

**INVESTIGATION OF POTENTIAL PHARMACOLOGICAL DRUG TARGETS IN
THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF HYPERTENSIVE ORGAN
DAMAGES**

PhD thesis

Author: Laszlo Deres

Program leader: Prof. Kalman Toth M.D., Ph.D., Sc.D.

Project leader: Robert Halmosi M.D., Ph.D.



First Department of Medicine
University of Pécs, Medical School
Hungary

2014

ABBREVIATIONS

AKT	protein kinase B (PKB)
BNP	B-type natriuretic peptide
BW	body weight
DAP	diastolic arterial blood pressure
EF	ejection fraction
ERK ½	extracellular signal-regulated kinase
FS	fractional shortening
GSK-3β	glycogen synthase kinase-3β
HF	heart failure
IMT	intima-media thickness
IR	ischemia-reperfusion
IVS (d)	thickness of interventricular septum in diastole
IVS (s)	thickness of interventricular septum in systole
JNK	c-jun N-terminal kinase
LVEDV	left ventricular end-diastolic volume
LVESV	left ventricular end-systolic volume
LVID (d)	left ventricular end-diastolic diameter
LVID (s)	left ventricular end-systolic diameter
MAP	mean arterial blood pressure
MAPK	mitogen activated protein kinase
NAD+	nicotinamide adenine dinucleotide
NIH	National Institute of Health
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	protein kinase C
PW (d)	thickness of left ventricular posterior wall in diastole
PW (s)	thickness of left ventricular posterior wall in systole
ROS	reactive oxygen species
RWT	relative wall thickness
SAP	systolic arterial pressure
SHR-C	spontaneously hypertensive rat treated with placebo
SHR-L	spontaneously hypertensive rat treated with L2286
SPB	systolic blood pressure
TBS	TRIS-buffered saline
TGF-β	transforming growth factor-β
TL	length of right tibia
WKY	Wistar-Kyoto rat

Introduction

Hypertension is a major public health problem both in middle-aged and in elderly people. It is both a complex disease and an important risk factor for other cardiovascular outcomes, such as sudden cardiac death, stroke, myocardial infarction, heart failure, and renal diseases. Unfortunately, the control of arterial hypertension is far from optimal and has improved only minimally over the last decades. Side effects of antihypertensive drugs, complaints due to their blood pressure lowering effect and inadequate compliance are the key factors in the background of inadequate control of hypertension. Moreover lowering blood pressure to the optimal range can be harmful in elderly patients. In order to optimize management of hypertension, some recent efforts focus on protecting the heart and the vasculature from hypertension induced remodeling with or without lowering the blood pressure.

Experimental model of chronic hypertension

SHR have been widely used as a model for hypertensive heart disease and hypertension induced vascular remodeling. The SHR was originally introduced by Okamoto and Aoki as a model of genetic hypertension. The progression of hypertrophy and impaired cardiac function in the SHR is similar to the clinical course of patients with hypertension. Persistent hypertension develops in the SHR after approximately 6 weeks of age. Following a relatively long period of stable hypertension and compensated hypertrophy, at approximately 18 months of age, animals begin to develop evidence of impaired function (tachypnea, labored respiration).

The development of vascular remodeling is an early and important consequence of hypertension. Vascular remodeling is mainly characterized by vascular smooth muscle cell hypertrophy and increased production of extracellular matrix. Remodeling is initially an adaptive process that evolves in response to long-term pressure overload, but finally it can contribute to the development of hypertensive target organ damages.

Cardiovascular effects of PARP inhibition

It is known that activation of poly(ADP-ribose) polymerase enzyme (PARP) plays an important role in the development of postinfarction as well as long-term hypertension induced heart failure. The poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme becomes activated in response to DNA single-strand breaks that can be excessive as a response to free radicals and oxidative cell damage. PARP is an energy-consuming enzyme that transfers ADP-ribose units to nuclear proteins. As a result of this process, the intracellular NAD^+ and ATP levels decrease remarkably resulting in cell dysfunction and cell death via the necrotic route. PARP activation can induce ROS production, calcium elevation, and activates JNK, p38 MAP kinase and RIP1 which can destabilize mitochondrial

membrane system leading to the release pro-apoptotic proteins from the mitochondrial inner membrane space, like Cytochrome C, AIF and endonuclease G. In addition, PARP activation can activate NF-kappaB and AP-1 transcription factors which can contribute to cardiovascular remodeling.

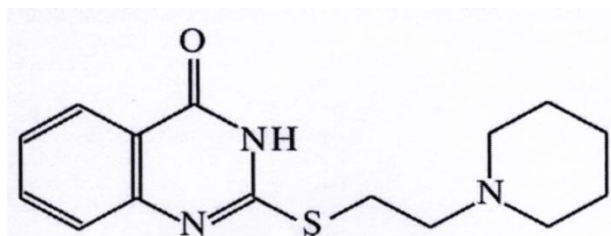


Figure 1. Chemical structure of L-2286 (2-[(2-Piperidine-1-ylethyl)thio]quinazolin-4(3H)-one).

It has been shown previously that our experimental agent, an isoquinoline derivative PARP-inhibitor, L-2286 (Fig. 1) had beneficial effects against oxidative cell damage, ischemia-reperfusion injury and against the development of postinfarction or long-term high blood pressure-induced heart failure. Although the molecule have a slight scavenger characteristic, its forementioned effects were mediated mainly by influencing the Akt-1/GSK-3 β , MAPK and PKC signal transduction factors.

Importance of bradykinin B1 receptor antagonism

An important factor in the background of the inadequate hypertension control is the drug interactions between antihypertensive agents and several non-cardiovascular drugs e.g. analgetics, such as NSAIDs.

NSAIDs are the most widely used analgetics nowadays. Unfortunately all of them (except low dose of aspirin) increase markedly the cardiovascular mortality and morbidity. Therefore we considered important to monitor the cardiovascular effects of a novel analgetic agent, bradykinin B1 receptor antagonist. According to several previous works bradykinin B1 receptor antagonists may have beneficial effects in some cardiovascular diseases.

Kinins are biologically active peptides that exert a broad spectrum of physiological effects, including vasodilation, inflammation, and pain induction. The biological effects of kinins are mediated through the stimulation of bradykinin B1 and B2 receptors. The B2 receptor is constitutively expressed and is activated by intact kinins, bradykinin, and kallidin. This receptor is believed to play an important role in mediating the beneficial effects of ACE-inhibitors, but it is also involved in the acute phases of inflammation. However the B1 receptor is activated by the carboxypeptidase metabolites of kinins, des-Arg9-BK and des- Arg10-kallidin. The B1 receptor is normally weakly expressed, but it is upregulated in the presence of cytokines and endotoxins or during tissue injury. The B1 receptor participates in chronic inflammation and pain; thus, bradykinin B1 receptor antagonists are a potentially novel approach for treating these conditions without having deleterious cardiovascular effects.

Aims of the study

Our present study aimed to clarify whether pