity and reduces ADMA level to baseline (*Osanai 2003*). Interestingly, the activity of the enzymes involved in the formation and degradation of ADMA such as PRMT-1 and DDAH are regulated in a redox-sensitive fashion. Thus, oxidative stress enhances the activity of PRMT-1 and inhibits the activity of DDAH leading to increased ADMA concentration. Under those conditions, ADMA could inhibit eNOS activity and/or even uncouple the enzyme, which would further increase oxidative stress (*Scalera 2006*). In contrast, reduced oxidative stress enhances the activity of DDAH (*Scalera 2004*), causing decreased ADMA levels.

Earlier studies have demonstrated that regular endurance exercise can reduce the serum level of ADMA. However the minimum duration of exercise training needed to achieve a decrease in the levels of ADMA and provide cardioprotection is not clearly understood. In addition some question remains unanswered. How high can exercise training increase levels of antioxidant defense and decrease the level of ADMA and how long does it take to reach a new steady-state level? Will the new steady-state levels of be maintained over time? Additionally, how can the different types of exercise training, alter the antioxidant defense and ADMA levels?

Our findings suggest that asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and L-arginine are not modulated by acute maximal exercise stress in healthy sportsmen. The maximal physical exercise rapidly elevates shear stress; which theoretically should induce an increasing ADMA level. In opposite, acute phase changes cannot be detected after single bout exercise it seems that repetitive endurance exercise evolves protective effect. Moreover the endurance exercise training can reduce ADMA level after 8-12 weeks training programme and the lower level remains sustained if the patient did not give up the training. Between two decisive points the time-course is not defined.

Under physiological conditions, small amounts of reactive oxygen species (ROS) produced as a consequence of electron transfer reactions in mitochondria, peroxisomes, and cytosol and during the exercise the amount of ROS rapidly elevates. If the cellular antioxidant capacity is sufficient antioxidants can capture reactive oxygen species. Two most important antioxidant enzymes are SOD and catalase. Previous findings suggest that short durations of exercise training are not sufficient to increase SOD expression but catalase activity was increased in response to 8 days of exercise training and by 9 days of rest, catalase activity had returned to baseline levels. Interestingly, the protective effect of SOD and catalase against myocardial

infarction is remained unclear (Lennon 2004). It seems that the duration and intensity of the endurance training determines which endogenous antioxidants will be overexpressed. Furthermore an increase in endogenous antioxidants may be sufficient to provide cardioprotection in response to exercise, but is not necessary. The acute physical exercise is presumed to generate free radicals which can enhance lipid peroxidation. Our findings demonstrate that the level of lipid peroxidation was not significantly different before and after maximal physical exercise stress test. The endurance exercise induces elevated antioxidant defense, which can cope with ROS generation related to acute physical stress.

Arterial stiffness parameters are commonly used for this purpose - to identify structural and functional changes in the arteries on the development of atherosclerotic disease. The independent predictive value of aortic stiffness has been demonstrated for fatal stroke, all-cause and cardiovascular mortalities, fatal and non-fatal coronary events in hypertensive, diabetic, end-stage renal disease, in elderly patients and in the general population. Among stiffness parameters, the aortic pulse wave velocity (PWV), and the wave reflection, measured as augmentation index (Aix) were determined. Moreover, carotid-femoral pulse wave velocity (PWV), a direct measure of aortic stiffness, has become increasingly important for total cardiovascular (CV) risk estimation. PWV is accepted as the most simple and reproducible method to assess arterial stiffness.

Aix is defined as the difference between the second and first systolic peaks of the pressure wave, expressed as a percentage of the pulse pressure. Therefore Aix is a complex composite measurement, derived from many dynamic variables, such as PWV, ventricular contractility and the resistance of the small arteries.

Our findings support earlier establishment that pulse wave velocity is not modulated by physical exercise. This fact is explained by good elasticity of aorta in young healthy sportsmen. Recent study demonstrates that not only endurance exercise but a single bout exercise can reduce augmentation index. The rapid decreasing of Aix after exercise test may indicate physiological exercise-related vascular response namely dropping of peripheral vascular resistance. This non-invasive method may be eligible to evaluate physiological and pathological vascular response to physical exercise. Moreover it may be a predictor of endothelial dysfunction.

4. Conclusion

Oxidative stress is one of the most important pathophysiological processes leading to myocardial cell damage, endothelial dysfunction and endothelial cell damage. Aim of our experimental investigation was to identify underlying mechanism of oxidative stress and myocardial cell damage in typical cytotoxic agent –induced perfused heart model. Our data demonstrate cytotoxic agent-induced myocardial cell damage exist on the basis of energy-depletion, enhanced lipid peroxidation and protein oxidation. Among signalling mechanisms, the prodeath effects of activation of JNK-p38-MAPK pathway was confirmed.

Furthermore oxidative stress can damage not only myocardial cells but also endothelial cells. In our clinical study we investigated the role of ADMA and lipid peroxidation in context of physical exercise – induced oxidative stress. In both experimental and clinical studies we evaluated the protective effect of using a new exogenous antioxidant agent (BGP-15) and the

beneficial effect of elevation of endogenous antioxidant defense by endurance exercise. Effectiveness of both methods were confirmed. Furthermore we realised the usefulness of measuring of arterial stiffness on clinical evaluation of endothel function.

Az oxidatív stressz szerepének vizsgálata vaszkuláris és szívizom károsodásban
experimentális és humán modellben

PhD Tézis

Dr.Sárszegi Zsolt

Program vezető. Prof. Dr. Róth Erzsébet

Téma vezető: Prof Dr. Sümegi Balázs és Dr. Cziráki Attila med. habil.



Pécsi Tudományegyetem
Szívgyógyászati Klinika

Pécs
2012

1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek jelentős terhet jelentenek a fejlett országok számára. Emiatt ezen betegségek kutatásának egyik fő célja új terápiás eszközök és stratégiák kidolgozása. Az érfali károsodás tekintetében számos rizikófaktor között egyik legjelentősebb az endothel diszfunkció és az arteries stiffness. A myocardium károsodás vonatkozásában a leggyakoribb patofiziológiai eltérés az ischemia-reperfúziós károsodás és a direkt toxikus károsodás, mely a szívizomsejtek nekrozoisához és apoptózisához vezethet. A fenti eltérő patofiziológiai folyamatokban az oxidative stress egyaránt fontos szerepet játszik. A reaktív oxygen gyökök fiziológiai és patofiziológiai szerepének tanulmányozása és megértése segítséget ad a potenciálisan effektív gyógyszerek kifejlesztésében, új terápiás stratégiák kidolgozásában..

1.1. Az oxidative stress és a miokardium károsodás

Az oxidative stress az egyik legjelentősebb apoptotikus stimulus ischémiás szívbetegségben. Ischémia során a légzési cytochrom rendszer redukált állapotba kerül, mely lehetővé teszi az elektronok direct transzferjét oxygenre. Reaktív oxygen gyökök (ROS) nagy mennyiségben keletkezhetnek a mitochondriumokban melyek DNS károsodást, protein oxidációt, lipid peroxidációt és egyéb direct sejtkárosodásokat okozhatnak és végső soron a sejt apoptosist idézhetik elő.

A reaktív szabad gyökök egy másik jelentős forrása az intracelluláris oxidázok, ide értve a NADPH oxidázt (NOX) és a xanthine oxidázt. Az antioxidánsok fiziológiai szerepe az, hogy biztosítsák az oxido-reduktív egyensúlyt és eltávolítsák a szabad gyököket. ((Halliwell et al 1985). Számos remodellinget indukáló faktor (pl. neurohormonok, növekedési faktorok és citokinek) melyek sejtkárosodás esetén aktiválódnak ROS termelő enzimeket aktiválhatnak, másrészt csökkentik az antioxidáns defense-t, így a ROS mennyiségének növekedését okozzák (oxidatív stressz) (Dhalla et al 1994, 1996, Hill et al 1996). Az excesszív ROS képződés közvetlen sejt károsodást okoz DNS károsodással, lipid és protein oxidációval. A reaktív szabad gyökök részt vesznek a redox-szenzitív szignál kaszkádok beindításában is. Ezek a kaszkádok beindíthatnak mind protektív (adaptive) mind károsító (maladaptive) sejtszintű folyamatokat.

Szignál mechanizmusok szerepe a myocardium sejt károsodásba

ROS-mediált proapoptikus szignál mechanizmusok

A reaktív oxygen gyökök szelektíven képesek triggerelni intracelluláris szignál mechanizmusokat melyek programozott sejthalált indítanak be. mint például az apoptosist signal kinase (ASK-1), p38, és c-Jun-N-terminal kinase (Ichijo 1997, Remondino 2003), (Yamaguchi et al 2003) melyek kulcsszerepet játszanak a szívizomsejt apoptózisban és aktiválják a Bcl-2 protein rendszert, p53 és caspase rendszert (Matsuzawa et al 2005). Emellett a reaktív oxygen gyökök mitokondriális membrán és electron transzport lánc károsodást képesek előidézni és további szabad gyök képződést okoznak. 'ROS-indukált

ROS kibocsátás” mely mitochondriális membrane potenciál csökkenést és irreverzibilis sejt károsodást okozhat Gustafsson 2008).

Számos adat bizonyítja, hogy a JNK és a p38 “Janus-arcú” jelátviteli szignál. Szívizomsejtekben a JNK mind protektív mind patológiás szerepet betölthet a ROS-indukált folyamatokban. Ischemia-reperfúziós modellben JNK specifikus inhibitor használatával az apoptosis gátolható volt, ugyanakkor számos kísérleti adat igazolta azt is, hogy a JNK-nak kulcsszerepe van a szívizomsejtek túlélésében és a kardioprotekcióban. A JNK képes aktiválni a proapoptotikus Bax és Bad rendszert a mitokondriális membránon de aktiválja a “túlélő” útvonalat is, mint például az Akt-t. Kaiser és munkatársai szív ischemia reperfúziós modelleken igazolták, hogy myocardium védelem érhető el a JNK aktivációjával és általános gátlásával egyaránt. Ezek az ellentmondásos adatok a szívizomsejt apoptosis és túlélés szabályozásának komplexitására utalnak.

A p38 szignál útvonalnak jelentős szerepe van a szívizomsejt kontraktilitás és a sejt halál szabályozásában. A p38 aktivációja a kontraktilitás csökkenéséhez vezet az intracelluláris kalcium forgalom befolyásolása nélkül. A p38 aktivitás negative inotrop hatása epigenomikus tulajdonságnak látszik mivel ez a hatás rapid és reverzibilis. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy p38 aktiváció után izolált szívizomsejt myofilamentumokon csökkent kontraktilitást észleltek és másodlagos sarcomer fehérje modifikáció volt igazolható. s. It is highly controversial whether p38 pathway is cardiac protective or prodeath in the heart. Számos vizsgálat igazolta, hogy a p38 aktivitás gátlása myocita sejt kulturában illetve infarctusos szívben csökkenti az apoptotikus sejthalált. A p38 gátlása konzekvensen javítja a miokardium funkciót és gátolja a remodellinget ischemia-reperfúzió és myocardialis infarctus során. Ezek az effektusok nem voltak igazolhatóak disznó állatkísérletes modellben, ami azt igazolja, hogy faj-specifikus határról van szó. Másrészt önmagában a p38 aktivációja nem elégséges myocita apoptosis indukálásához. Nyomás túlterhelés hatásait vizsgáló állatkísérletes modellekben a p38 inaktivációja viszont fokozott apoptotikushoz vezetett, mely azt bizonyítja, hogy a különböző stresszorok a p38 aktivációján keresztül mind protektív mind hátrányos is lehet a szívizomsejt túlélése szempontjából.

ROS-asszociált protektív szignálok

A proapoptotikus jelátviteli útvonalakon kívül a reaktív oxygen gyökök aktiválják a mitogen-aktivált protein kinaáz kináz (MEK)/extracelluláris signal-regulated kinase (ERK) és a phosphoinositide 3-kináz (PI3K)/Akt útvonalakat is. Mindkét útvonal fontos szerepet játszik a sejtek növekedésében és a túlélésben különböző sejtekben, így szívizom sejtekben is. Hasonlóan más mitogen-aktivált protein kináz útvonalakhoz a MEK/ERK útvonal aktiválódni képes exogén és endogen eredetű ROS hatására is. (Bueno 2000, Kwon 2003). Talán a legklasszikusabb “túlélési” szignál a PI3K/Akt útvonal (Cantley 2002). Különböző receptorok stimulálása szívizomsejtekben, mint például a Gq-protein kapcsolt receptor, insulin- és insulin-like growth factor, tyrosine kinase receptorok, aktiválják az Akt útvonalat, mely kardioprotekciót eredményez. A PI3K/Akt aktiváció gátolja az apoptosist in vitro szívizom sejteken és ischemia-reperfúziós modellben is patkány szíven. Hasonlóan a MEK/ERK útvonalhoz, a ROS Akt aktivációt okoz, mely protektív mechanizmusokat indít be. Ischemia-reperfúziós károsodás során mind a necrosis mind az apoptosist játszik a sejthalálban

szívizomsejtekben. Caspase-3, -8, -9 aktiváció és Bax valamint Bcl-2 transzlokáció jön létre apoptózis során a szívizomsejtekben. Az apoptózis kialakulásához esszenciális kofaktorok hiánya esetén a folyamat nekrozisba megy át. Az egyik legfontosabb kofaktor az ATP, mivel az apoptózis energia-igényes folyamat.

1.2 Az oxidatívstressz és az endothel funkció

Az aszimmetrikus dimethylarginine (ADMA) egy természetes L-arginine analóg mely proteolízis során metilált arginine reziduumokból képződik. A folyamatot a protein arginine methyltransferases (PRMTs) enzim katalizálja. Az ADMA a nitrogen-monoxid szintetáz mindhárom izoenzimjének kompetitív inhibitora. Képes kikapcsolni az enzimet, szabad gyököket generálni. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy az emelkedett ADMA szint endotél diszfunkcióval jár együtt, így számos betegség rizikófaktora, mint a hyperhomocysteinemia, hipertónia, koszorúér betegség, perifériás obliteratív érbetegség pulmonalis hipertónia és preeclampsia. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az ADMA koncentráció-függően emeli az oxidatív stressz szintjét endotél sejt kultúrában. Az ADMA aktiválja a NF- κ B, mely monocita kemotaktáns protein-1 (MCP-1) aktivációt és fokozott monocita adhéziót okoz az endotél sejtekhez. Az MCP-1 és az interleukin-8 (IL-8) a legfontosabb kemokinek melyek fokozottan expresszálódnak az endotél ateroszklerotikus plakkjaiban. Az oxidatív stressz jelentős szerepet játszik a sejtek öregedésében. Egy tanulmány igazolta, hogy a sejt kultúrákban in vitro észlelhető sejt öregedés oxidatív stresszrel felgyorsítható, NO donor alkalmazásával lassítható.

Az ADMA kapcsolatban áll a mikrovaszkuláris RAS rendszerrel és stimulálni képes és fokozott angiotensin-II képződéshez vezet. Ez utóbbi stimulálja a NADPH oxidázt, ami fokozza a ROS képződést (Veresh 2008). Az ADMA aktiválja a p38 mitogen-aktivált protein kinázt human koronaria endotél sejt tenyészetben. Az ADMA és a RAS rendszer közötti kapcsolatot a p38 hozza létre, ezt támasztja alá, hogy ACE fehérje expresszió váltható ki p38 mitogen-aktivált protein kináz aktivációjával.

Az ADMA befolyásolja az endotél barrier funkciót és permeabilitást. Ennek hátterében számos különböző mechanizmus állhat. Egy korábbi vizsgálat igazolta, hogy az ADMA a pulmonális endotél sejtek permeabilitását fokozza mind in vivo mind in vitro. Ez a hatás a nitrogen monoxidon keresztül regulálódik aktiválva a protein kináz G-t és független a ROS képződéstől. Más vizsgálatok igazolták, hogy az ADMA rontja a glomerularis filtrációs barrier integritását a nitrogen monoxid biohasznosulásának befolyásolása útján valamint superoxide által indukált NO-independens solubilis guanylyl cyclase aktivációjával. (Sharma 2009).

A vaszkuláris oxidatív stressz vaszkuláris remodellinget okoz. A korai vaszkuláris remodelling vagy a collagen és elasztin fokozott redistribúciója az érfalban jelentős szerepet játszik a patofiziológiai folyamatokban. A ROS és a collagen szintézis közötti kapcsolat jól ismert. Az angiotensin-II által indukált procollagen szintézis gátolható szabad gyök fogókkal és NADPH oxidáz gátlókkal. Emellett az Ang II-indukált procollagen- α 1(I) szintézis csökkenthető SOD1 overexpressziójával. A fibrillaris collagen akkumuláció a vaszkuláris stiffness fokozódásához, az érfali compliance csökkenéséhez vezet. Az artériás stiffness szorosan összefügg a vaszkuláris simaizom funkcionális változásaival is. Vazoaktív

mediátorok, melyek hatásukat a vaszkuláris simaizomzaton keresztül fejtik ki, közel 30%-kal képesek változtatni az érfal átmérőjét, anélkül, hogy befolyásolnák a vérnyomást vagy a perifériás rezisztenciát. Ez bizonyítja a dinamikus kapcsolatot a vaszkuláris simaizom és az artériás stiffness között.

Az artériás stiffness klinikai mérése a pulzus hullám sebességének és az augmentációs index meghatározásával lehetséges. Ezek a paraméterek a centrális és perifériás nyomás hullám regisztrálásával határozhatóak meg. A centrális artériás nyomás hullám formája eltér a perifériás nyomás hullám formájától, mivel a vaszkuláris hálózatban helyfüggően változik az artériák merevsége. Ráadásul a centrális artériás hullámot jelentősen befolyásolja egy reflektált hullám. (Nichols és O'Rourke 2005). A reflektált hullám a periférián generálódik a kis erek szintjén, majd visszaverődik a centrális artériákba (O'Rourke and Kelly 1993). Egészséges egyénekben a reflektív hullám a diasztole során ér vissza a centrális artériákba és erősíti a diasztolés áramlást a koronáriákban. Az előre haladó hullám sebességének pulzus hullám sebességnek hívjuk (PWV) (Lehmann et al 1998). Az életkor előrehaladtával a reflektív képesség nő a periférián és gyorsul a pulzus hullám terjedési sebessége az érfal merevebbé válása miatt, mely korai augmentációt okoz a systoles nyomáshullámon. ("késői systoles csúcs fenomén"). Ez magyarázza a különbséget a brachialis és aorta nyomás hullám között mely nagyobb lehet, mint 20 Hgmm (Pauca et al 1992). A centrális nyomás hullám fontos a bal kamrai terhelés meghatározásában, mely relative független a brachialis nyomástól.

Az applanációs tonometria egy non-invazív technika, mely alkalmas a perifériás nyomás hullám regisztrálására és egy centrális artériás nyomáshullámot general, mely regisztrálható a radialis artérián. Az applanációs tonometria az arteria falának perifériás rezgését váltja ki és az intra-arteriális nyomás kiegyenlítését. A centrális artériás nyomásgörbe későbbiekben a perifériás nyomásgörbéből vezethető le egy validált transzfer factor használatával, melyet augmentációs indexnek nevezünk és alkalmas az artériás stiffness jellemzésére (Takazawa et al 1998). A pulzus nyomás hullám analízise alkalmas non-invazív eszköznek bizonyult az endotél funkció jellemzésére. (Wilkinson, Hall, et al 2002).

A pulzus hullám terjedési sebességének meghatározásához hasonló technika alkalmazható, mely a pulzus hullám propagációját határozza meg 2 pont között, általában a carotis és a femorális vagy a carotis és radiális artériás pulzus regisztrálása révén (Oliver and Webb 2003). A pulzus hullám terjedési sebesség fordítottan arányos az artériás stiffnesssel és disztenzibilitással. A pulzus hullám terjedési sebességének meghatározásához szükséges identikus pontok megjelölése a pulzus hullám görbéken. A SphygmoCor rendszer a pulzus nyomás görbe talpát, a Complior rendszer a görbe csúcsát használja. (Millasseau et al 2005). A PWV növekedése az ascendáló aorta szisztolés görbéjének erősítését okozza, mely a pulzus nyomás növekedését eredményezi és bal kamrai terhelést okoz (Nichols 2005). A pulzus nyomás görbe analízis és pulzus hullám terjedési sebességének meghatározása alkalmas az artériás stiffness jellemzésére mind kutatási mind klinikai célra. Az artériás stiffness mint független rizikó marker használható a kardiovaszkuláris mortalitás (Laurent et al 2001; Meaume et al 2001) és a cerebrovaszkuláris események (Laurent and Boutouyrie 2005) előrejelzésére emellett prognosztikus ereje hasonló a jelenleg elérhető biomarkerekével.

Szívizom és endotél védelem antioxidánsokkal

Számos vizsgálat bizonyította az antioxidáns vegyületek és bizonyos nyomelemek kedvező hatását endotél diszfunkcióban, ischemia-reperfúziós károsodásban vagy kardiotoxikus anyagok által kiváltott miokardiális károsodás esetén. Az antioxidánsok egyfajta mechanizmus alapján képesek kifejteni hatásukat. Csökkentik a reaktív oxygen gyökök termelését, befogják a szabad gyököket vagy ROS-indukált folyamatokat gátolnak. A mitokondriális folyamatok befolyásolása egy fontos célpontja a ROS termelés gátlásának. Antioxidánsok vagy nyomelemek, mint a szelén vagy cink használata valamint a rendszeres fizikai tréning is a zsírsavoxidáció gátlására mitokondriális adaptációt vált ki és gátolja a ROS-mediált miokardium és endotél diszfunkciót. Azon paradigm, hogy a reaktív szabad gyökök túltermelésének gátlása konvencionális antioxidantánsokkal, mint például az E vitamin vagy katalitikus enzimek adása, mint a SOD és catalase, önmagában megelőzné a kardiovaszkuláris betegségeket nem igazolódott. Bár számos antioxidáns vegyületről beigazolódott, hogy kedvező hatással bír állatkísérletes modellekben, a nagy multicentrikus human vizsgálatokban elmaradtak a kedvező morbiditást és mortalitást javító hatások. Emiatt többi kutatások szükségesek hatékony antioxidáns anyagok azonosítására és hatásmechanizmusuk pontos tisztázására.

3. Célkitűzések

A vizsgálat két fő célkitűzéssel bírt (i) egy új, antioxidáns és PARP-inhibitor amidoxine derivát vegyület a BGP-15 hatásának vizsgálata imatinib-indukált kardiotoxicitásra állatkísérletes modellben (ii) a fizikai aktivitás endotél funkcióra és oxidatív stresszre kifejtett hatásának vizsgálata. Részletezve:

1. az imatinib indukálta kardiotoxicitás mechanizmusának tisztázása. Annak meghatározása, hogy ezeket a patofiziológiai eltéréseket a BGP-15 tudja-e befolyásolni, és ha igen, milyen mechanizmussal.
2. kimutatható-e energia depléció imatinib kezelés hatására Langendorff perfundált patkány szív modellben és a BGP-15 képes-e befolyásolni azt.
3. a lehetséges szignál útvonalak tisztázása, melyek az imatinid indukálta kardiotoxicitást közvetítik, különös tekintettel a JNK and p38 MAP kinase útvonalakra és annak vizsgálata, hogy a BGP-15 szuppresszálja-e a "halál" útvonalakat és aktiválja-e PI-3-kinase Akt útvonalat, mely protektív hatású lehet.
4. human klinikai vizsgálat során meghatározni az egyszeri maximális fizikai terhelés hatását az oxidatív stresszre, a plazma aszimmetrikus dimethylarginine szintjére, mely a NOS kompetitív inhibitora.
5. a fizikai tréning hatásának vizsgálata az artériás stiffnessre élsportolóknál

2. Experimental study

BGP-15, egy PARP-inhibitor, véd az imatinib-indukált kardiotoxicitás ellen, aktiválva az Akt-GSK-3 β útvonalat és szuppresszálja a JNK és p38 MAP kinase aktivációt.

2.1 Bevezetés

Az imatinib-mesylate (Gleevec), egy hatékony Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor, melyet sikeresen használnak az előrehaladott krónikus myeloid leukémia kezelésében. (CML) (Deninger et al 2005, Cohen et al 2002, Czechowska et al 2005) A Bcr-Abl komplex egy folyamatosan aktív tyrosine kinase a leukémiás sejtekben és számos szignál útvonalat aktivál, mint a mitogen-aktivált protein kináz (MAPK) és a foszfatidylinositol 3-kináz (PI3-K/Akt). A BCR-ABL komplex "túlélő" útvonalakat is aktivál a leukémiás sejtekben, mint a Jak-STAT és Grb2-ERK szignál útvonalakat (Van Etten 2004), melyek fokozott spontán és DNS-károsodás által indukált proliferációhoz vezetnek.

Bár az imatinid-indukált kardiotoxicitás detektálása a betegvizsgálaton és a kórtörténeten alapszik, az ok-okozati összefüggést bizonyító biomarker nem áll rendelkezésre. Egy összefoglaló közlemény, melyet Kerkela és munkatársai publikáltak (2006), azt mutatta, hogy az imatinibdel kezelt betegekben kialakuló szívelégtelenség modellezhető C57BL/6 egereken elhúzódó imatinib kezelést követően. A kardiotoxicitás alapvető mechanizmusának az endoplasmikus reticulum (ER) stressz válaszát, a mitokondriális membrán potenciál kollapsusát, cytochrome c kiáramlását, ATP depléciót és sejt halált tartották Kerkela et al (2006).

Az imatinib ocardiotoxicitását egyéb vizsgálatok is igazolták: 16 CML-ben és gastrointestinalis tumorban szenvedő imatinib kezelt betegben írtak le pangásos szívelégtelenséget (Park 2006), and strengthened the presumption of cardiotoxicity (Orphanos 2009).

In vitro kísérletekben két különböző mechanizmust feltételeztek, az egyik a caspase rendszer aktivációját, a másik a PARP-1 aktivációját igazolta, melyek egyaránt imatinib indukált apoptosist okoznak (Moehring 2005). BaF3BA sejtek caspase inhibitorral történő kezeléseönmagában nem volt elegendő az imatinib indukált apoptosis kivédésére, míg ha PARP-inhibitor PJ34-el együtt adták a caspase inhibitor jelentős citoprotekciót sikerült elérni (Moehring 2005). A patofiziológiás PARP-1 enzim aktiváció következményei szívizmsejtekben jól ismertek (Szabó 2005, Pacher 2007). A PARP-1 enzim fokozott expressziója a sejten belül rapid NAD⁺ and ATP raktár depéciótés mitokondriális diszfunkciót okoz és a PI-3-kinase-Akt útvonal szupresszióját idézi elő, együttesen nekrotikus vagy apoptotikus sejthalálhoz vezetnek. A mitokondriális diszfunkciótovábbi energia depléciót okozás fokozza a mitokondriális ROS termelést ami lipid peroxidációban, protein oxidációban és DNS károsodásban manifesztálódik.. Korábbi vizsgálatok igazolták a BGP-15 kedvező hatását az oxidative stresszre (Halmosi 2001, Szabados 2002). BGP-15 is a nicotin amidoxime derivate melyet elsődlegesen insulin resistanceia kezelésére fejlesztettek ki. A BGP-15 egy potens insulin érzékenyítő (Literáti-Nagy B 2009). Korábbi vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy a BGP-15 több támadáspontú vegyület mely képes a PARP-1 enzim aktivációját gátolni és védeni a mitokondriumot az oxidative károsodástól ischemia-reperfúziós Langendorff patkány szív modelben (Halmosi 2001, Szabados 2002). Vizsgálatunk alapvető célja az volt, hogyLangendorf perfúziós patkány szív modellben azonosítsuuk azokat a mechanizmusokat, melyek útján az imatinib kardiotoxicitást képes indukálni. Emellett arra kerestük a választ, hogy a PARP inhibitor és antioxidáns BGP-15 képes-e ezeket a folyamatokat befolyásolni. Vizsgáltuk az imatinib és a BGP-15 hatását az energia metabolizmusra és tanulmányoztuk a lehetséges szignál útvonalak aktivációját, melyek a kardiotoxicitásért felelősek, valamint a BGP-15 hatását ezekre a jelátviteli útvonalakra.

2.2 Anyagok és módszer

Kísérleti állatok

Hím, Wistar 300-350 grammos patkányoka használtunk a vizsgálatban. A vizsgálat során a laboratóriumi állatokra vonatkozó Magyar és amerikai standardokat és irányelveket tartottuk be.(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Szív perfúzió

Retrográd aorta perfúziót alkalmaztunk módosított foszfátmentes Krebs–Henseleit (KH) pufferrel. Egy 10 perces recirkuláció mentes wash-out periódus után az izolált patkány szíveket 60 percig perfunkdáltuk. A Krebs perfúziós oldathoz imatinib és/vagy BGP-15

hozzáadásával perfundáltunk. A perfundált szíveket 4 különböző csoportba osztva, csoportonként 10 szívet perfundáltunk. 1. normoxia csoport, (kontrollok), 2. normoxiás perfúzió, BGP-15 hozzáadásával, 3. normoxiás perfúzió imatinib hozzáadásával 4. normoxiás perfúzió BGP-15 és imatinib együttes adásával. A perfúziót követően a patkány szíveket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk.

NMR spectroscopia és adat elemzés

A szív energia metabolizmusát vizsgáltuk *in situ* a perfúzió során ^{31}P NMR spectroscopia segítségével, mellyel a creatine phosphate, ATP és anorganikus phosphate mennyiségét határoztuk meg ($\delta = 0.0$ ppm). Az NMR spektrumokat egy Varian ^{UNITY} INOVA 400 WB spektrométerrel regisztráltuk (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). A spektrumokat 3 percenként gyűjtöttük. A különböző P tartalmú vegyületek relative koncentrációja a görbe alatti terület analízisével volt számítható. A különböző metabolitok mennyiségét minden spektrumban a kiindulási creatine phosphate (PCr) mennyiségéhez viszonyított hányadosában határoztuk meg.

Lipid peroxidation

A thiobarbiturat-sav reaktív szubsztátok (TBARs) meghatározása a gyorsfagyasztott szív mintákban a módosított Serbinova (1989.) által leírt protokoll alapján történt.

Protein oxidáció

50 mg gyorsfagyasztott szív minta homogenizálását végeztük el 2 ml 10% trichloroacetát savval (TCA). A fehérjék carbonyl tartalmának kimutatása használva 2,4-dinitrophenyl-hydrazine-tesztet használtuk (Butterfield 1997).

Western blot analízis

A különböző fehérjék szétválasztása 12%-os SDS-polyacrylamide gél elektroforézissel történt majd nitrocellulose membránra vittük át. Blokkolás után (2 h 3% tejben, Tris-pufferben) a membránokat egy éjszakára 4°C -on antitesttel inkubáltuk (1:1000 hígításban) a következő antigének jelölésére: GAPDH, pAkt, pGSK-3 β , pERK $_{1/2}$, pp38, pJNK és anti-PARP. A bandek intenzitásának mérése (E_{540}) DU-62 spectrophotometerrel történt (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) és ImageJ software felhasználásával. Az adatok 3 különböző reprezentatív mintából származnak és a nem kezelt kontrolhoz viszonyítva adtuk meg. (mean \pm S.E.M.).

2.3. Eredmények

A creatine phosphate szint a nem kezelt Langendorff perfundált patkány modellben enyhe csökkenést mutatott 60 perces perfúzió alatt. 20 mg/l imatinib hozzáadásával végzett perfúzió során a creatine phosphate szint 18%-kal csökkent a nem kezelt csoporthoz képest. Az imatinib és BGP-15 együttes alkalmazása mellett beigazolódott, hogy a BGP-15 200 mg/l koncentrációban képes kivédeni az imatinib indukálta PCr csökkenést. A BGP-15 önmagában

alkalmazva a normoxiás szint fölé emelte a PCr szintet (Fig.1.). Az ATP szint változások párhuzamosan követték a creatine phosphate szintekben talott változásokat. Az imatinib kezelt szívek szignifikáns ATP szint csökkenést mutattak, míg a BGP-15sikeresen kivédte ezt a hatást. Önmagában a BGP-15 nem okozott szignifikáns változást az ATP szintben a control csoporthoz képest (Fig.2.). Az anorganikus phosphate szint mérsékelt emelkedést mutatott perfúzió során, nomoxia alatt ez a kiindulási PCr szint 15-20%-át érte el 30 perc után.

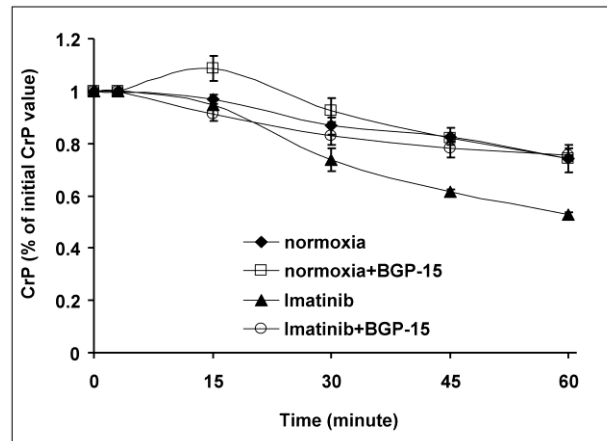


Fig.1. BGP-15 és/vagy Imatinib hatása a szív creatine phosphate szintjére Langendorff perfúziós modelbenpatkány szívben. ^{31}P NMR spectroscópia segítségével mért *in situ* creatine phosphate szintek melyeket a kiindulási creatine phosphate szinthez viszonyított hányadosuk függvényében adtunk meg. *means* \pm SEM. ($p < 0.01$)

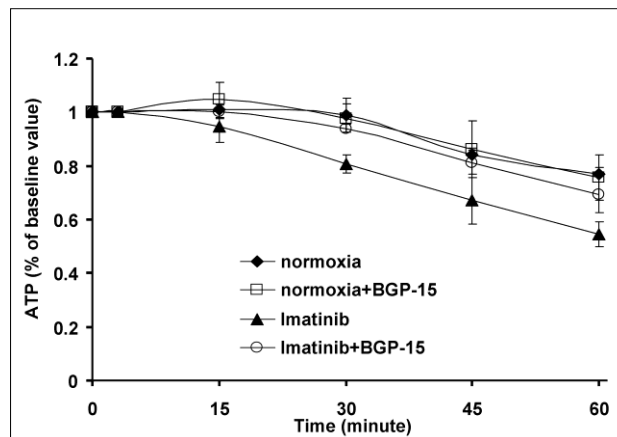


Fig.2. A BGP-15 és/vagy Imatinib hatás az ATP szintre Langendorff perfundált patkány szívben. ^{31}P NMR spectroscopia során mért ATP szinteket a kiindulási ATP szint hányadosaként ábrázoljuk. Az értékek átlagot és \pm SEM. -et ábrázolnak. ($p < 0.01$)

1 órás perfúziót követően a fagyasztott szív mintákból lipid peroxidáció meghatározás történt. Az eredmények azt mutatták, hogy az imatinib szignifikánsan ($p < 0.01$) emelte a thiobarbiturát reaktív szubsztátok (TBARS) képződését a nem kezelt csoporthoz viszonyítva. Másrésztől

BGP-15 jelenlétében a TBARS mennyisége szignifikánsan csökkent. Önmagában a BGP-15 nem befolyásolta a TBARS képződését (Fig.3.). A protein oxidáció tekintetében azt találtuk, hogy az imatinib markánsan megemeli a proteinhez kötött aldehide csoportok mennyiségét a nem kezelt csoporthoz képest. Ez az effektus szignifikánsan gátolható volt ($p < 0.01$) az imatinib és BGP-15 együttes adásával. . Önmagában a BGP-15 nem fejtett ki szignifikáns hatást a protein oxidáció mértékén (Fig. 4).

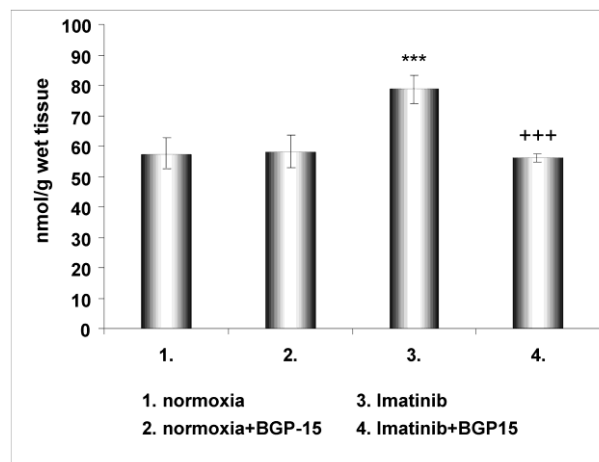


Fig.3. A BGP-15 hatása az imatinib-indukált lipid peroxidációra Langendorff perfundált patkány szíven. Az ábra a thiobarbiturát reaktív szubsztátok mennyiségét mutatja a különböző csoportokban. Az értékeket átlag \pm SEM-ben ábrázoltuk. (***) $p < 0.001$ a normoxiás értékekhez viszonyítva
+++ $p < 0.001$ az imatinib kezelt csoporthoz viszonyítva).

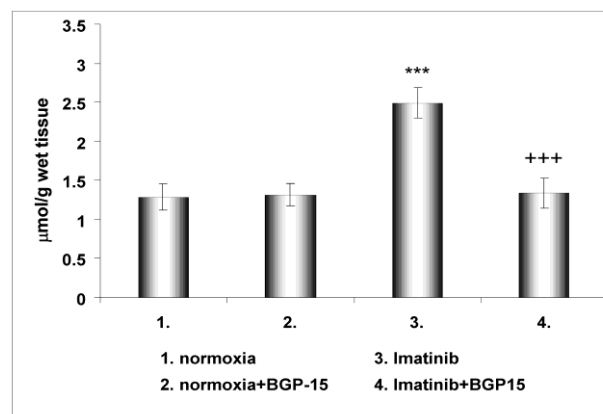
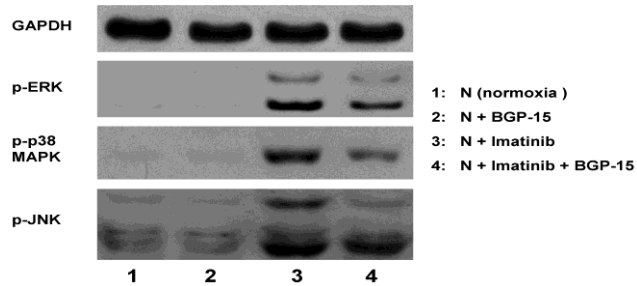


Fig.4. A BGP-15 hatása az imatinib-indukált protein oxidációra Langendorff perfundált patkány szíven. Az ábra a protein carbonyl mennyiségeket mutatja a különböző csoportokban. Az értékeket átlag \pm SEM-ben adtuk meg. (***) $p < 0.001$ a normoxiás csoporthoz hasonlítva, +++ $p < 0.001$ az imatinib kezelt csoporthoz viszonyítva).

Az Akt, GSK-3 β , ERK, JNK and p38-MAPK foszforilációt Western blot analízissel vizsgáltuk a következő csoportokban: kezelés nélküli (normoxia) (1), BGP-15 kezelt (2), imatinib (3) és imatinib+BGP-15 (4). Az imatinib MAP kinázok (ERK1/2, p38 and JNK)

aktivációját okozza. A JNK és p38 MAP kináz szerepet játszanak a sejthalálban (Baines 2005), and inflammatory reactions (Gil 2007) így kulcsfontosságúak lehetnek az imatinib indukálta kardiotoxicitásban. BGP-15 szuppresszálta az imatinib indukálta JNK és p38 MAP kináz aktivációt, és a BGP-15 ezen hatása szignifikáns módon protective lehet (Fig.5).

A.



B.

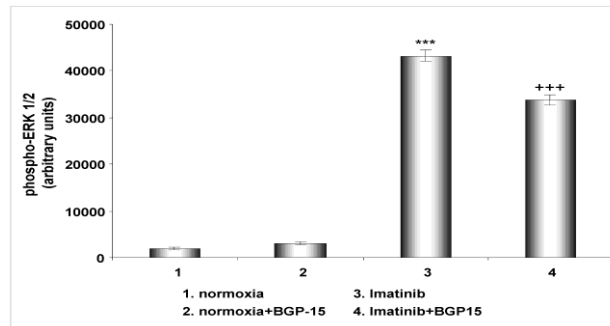
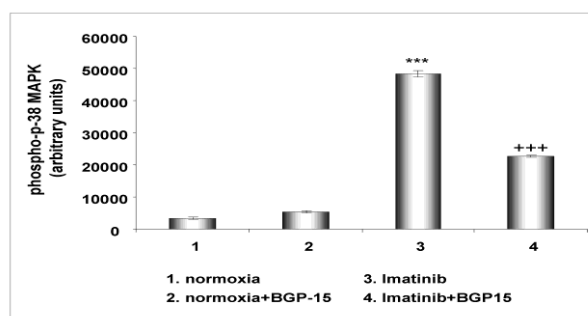


Fig.5. ERK, JNK and p38-MAPK foszforiláció Langendorff perfundált (60 min) patkány szívben normoxia alatt, BGP-15kezelés, imatinibkezelés és BGP-15+imatinib kezelés során.

A: Reprezentatív Western blot analízis ERK, JNK, p38-MAP foszforiláció és denzitometriai analízis, .B: p-ERK

C.



D.

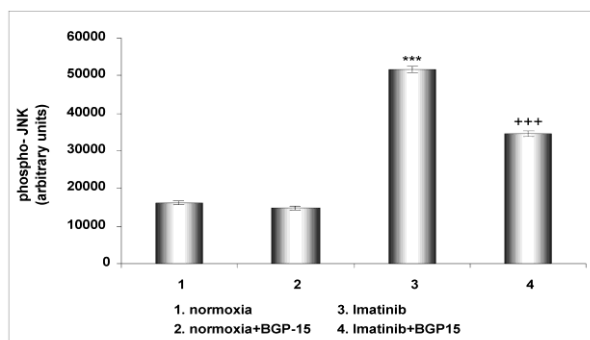
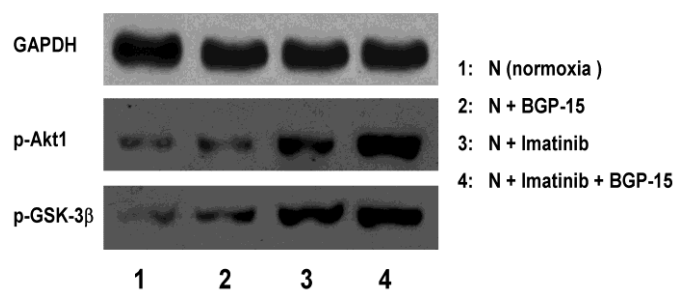


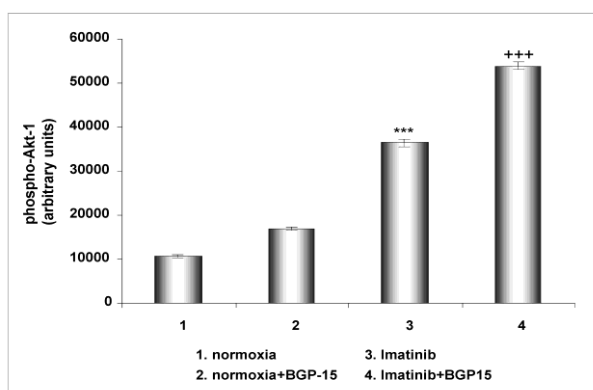
Fig.5 C: p38-MAPK aktiváció denzitometriás meghatározása és D: p-JNK aktiváció denzitometriás meghatározása: az értékeket átlag \pm SEM-ben adtuk meg. (***) $p < 0.001$ normoxiához viszonyítva, (+++) $p < 0.001$ imatinib kezelt csoporthoz viszonyítva).

Az imatinib Akt and GSK-3 β aktivációt indukál, BGP-15 ezt tovább fokozza (Fig.6). Az Akt foszforilációja és aktivációja a miokardiumban protektív hatással bír stressz szituációkban melyek a mitokondriális membrán integritását érintik (Tapodi 2005) és a GSK-3 β foszforilációját és inaktivációját (Liang 2003).

A.



B.



C.

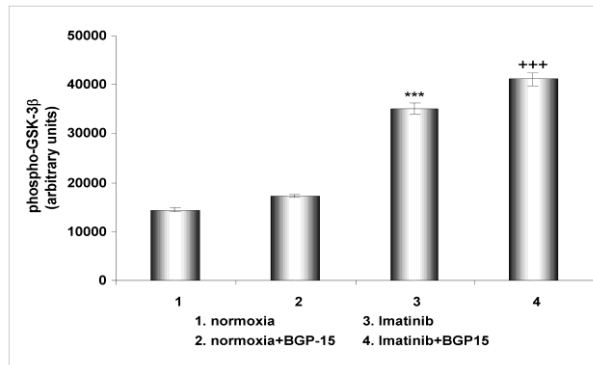
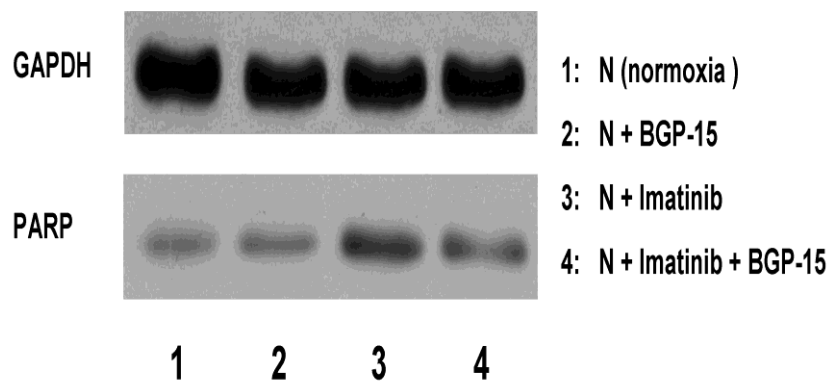


Fig.6. Akt1 és GSK-3 β foszforiláció Langendorff perfundált (60 min) patkány szívben normoxia alatt és BGP-15 kezelés, imatinib kezelés és BGP-15 +imatinib kezelés alatt.

A: p-Akt1 és p-GSK-3 β foszforiláció reprezentatív Western blot analízise és denzitometriás mérések B: p-Akt1 and C: p-Gsk3béta. Az értékeket átlag \pm SEM-ben adjuk meg. (***) $p < 0.001$ normoxiás csoporthoz viszonyítva, +++ $p < 0.001$ imatinib kezelt csoporthoz viszonyítva).

Az egy órás imatinib kezelés jelentős PARP-1 aktivációt okoz. A BGP-15 önmagában alkalmazva nem befolyásolta a PARP aktivációt, de imatinibbel együtt adva szignifikánsan kivédte az imatinib indukált PARP-1 aktivációt (Fig.7).

A.



B.

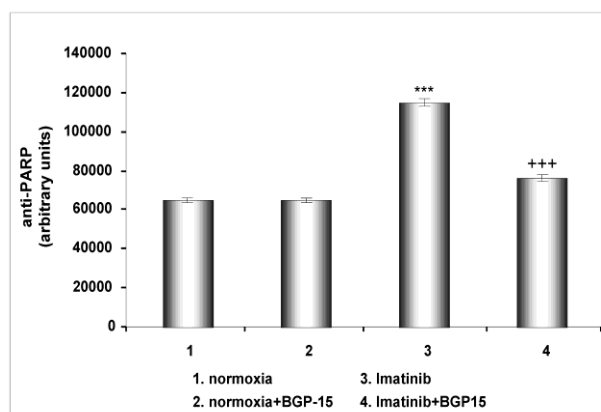


Fig.7. BGP-15 hatása az imatinib-indukált PARP-1 aktivációra normoxia során, BGP-15 kezelés után, imatinib kezelést, és BGP-15+imatinib kezelést követően. PARP reprezentatív Western blot analízise (A.) és denzitometriás mérés eredménye (B.). Az értékeket átlag \pm SEM-ben adtuk meg (*** $p < 0.001$ a nem kezelt csoporthoz viszonyítva, +++ $p < 0.001$ az imatinib csoporthoz viszonyítva).

2.4 Diskusszió

Jelen vizsgálatunk összefoglalja a BGP-15 hatásait az imatinib indukálta energia-depléció, oxidatív károsodás és a különböző szignál útvonalakra kifejtett hatását Langendorff perfundált patkány szív modelben. A BGP-15 egy nicotinic amidoxime derivátum, mely eredendően insulin rezisztencia kezelésére fejlesztettek ki. Korábbi vizsgálatok, melyek a BGP-15 hatásait elemezték, igazolták, hogy a BGP-15 több támadásponttal bíró vegyület, kardioprotektív hatású ischemia-reperfúziós károsodás során és hatékony gátlója a PARP-1 enzim fokozott aktivációjának, stabilizálja a mitokondriumokat és gátolja a mitokondriumok fokozott ROS termelését. (Halmosi et al 2001, Toth et al 2010, Kovacs et al 2004). Ezen túlmenően igazolódott hepatoprotektív (Nagy et al 2010), nephroprotektív (Rácz et al 2002) és neuroprotektív (Bárdos et al 2003) hatása is. Jelenleg egyik legfontosabb hatásának insulin sensitizer tulajdonságát tartják (Literáti-Nagy2003, 2010).

Korábbi vizsgálatok, melyek myocardium sejt kultúrán történtek, azt mutatták, hogy az imatinib kezelés a mitokondriális membrán potenciál kollapsusát idézi elő és végső soron a membrán integritás elvesztését okozza. (Kerkela et al 2006). A mitokondriális membrán potenciál csökkenése kulcsszerepet játszik a kardiotoxicitás kialakulásában (Van Etten 2004). Korábbi vizsgálatok egyértelműen kimutatták a mitokondriumok strukturális károsodását imatinib kezelést követően mind human szövettani mintákban mind állatkísérletes modellekben. A mitokondriális funkció károsodása és az AP depléció közötti szoros összefüggés szintén jól ismert. Egy gyakran használt citosztatikum a Herceptin 35% -os ATP szint csökkenést okoz a myocardiumban, míg az imatinib 65%-os ATP szint csökkenést eredményez. Az ATP szint csökkenés számos sejt folyamatot befolyásol. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy mind a nekrotikus mind az apoptotikus sejthalál jelen van myocardium sejt kultúrákban. Ez a tény azt mutatja, hogy az apoptózis ATP igényes folyamat. Jelen vizsgálatunk először mutatta ki, hogy imatinib kezelés mellett energia-depléció alakul ki perfundált Langendorff patkány szív modelben. ^{31}P NMR spectroscopia segítségével szignifikáns ATP és creatine-phosphate depléciót tudunk kimutatni perfundált patkány szívben *in situ*. A hosszú távú imatinib kezelés során kialakuló energia depléció jól ismert korábbi tanulmányokból. Az imatinib tartalmú perfúziós oldattal történő kezelés egy új aspektusra világított rá, hogy egy relatív gyors energia szint csökkenés alakul ki. Ezek alapján feltételezhető, hogy nemcsak a tartós, hanem a rövid távú imatinib kezelés is károsíthatja az energia igényes celluláris folyamatokat. Az energia depléció befolyásolhatja a myocardium funkciót és következményes kompenzatórikus remodellinget és szívelégtelenséget okozhat. (Pálfi 2006). Az ATP-depléció károsíthatja az ion csatornák működését és ezzel növelheti az intracelluláris szabad calcium szintjét. Az emelkedett mennyiségű szabad calcium a cytoplasmában növeli a calcium szintet a mitokondriumokban és ezzel fokozza a mitokondriális permeabilis pórusok kialakulását és következményes excesszív ROS termelést indukálnak (Murphy 2006). A mitokondriális károsodás apoptotikus

útvonalakat aktiválnak ami myocardium vesztést eredményez a károsodott régióban (Subramanian et al 2010). A fokozott ROS termelés és az ion szint eltérések a plazma membrán rupturájához és nekrotikus sejthalálhoz vezet. a BGP-15 védi a mitokondriális membrán rendszert az oxidative stress ellen (Nagy 2010). A BGP-15 ezen hatása létfontosságú lehet a szívben mivel a mitokondriális energiatermelés predomináns (Balaban 2009), és a mitokondriális membrán rendszer védelme csakúgy, mint a megfelelő membrán potenciál előfeltétele az aktív mitokondriális ATP képződésnek. Különböző stressz mechanizmusok esetén a BGP-15 csökkenteni képes az oxidative károsodást és szignifikáns mitokondrium védő hatással bír (Halmosi et al 2001, Szabados 2002, Nagy 2010), regarding ezáltal véd a mitokondrium függő apoptosissal szemben is (Hori 2009). Saját eredményeink azt mutatják, hogy az imatinib szignifikáns oxidative károsodást okoz a szívben (Fig. 4 és 5), és ez kivédhető BGP-15-tel és ez az effektus jó egyezést mutat az ischemia-reperfúziós károsodás során észleltekkkel (Halmosi et al 2001, Szabados 2002, Nagy 2010).

Kerkala vizsgálatai igazolták, hogy sejtkultúrában imatinib kezelés endoplasmaticus reticulum (ER) stressz választ okoz, mitokondriális membrán potenciál csökkenés jön létre, cytochrome c áramlik ki a cytosolba, ATPdepléción alakul ki. A mi perfundált szív modellünkben oxidative károsodás, ATP depléción és az imatinib kezelés hatása a sejthalálhoz vezető útvonalakraon volt észlelhető (Fig.1-6). Az imatinib kezelés hatására kialakuló JNK és p38 MAP kináz aktiváció szignifikáns szerepet játszhat a mitokondrium depolarizációjában és a mitokondrium függő apoptosis elindításában (Duplain 2006). A p38 és Akt aktiváció szerepe a kardiotoxikus hatásban ellentmondásos, mivel ezek a szignál út vonalak más vizsgálatokban nem mutattak aktivációt (pl. Kerkela 2006). Ez az ellentmondás adódhat a különböző model rendszerekből. Egy további lehetséges magyarázat, hogy az alkalmazott imatinib dózis magasabb volt mint a korábbi vizsgálatok során, így ez direct toxikus hatást jelezhet. Bár az Akt aktiváció teoretikusan magyarázható, mivel az excesszív ROS termelés inaktíválja az intracelluláris PTEN-t mely normálisan gátolja a PI3-kinase-Aktútvonalat. Így a PTEN gátlása aktiválhatja az Akt útvonalat. Saját modellünkben a p38 útvonal aktivációját láttuk. Korábbi vizsgálatok világosan mutatták, hogy az imatinib kezelés ER stressz választ okoz ami JNK and p38 aktiváció fokozódását eredményezi az IRE1-ASK1 útvonalon keresztül. Imatinib indukálta oxidatív stressz oxidálja az Ask1 inhibitor thioredoxint mely aktiválja az Ask1 kinázt, mely a kaskádát elindítva aktiválja a JNK-t és a p38 MAP kinázt (Matsuzawa 2008). Ezen szignál mechanizmusok modulációjával az imatinib indukálta kardiotoxikus hatás kivédhető. Ebben a tanulmányban igazoltuk, hogy a BGP-15 képes védelmet adni az imatinib indukálta JNK és p38 MAP kináz aktivációval szemben, véd az oxidative stressz ellen és az ATP depléción ellen (Fig.2. 4-6). A BGP-15 protektív hatása valószínűleg mitokondrium protektív hatásának következménye, mivel korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy nincs hatása az ER stressz válaszra (Nagy 2010), Emellett azt is igazoltuk, hogy a BGP-15 Akt aktivációt okoz, mely egy jól ismert protektív útvonal. Az Akt aktiváció véd a mitokondriális membrán károsodás ellen oxidative stressz során (Tapodi 2005), mely egy újabb bizonyíték a BGP-15 mitokondrium protektív hatása mellett.

Imatinib kezelés során rapid poly(ADP-ribosyl)áció indul be (PAR), mely mitokondriális membrán integritás elvesztését és DNS fragmentációt okoz. Azt is fontos megjegyezni, hogy a PAR gátlása imatinib kezelt sejteken részlegesen kivédi a sejthalált, mely a caspase rendszer

gátlásával egyenértékűnek bizonyult (Moehring 2005). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a BGP-15 oxidatív stressz során szupresszálja a sejtmagban a poly-ADP-ribosylációt. Jelen vizsgálatunk megerősítette azt a korábbi felvetést, hogy az imatinib kezelés PARP aktivációt képes indukálni. Továbbá azt is bemutattuk, hogy a BGP-15 kivédte a PARP aktivációt és annak cardiotoxikus hatását *in situ*.

Az imatinib indukálta kardiotoxicitás főbb mechanizmusait és a BGP-15 lehetséges protektív hatásainak összefüggéseit mutatjuk be (Fig.8).

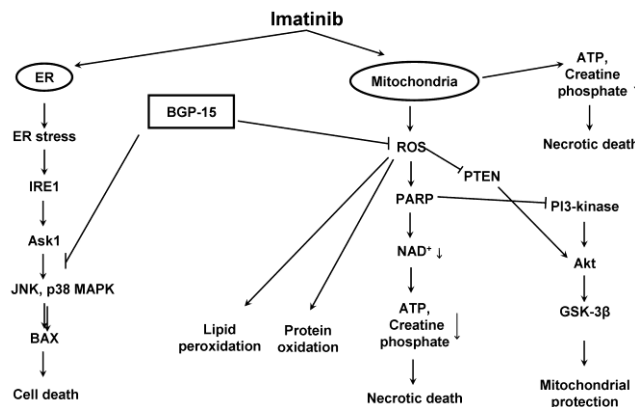


Fig.8. Az imatinib-indukálta sejthalál lehetséges mechanizmusai és a BGP-15 protektív hatásának regulációja. Az imatinib ER stresszt indukál, mely aktiválja az IRE1-Ask1 útvonalat és további JNK és p38 MAPK aktivációt okoz. A BAX aktiválódása és önmagában az imatinib mitokondriális membrán depolarizációhoz, ATP deplecióhoz, cytochrome c (Cyt c) kibocsátáshoz, következményes nekrotikus és apoptotikus sejthalálhoz vezet. A mitokondriális károsodás során excesszív ROS képződés és PARP-1 aktiváció jön létre, mely NAD^+ és ATP depleciót okoz, mely végül is nekrotizist okoz. Emellett a ROS-indukált PTEN inaktiváció aktiválni képes a PI3-Akt útvonalat is. A PARP-1 aktiváció gátlása véd a NAD^+ depleció ellen, mitokondrium protektív és végső soron a sejt túlélését okozza.

3. Klinikai vizsgálat

A fizikai aktivitás hatása a vaszkuláris regzlációra, oxidatív stresszre, ADMA sinter és az artériás stiffnessre.

3.1 Bevezetés

A kardiovaszkuláris rizikófaktorok között az egyik legfontosabb az artériás stiffness és az endotél diszfunkció. A reguláris közepes intenzitású fizikai tréning alacsonyabb kardiovaszkuláris rizikót eredményez középkorúakban és idősokban egyaránt (Blair 1989, Manson 2002, Mora 2007). A kedvező hatás pontos háttere nem ismert teljes mértékben. Korábbi vizsgálatok a fizikai tréning különböző hatásait igazolták az artériás stiffnessre, oxidatív stresszre és az endotél funkcióra. .

Az oxidatív stresszt ma úgy definiáljuk, mint a ROS termelés és az antioxidáns defense egyensúlyának megbomlását és ez az egyik legfontosabb patofiziológiai lépés az endotél diszfunkció felé. A szuperoxid gyök reakcióba lép az endoteliális NO-synthase által képzett nitrogén monoxiddal, peroxynitritet képez, mely a NO inaktivációját okozza,

csökkenti a NO biohasznosulását és kikapcsolja a NO-synthaset. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az oxidatív stressz fokozott NADPH oxidase aktivitással társul, fokozott ROS termeléssel és eNOS inaktivációval jár. Másrészt az eNOS aktivitás jelentősen függ az a plazma aszimmetrikus dimetyl-arginine szintjétől, mely kompetitív inhibitora az eNOS-nak.

Az aszimmetrikus dimetylarginine (ADMA) is a metylatedegy metylált arginine analóg, mely a proteolysis során képződik. Az ADMA emelkedett plazma szintje endotél diszfunkciót okoz. Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy az emelkedett plazma ADMA szint rizikófaktora számos kardiovaszkuláris betegségnek, mint hypertonia, diabetes mellitus, perifériás érbetegség, coronaria-betegség pre-eclampsia vagy a vesebetegségek.

Az ADMA termelődése növekszik az életkorral és plazma szintje összefüggést mutat a bontó enzimek aktivitásával (dimetyarginin dimetilaminohidrolase). Az ADMA direkt módon összefüggést mutat az atherosclerosis patogenezisével az oxidatív stressz és anitrogén monoxide biohasznosulásának gátlása révén. Más korábbi vizsgálatok igazolták az ADMA és a rennin-angiotensin rendszer közötti kapcsolatot. Az ADMA fokozni képes a superoxide termelést az angiotensin-II–NADP(H) oxidase aktiválásán keresztül. (Veresh et al 2008).

A fizikai tréning hatását az endotél funkcióra és az oxidatív stresszre széles körben tanulmányozták az elmúlt két évtizedben. Számos tanulmány kimutatta, hogy a periodikus közepes intenzitású fizikai tréning kedvező hatást gyakorol a plazma ADMA szintre. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy a tartós tréning csökkenti az ADMA plazma szintjét ischemiás szívbetegségben (Richter 2005), II. típusú diabetes mellitusban és metabolikus szindrómában (Mittermayer 2005, Gomes 2008). Ez a hatás nem bizonyult tartósnak, ha a betegek felfüggesztették a rendszeres fizikai tréninget. Néhány korábbi vizsgálat rávilágított arra, hogy a fizikai állóképesség negatívan korrelál az oxidatív stressz mértékét jelző lipid peroxidációval, DNS károsodással és fehérje oxidációval posztmenopauzális nőkben. Emellett magasabb volt az antioxidáns enzimek (catalase és glutathione peroxidase) az edzettebb csoportban és pozitív korrelációt találtak a glutathione peroxidase és az edzettség szintet mutató paraméterek között (VO₂max, MET). Ezek az eredmények megerősítik azt a korábbi feltevést, hogy a rendszeres fizikai tréning emeli az antioxidáns kapacitást.

Az egyszeri "aku" fizikai terhelés prompt szabad gyök termelést generál, melynek 3 forrása van. 1. gyors catekolamin termelést vált ki, melyek metabolizmusa szabad gyököket generál 2. a laktát termelődése serkenti a szuperoxid gyök hydroxyl gyökké konvertálódását, 3. gyulladási válaszreakció alakul ki az izom sérülésre.

A szabad gyök fogó antioxidáns kapacitás nagymértékben függ a diétás beviteltől és az endogen antioxidáns képződéstől valamint a repetitív fizikai terheléstől, mely fokozza az antioxidáns defense-t (Dékány 2006). A fizikai terhelhetőséget jól jellemző VO₂max fordított korrelációt mutatott a protein és lipid peroxidáció mértékével. (MDA, 8OHdG). (Pialoux 2009)

Az artériás stiffness a kardiovaszkuláris rizikó független prediktora. Ezt bizonyította többek között az emelkedett augmentációs index és a koronária betegség között talált szignifikáns összefüggés is (Agabiti-Rosei 2007). A centrális nyomás és a kardiovaszkuláris rizikó közötti összefüggés nemcsak koronária betegekben igazolódott, hanem egészségesnek vélt egyéneknél is. A centrális nyomás görbén észlelhető késői augmentáció pozitív korrelációt mutatott a bal kamrai izomtömeg indextől és ez független volt a kortól és a vérnyomástól (Agabiti-Rosei 2009). Néhány tanulmány vizsgálta a fizikai tréning hatását az

artériás stiffnessre fiatal egészséges atlétákban és rekreációs jellegű sportot végzőkben valamint koronária betegekben. Az augmentációs index alacsonyabb volt azoknál az atlétáknál, akik magasabb edzettségi szinttel rendelkeztek, hosszabb ideig, nagyobb intenzitással vagy nagyobb gyakorisággal edzettek, mint a rekreációs jellegű kisebb intenzitású sportot űzőknél. (Edwards 2005)

Koronária betegekben 12 hetes edzésprogramot követően az augmentációs index szignifikáns csökkenését észlelték (Edwards 2004). Egy másik vizsgálatban ahol 6 napos fizikai tréninget követően vizsgáltak egészséges egyéneket, meglepő módon nem találtak szignifikáns az augmentációs indexben, a vaszkuláris rezisztenciában, a frekvenciavariabilitásban és a maximális oxygen fogyasztásban sem. Ezzel szemben a pulzus hullám terjedési sebesség szignifikánsan csökkent.

A korábbi adatok a rendszeres fizikai tréning hatását mutatták az artériás stiffnessre és kevés információ van az egyszeri maximális fizikai erő kifejtés okozta vaszkuláris hatásokkal kapcsolatban. Maraton futókat vizsgáltak verseny előtt és után és azt találták, hogy szignifikáns változás alakult ki a visszavert hullámokban, de az artériás stiffness nem változott. Egészséges kontrolokhoz viszonyítva azonban a marathont futók artériás stiffnesse és vérnyomása magasabb volt, míg reflexiós indexeik nem különböztek (Vlachopoulos 2010). A marathont futás egy extrém terhelést jelent az atléták számára. Tisztázatlan maradt az a kérdés, hogy szokványos intenzitású "akut" fizikai terhelés milyen hatással van az artériás stiffnessre és az oxidatív stresszre.

Saját vizsgálatunk célja az volt, hogy jól edzett sportolóknál az egyszeri maximális fizikai terhelés hatását elemezzük az oxidatív stresszre, az endotél funkciót jelentősen befolyásoló aszimmetrikus dimetilarginin szintre és az artériás stiffnessre.

5.2 Páciensek és módszerek

5.2.1 Páciensek

21 jól edzett fiatal férfi atlétát vontunk be a vizsgálatba (átlag életkor 22.4 y ±3.4 év). A bevont sportolóknál 12 elvezetéses EKG, echocardiographia készült, melyek nem mutattak patológiás eltérést. Gyógyszeres terápiában nem részesültek a vizsgálat időpontjában

3.2 Kísérleti protokoll

Tünet-limitált tredmilt spiroergometriát (CASE 6.5, spirométer LF-8 system) végeztünk Bruce protocol alapján, mely a terhelési szinteket 3 percenként emelte. A vitális paraméterek, vérnyomás, 12 elvezetéses EKG folyamatos monitorozása mellett történt a terhelés a szakmai protokolloknak megfelelően. Az oxygen felvétel, szén-dioxid kibocsátás, ventilációs paraméterek mérése történt nyugalomban és terhelés során. Meghatároztuk a maximális oxygen fogyasztást (VO₂max), a maximális teljesítményt (MET) és az anerob tresholdot (AT).

Arteriograph (TensioMed Kft., Budapest, Hungary,) felhasználásával mértük az augmentációs indexet és a pulzus hullám terjedési sebességét terhelés előtt és után. a recovery

fázisban. A méréseket fekvő helyzetben végeztük el és akkor tekintettük hitelesnek, ha a PWV mérés során a beat to beat értékek szórása nem haladta meg a 1.1 m/s).

A vizsgálat során vérvétel történt a terhelés előtt, közvetlenül a terhelés csúcsa után a recovery fázis első percében és a terhelés után négy órával. A vérmintákat centrifugáltuk, a szérumot leválasztottuk és fagyasztottuk. Szérum ADMA, SDMA, arginine szintek meghatározását végeztük el minden mintából. A lipid peroxidáció jellemzésére Oxystat ELISA módszerrel határoztuk meg az oxidált LDL mennyiségét a vérmintákat a terhelés után 2 órával vettük le figyelembe véve a lipid peroxidáció propagációs fázisát. Az Oxystat assay normál tartománya 0-400 $\mu\text{mol/l}$ között volt.

Egy-mintás t-próbát alkalmaztunk a terhelés előtti és utáni oxidatív stressz markerek, szérum ADMA, augmentációs index pulzus hullám terjedési sebességek összevetésére. Pearson korrelációs együttható meghatározást végeztünk. A statisztikai analízis SPSS (version 15.0, SPSS Inc.) szoftverrel történt.

3.3 Eredmények

A terhelés során a sportolók magas $\text{Vo}_{2\text{max}}$, MET és anaerob treshold szinteket értek el, mely bizonyította kiváló edzettségi állapotukat. A szérum arginine szint ($70,77 \pm 27,002$ versus $74,96 \pm 22,97 \mu\text{mol/l}$), a szérum ADMA ($0,79 \pm 0,15$ versus $0,73 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$) és a SDMA szintek ($0,58 \pm 0,12$ versus $0,57 \pm 0,10 \mu\text{mol/l}$) tekintetében nem láttunk szignifikáns különbséget a terhelés előtti és utáni értékekben (Fig.9, 10, 11). Az oxidatív stressz választ az oxidált LDL szintjének meghatározásával vizsgáltuk. Az Oxystat assay adatai alapján nem volt szignifikáns különbség a terhelés előtti és 2 órával a terhelés után mért ox.LDL szintekben ($260,76 \pm 40,50$ versus $267,08 \pm 68,02 \mu\text{mol/l}$) (Fig.12.).

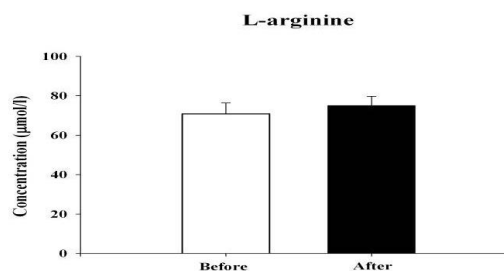


Fig. 9. Szérum arginin ($70,77 \pm 27,00$ versus $74,96 \pm 22,97 \mu\text{mol/l}$) szintek terhelés előtt és után. Szignifikáns különbség nem igazolódott. $p < 0,49$

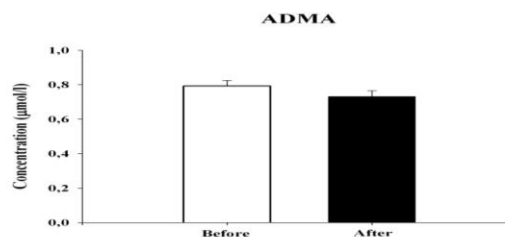


Fig. 10. Szérum ADMA átlagok és SEM, $0,79 \pm 0,15$ versus $0,731 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/l}$. Szignifikáns különbség nem volt a terhelés előtti és utáni értékek között. $p < 0,13$.

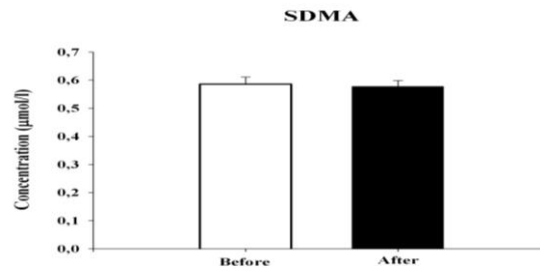


Fig. 11. SDMA átlagok és SEM, $0,58 \pm 0,12$ versus $0,57 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/l}$, a különbség nem volt szignifikáns. $p < 0,57$

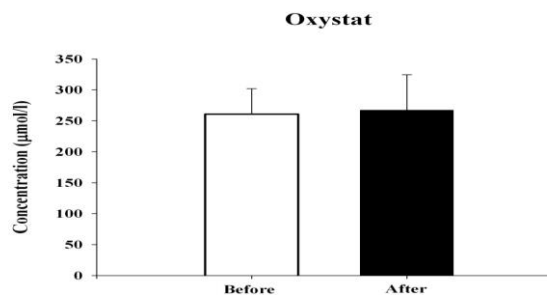


Fig. 12. Oxidált LDL átlagok és SEM ($260,76 \pm 40,50$ versus $267,08 \pm 68,02$ $\mu\text{mol/l}$) a terhelést követően nem alakult ki szignifikáns ox. LDL szint emelkedés. $p < 0,43$

Az augmentációs index egy komplex kompozit érték, mely számos dinamikus értéktől függ, mint például a PWV, kamrai kontraktilitás és a kiserek rezisztenciája. Mind a terhelés előtti, mind utáni augmentációs index értékek a normál tartományban voltak. Az augmentációs index értékek szignifikánsan csökkentek a terhelés után a terhelés előtti értékekhez képest ($-50,92 \pm 16,43$ versus $-70,13 \pm 8,589$ $p < 0,001$) (Fig.13.) A PWV értékek szignifikánsan nem különböztek. ($6,49 \pm 1,001$ versus $6,27 \pm 1,037$ $p < 0,48$) és a normál tartományban voltak. (Fig.14.)

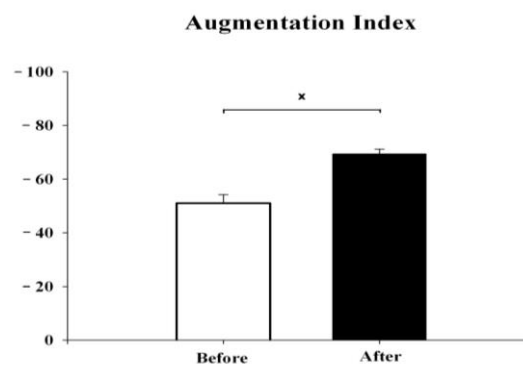


Fig. 13. Az augmentációs index szignifikánsan csökkent a terhelés után a terhelés előtti értékekhez viszonyítva. $-50,9211 \pm 16,43041$ versus $-70,1316 \pm 8,58966$ $p < 0.001$

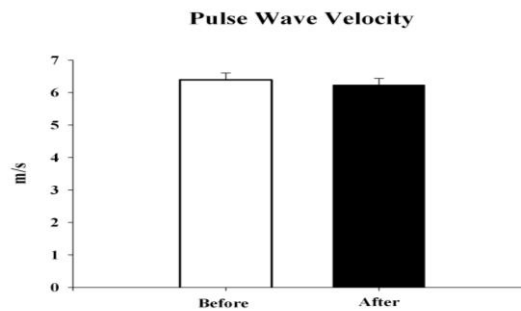


Fig. 14. PWV átlagértékek és SEM terhelés előtt és után. A terhelés hatására nem alakult ki szignifikáns változás ($6,49 \pm 1,001$ versus $6,27 \pm 1,037$ $p < 0.48$)

4. Diskusszió

Számos állatkísérlete motel igazolta, hogy a rendszeres fizikai tréning véd a miokardiális infarktus ellen és human adatok is ismertek, hogy javítja a túlélést. . A védő mechanizmus háttere nem teljesen tisztázott. . Egyrészt a tartós fizikai tréning csökkenti a kardiovaszkuláris betegségek rizikófaktorait, ideértve az obezitást, magas vérnyomást, magas lipid szinteket és az insulin rezisztenciát. Másrészt a rendszeres fizikai tréning rendelkezik egy kedvező effektussal, mely független a rizikófaktorokra gyakorolt kedvező hatásától. Egy korábbi vizsgálat bizonyította, hogy mind a hosszú távú (10 hetes), mind a rövid távú (1-5 napos) fizikai tréning csökkenti a miokardiális infarktus méretét

Bár a fiziológias és kardioprotektív hatás korábban már ismert volt, e hatásokat medialis szignál mechanizmusok nem teljesen ismertek. A rendszeres fizikai tréning számos klasszikus szignál molekula szintjét megemeli, mint például az endogen antioxidáns defense szintjét (superoxide dismutase és catalase), emeli a hó-shock fehérjék szintjét és aktiválja az ATP-szenzitív kálium (KATP) csatornákat, emeli az endoteliális nitrogen monoxide synthase expresszióját és aktivitását (eNOS) emelve a NO szintjét (Calvert 2011) A NO központi szerepet játszik az endotél funkció és számos egyéb folyamat regulációjában. . Mindenekelőtt a shear stress NO termelést provokál az endotélben , mely vazodilatációhoz vezet mind a vázizmokban mind a szívben. Másodsorban a NO befolyásolja a szénhidrát metabolizmust a vázizmokban fokozza a glükóz felvételt és gátolja a glycolysist. Emellett a terhelés során megemelkedő véráramlási és metabolikus igények kielégítésében és ennek szabályozásában is részt vesz. A fizikai tréning atheroprotektívhatása a nitrogen monoxidon keresztül mediálódik, mivel gátolja a gyulladási sejteket és a thrombocyták adhezióját az endotélhez. Nemcsak az eNOS és a NO játszik kulcsszerepet ezen folyamatok szabályozásában, hanem az asszimetrikus dimethylarginine is, mint az eNOS kompetitív inhibitora. Enyhe vagy közepes fokú shear stressznek kitett endotél sejtek protein methylase-1 (PRMT-1) expresszióját váltja ki és fokozott ADMA termelést vált ki az NF- κ B útvonalon keresztül. Erősebb shear stress mellett azonban fokozódik az ADMA degradációja, mivel stimulálódik a dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) (Osana 2003). Az ADMA képződésében és lebomlásában

szerepet játszó mindkét enzim, a PRMT-1 és a DDAH redox-szenzitív módon regulálódnak. Az oxidatív stressz a PRMT-1 aktivitását fokozza és gátolja a DDAH aktivitását, összességében emeli az ADMA koncentrációját. Az ADMA gátolja az eNOS aktivitást és/vagy kikapcsolja az enzimet, ami az oxidatív stressz további fokozódásához vezet. (Scalera 2006). Ezzel szemben, a csökkent oxidatív stressz fokozza a DDAH aktivitását (Scalera 2004), csökkent ADMA szintet okozva.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a reguláris közepes intenzitású fizikai tréning csökkenti az ADMA szintet. A terhelés minimális ideje, amely ahhoz szükséges, hogy az ADMA szint csökkenjen és ennek kardioprotektív hatása kialakuljon még nem ismert. Emellett számos más kérdés is nyitva maradt. Milyen intenzitású fizikai tréning szükséges az antioxidáns defense emeléséhez és az ADMA szint csökkentéséhez, milyen hosszú ideig szükséges a tréning az új steady-state állapot eléréséhez? Mennyi ideig tartható fenn az új egyensúlyi állapot? A különböző típusú fizikai tréning fajták hogyan befolyásolják az antioxidáns defense-t és az ADMA szintet?

Saját vizsgálati eredményeink azt igazolják, hogy az aszimmetrikus dimethylarginine, a szimmetrikus dimethylarginine és az L-arginine szintje nem változik maximális intenzitású fizikai terhelésre egészséges sportolóknál. A maximális intenzitású fizikai terhelésrapidán emeli a shear stress-t; mely teoretikusan ADMA szint emelkedéssel járna. Ezzel szemben nem alakult ki ADMA szintemelkedés az egyszeri maximális fizikai terhelés után, ami a megelőző repetitive fizikai terhelések védő hatásának lehet az eredménye. A tartós repetitive fizikai tréning az ADMA szintet 8-12 hét után csökkenteni képes és az alacsonyabb ADMA szint tartós marad, ha a tréninget nem függesztik fel. A tartós repetitive fizikai terhelés okozta ADMA szint csökkenés eléréséhez szükséges minimális idő illetve időbeli lefutás nem ismert.

Fiziológiás körülmények között kis mennyiségű reaktív oxygen gyök (ROS) termelődik az elektron transzfer reakciók következtében a mitokondriumokban, peroxisomákban, és a cytosolban, terhelés hatására azonban ez rapidán emelkedik. Ha az antioxidáns kapacitás megfelelő a sejtekben, az antioxidánsok elfogják a reaktív oxygen gyököket. A két legfontosabb antioxidáns enzim a SOD és a catalase. Korábbi eredmények azt sugallják, hogy a röved időtartamú fizikai tréning nem elegendő a SOD expresziójához de a catalase aktivitás 8 napos fizikai tréning program után megemelkedik és 9 napos pihenést követően tér vissza a kiindulási értékre. Érdekes módon a SOD és catalase protektív hatása a miokardiális infarktus ellen tisztázatlan maradt (Lennon 2004). Úgy tűnik, hogy a fizikai tréning időtartama és intenzitása meghatározza, hogy melyik endogen antioxidáns rendszer aktiválódik. Emellett az is bizonyossá vált, hogy az endogen antioxidáns rendszer aktiválódása elégséges a kardioprotekció kialakulásához, de nem feltétlenül szükséges. Az akut fizikai terhelés szabad gyökök excesszív termelődését feltételezi, mely fokozott lipid peroxidációhoz vezet. Eredményeink azt igazolták, hogy a lipid peroxidáció mértéke nem változott a terhelés után a kiindulási értékekhez viszonyítva. Ennek lehetséges magyarázata, hogy a repetitive fizikai terhelés megemelte az antioxidáns kapacitást, mely "elnyeli" az akut terhelés során keletkező nagy mennyiségű szabad gyököt.

Az artériás stiffness paraméterek alkalmasak az artériák strukturális és funkcionális változásainak jellemzésére. Az artériás stiffness független prediktív szerepe igazolódott fatális stroke, a kardiovaszkuláris és bármely okból bekövetkező halálozás, fatális és nem-fatális infarktus kialakulása szempontjából hipertóniás, diabeteses, végstádiumú vesebeteg, idős és

általános betegpopulációban is. A stiffness paraméterek közül a pulzus hullám terjedési sebességet (PWV) és az augmentációs indexet határozzák meg. Emellett a carotis-femorális pulzus hullám sebesség (PWV), az aorta stiffness direkt mérése vált fontossá a kardiovaszkuláris rizikó becslésében. A PWV mérése a legegyszerűbb leginkább reprodukálható módszere az artériás stiffness mérésének.

Aix úgy definiálható, mint a különbség a másodlagos és elsődleges szisztolés nyomás hullám csúcs között a nyomás hullám százalékában megadva. Az augmentációs index egy kompozit mérési eredmény, melyet számos dinamikus tényező határoz meg, mint a PWV, a kamrai kontraktilitás és a kis erek rezisztenciája.

Eredményeink alátámasztották a korábbi megállapítást, hogy a pulzus hullám terjedési sebesség nem változik fizikai terhelés hatására. Fiatal egészséges sportolóknál ez a tény a jó artériás elaszticitással magyarázható. Jelen vizsgálatunk azt is igazolta, hogy nemcsak a repetitív fizikai tréning, hanem az egyszeri maximális fizikai stressz is csökkenti az augmentációs indexet. Az augmentációs index rapid csökkenése fizikai terhelés után egy fiziológiai terhelés függő vaszkuláris válasznak tulajdonítható, nevezetesen a perifériás vaszkuláris rezisztencia csökkenésének. Ez a non-invazív mérési eljárás alkalmas lehet a terhelés hatására kialakuló fiziológiai és patológiai vaszkuláris válasz megítélésére. Emellett az endotél diszfunkció prediktora is

4. Összefoglalás

Az oxidatív stressz az egyik legfontosabb patofiziológiai folyamat mely miokardiális sejt károsodáshoz, endotél diszfunkcióhoz és endotél sejt károsodáshoz vezet. Experimentális vizsgálataink célja az volt, hogy azonosítsuk az oxidatív stressz folyamatait és ennek hátterében álló szignál útvonalakat citotoxikus perfundált szív modellben. Eredményeink igazolták, hogy a citotoxikus anyag által mediant miokardium sejt károsodás hátterében energia-depléció, fokozott lipid peroxidáció és fehérje oxidáció áll. A szignál útvonalak közül a JNK-p38-MAPK aktivációja igazolódott, melyek mediálják a citotoxikus hatást. Emellett a PARP rendszer aktivációját is ki tudtuk mutatni. A BGP-15 hatékony antioxidáns és PARP gátló tulajdonsága által hatékony kardioprotektív effektust mutatott.

Klinikai vizsgálatunkban az ADMA és lipid peroxidáció szerepét vizsgáltuk fizikai terhelés indukálta oxidatív stresszben. A tartós fizikai tréning alkalmasnak bizonyult az akut fizikai megterhelés által kiváltott oxidatív stressz kivédésére az emelkedett antioxidáns kapacitás révén. Emellett igazoltuk, hogy az artériás stiffness mérése alkalmas az endotél funkció klinikai non-invazív megközelítésére.

5. Új eredmények

1. Eredményeink bizonyították, hogy a BGP-15 képes kivédeni az imatinib-indukált energia depléciót.
2. A BGP-15 csökkenti az oxidatív stressz során kialakuló lipidperoxidációt és protein oxidációt.

3. Az imatinib-indukált ER stressz válasz Akt aktivációt okoz. Ezen védő signal mechanizmus fokozott expressziója alakul ki BGP-15 hatására imatinib kezelés után.
4. Az imatinib oxidative stresszt provokál következményes energia-deplációval. Ezek a hatások a JNK és p38 MAP kináz aktiváció révén regulálódnak. A BGP-15 képes kivédeni ezen "halál" ótvonalak aktivációját.
5. Edzett sportolóknál a maximális erő kifejtésével járó fizikai stressz során az aszimmetrikus dimethylarginine, szimmetrikus dimethylarginine és L-arginine szintje nem változik.
6. A tartós fizikai tréning az antioxidáns defense növekedését okozza, mely védelmet ad az akut fizikai terhelés során bekövetkező excesszív ROS képződés és következményes lipid-peroxidáció ellen.
7. A pulzus hullám terjedési sebesség és augmentációs index mérése alkalmas a terhelésre bekövetkező fiziológias és patológias vaszkuláris válasz jellemzésére. A fizikai terhelés után bekövetkező rapid augmentációs index csökkenés a fiziológias terhelés hatására bekövetkező vaszkuláris választ jelzi, a vaszkuláris rezisztencia csökkenését.

6. Publications/Publikációk

6.1 Publications related to thesis/Tézishez tartozó publikáció

6.1.1 Full papers/Cikkek

Sarszegi Z, Bognar E, Gaszner B, Konyi A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Berente Z. BGP-15, a PARP inhibitor prevents imatinib induced cardiotoxicity by activating Akt-GSK-3beta pathway and suppressing JNK and p38 MAP kinase activation. Mol Cell Biochem 2012.Febr.14. Equib ahead of print IF:2.168

Sarszegi Z, Ajtay Z, Lenkey Z, Nemeth A, Cziraki A, Czeh A, Lustyik G, Biri B, Kék Si, Szabados S. Impact of acute physical exercise on vascular regulation, oxidative stress, ADMA and arterial stiffness
Med Sci Monit submitted, under review

Gaszner B, Lenke Zsy, Illyés M, Sarszegi Z, Horváth I, Magyarai B, Molnar F, Cziraki A. Comparison of aortic and carotid arterial stiffness parameters in patients with verified coronary artery disease
Clin Cardiol. 2012 35(1):26-31.IF:1.807

Csordás A, Pankotai E, Snipes JA, Cselenyák A, Sárszegi Z, Cziráki A, Gaszner B, Papp L, Benko R, Kiss L, Kovács E, Kollai M, Szabó C, Busija DW, Lacza Z. Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. Life Sci. 2007 Jan 23;80(7):633-7. Epub 2006 Nov 20. IF:2.257

Bognar Z, Kalai T, Palfi A, Hanto K, Bognar B, Mark L, Szabo Z, Tapodi A, Radnai B, Sarszegi Z, Szanto A, Gallyas F Jr, Hideg K, Sumegi B, Varbiro G. A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. Free Radic Biol Med 2006;41(5):835-48. IF:5.440

Cziráki A, Sárszegi Zs, Gaszner B, Illyés M, Papp L: A vaszkuláris endothel és a pulmonális epitel noninvazív vizsgálata iszkémiás szívbetegekben., Cardiol Hung 35:A50, 2005

6.1.2 Abstracts/Absztraktok

Sárszegi Zs, Lenkey ZS, Németh Á, Kéki S, Lustyik Gy, Cziráki A, Szabados S: A maximális fizikai terhelés hatása a vaszkuláris regulációra, oxidatív stresszre, ADMA szintre és az artériás stiffnessre Card Hung 2011 május Suppl F72.

Lenkey ZS, Husznai R, Ajtay Z, Sárszegi Zs, Gaszner B, Németh Á, Illyés M., Cziráki A: Fizikai stressz teszt hatása az artériás stiffness paraméterekre iszkémiás szívbetegekben. Card Hung 2011 május Suppl F100

*Husznai R, Gaszner B, Lenkey ZS Priegl L, Sárszegi Zs, , Magyar B, Horváth I, Németh Á, Illyés M, , Cziráki A:*Szisztémás és lokális artériás stiffness paraméterek összehasonlítása koszorúér betegekben Card Hung 2011 május Suppl F75

Bognár E., Kiss GYN, Sárszegi Z, Bartha E, Solti I, Sümeg Bi, Z. Berente: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor H03089 enhanced post ischemic myocardial glucose uptake mostly by activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), Circulation, 118(12): E233-E233, 2008 IF14.595

Kovacs K, Szabo A, Bognar E, Kiss Gy, Kiss T, Sarszegi Z, Sumegi B, Gallyas F: Identification of novel drug targets preventing ischemic heart diseases, Bridges in Life Sciences Annual Scientific Review, Regional Cooperation for Health, Science and Technology, October 2007, vol.1, page 42, 2007

Miklán D, Keller J, Sárszegi Z, Gaszner B, Cziráki A, Papp L. Evaluation of mechanical arterial properties in patients with coronary vasoconstriction, Eur J Echocardiogr. 7:S120, 2006 IF:1.050

Keller J, Miklán D, Sarszegi Z, Gaszner B, Papp L. New methods for the assesment of arterial stiffness in patients with vasospastic angina Eur J Echocardiogr. 7:S120, 2006 IF:1.050

*Cziráki A, Gaszner B, Sárszegi Zs, Horváth I, Illyés M, Papp L.*Endothelfunkció vizsgálata ischémiás szívbetegekben Card Hung 2006 máj Suppl A 45.

Cziráki A, Gaszner B, Sárszegi Z, Horváth I, Illyés M, Papp L: Endothelial function in patients with ischemic heart disease. European Heart Journal 27:, pp. 124-124 2006. IF:7.286

Gaszner B, Sárszegi Z, Horváth IG, Cziráki A, Illyés M, Papp L. Endothel funkció és aorta stiffness vizsgálata hypertóniás és ischaemiás szívbetegeken. Cardiologia Hungarica 35: A70, 2005.

Sárszegi Zs, Csalló B, Cziráki A, Papp L. Kilélegzett nitrogén-monoxid vizsgálata ischémiás szívbetegségben. Card Hung 2004. máj. Suppl. C 61.

6.2. Other publications/Egyéb publikációk

6.2.1 Full papers/Cikkek

B. Gaszner, M. Illyés, Zs. Lenkey, R. Böcskei, L. Priegl, Zs. Sárszegi, F.T. Molnar, I.G. Horváth, A. Cziráki Early vascular ageing in coronary artery disease and diabetes mellitus Heart and vessels under review

B Borsiczky, Zs Sarszegi, A Konyi, S Szabados B Gaszner: The effect of clopidogrel besylate and clopidogrel hydrogensulfate on platelet aggregation: aretrospective study Thromb Res. 2011 Sep 15. [Epub ahead of print] IF:2.372

Sárszegi Zs: Fix antihypertenzív kombinációk előnyei a magas vérnyomás kezelésében Granum XIV/1. 2011.márc.

*Kónyi A, Skoumal R, Kubin AM, Füredi G, Perjés A, Farkasfalvi K, **Sárszegi Z**, Horkay F, Horváth IG, Tóth M, Ruskoaho H, Szokodi I.* Prolactin-releasing peptide regulates cardiac contractility.

Regul Pept. 2010 Jan 8;159(1-3):9-13. IF:2.276

Sárszegi Zs.: Az ACE gátlók szerepe a koszorúérbetegek szekunder prevenciók kezelésében Lege Artis Medicinae 2007.jul

Sárszegi Zsolt A mikronizált fenofibrát hatékonysága és alkalmazási lehetőségei. Háziorvosi Továbbképző Szemle 2004. ápr. Supplementum D

Sárszegi Zst A Ca-csatorna blokkoló amlodipin szerepe az ischémiás szívbetegség therápiájában Háziorvosi Továbbképző Szemle 2002.dec.

Sárszegi Zs, Jobst K., Nagy J.Az aluminium szérum szintjének kinetikája krónikus veseelégtelenségben Orvosi Hetilap 2000. 141. 35.

Zs Sarszegi, L Kollar, K Torok, G Kassai, T Kovacs, L Wagner K Toth, J Nag: Haemorrhological changes in IgA nephropathy Medical Science Monitoring 1999; 5

Sárszegi Zs, Kollár L, Török K, Kassai G, Kovács T, Wágner L, Tóth K, Nagy J. Hemorheológiai elváltozások szerepe az IgA nephropathia progressiójában. Magyar Belorv Arch 1998; 31:17-22

Sarszegi Z, Nagy J Jobst K. The kinetics of initial gastrointestinal absorption of an aluminium-containing antacid (Tisacid) in patient with various stages in chronic renal insufficiency. (letter) Nephrol Dial Transplant 1997; 12(2:372-3 IF: 1.43

6.2.2 Abstracts/Absztraktok

*Gaszner B, Illyés M, Lenkey Zs, Bocskai R, Priegl L, **Sárszegi Zs**, Horváth I, Cziráki A.*Korai vaszkuláris öregedés koszorúér-betegekben és diabetes mellitusban.Card Hung 2011Suppl F93.

Sárszegi Zs, Győrimolnár I, Cziráki A, Papp L.: Az extracorporális szívműtétek után kialakuló akut veseelégtelenség prevenciója.Card Hung 2003.május Suppl. 2.56.

Zs Sarszegi, L Kollar, K Torok, G Kassai, T Kovacs, L Wagner K Toth, J Nag: Haemorrhological changes in IgA nephropathy Nephrol Dial Transpl 1998 Suppl IF:1.754

Cs Trinn Zs Sarszegi, T Magyarlaci J Nagyí: Thin basement membrane nephropathy. Relevance to hematuria. Nephrol Dial Transpl 1998 Suppl. IF:1.754

*Cs Trinn, Zs Sarszegi, A Szabo, T Magyarlaci, J Nagy :*High protein intake induced nephrotic syndrome in membranous glomerulonephritis. Nephrol Dial Transpl. 1997 Suppl. IF:1.424

Cs Trinn, Zs Sarszegi, T Szelestei, T Toth, J Nagy: High diet-hyperperfusion renal injury. Nephrol Dial Transpl. 1997 Suppl. IF:1.424

Z Sarszegi, J. Nagy, K. Jobst: The kinetics of initial gastrointestinal absorption of an aluminium-containing antacid (Tisacid) in patient with various stages in chronic renal insufficiency. Nephrol Dial Transpl 1995 Suppl IF:1.682

6.3 Chapter of book/Könyv fejezet

Sárszegi Zsolt A szív autoimmun betegségei (könyvfejezet)
Klinikai Immunológiai kézikönyv- 2005

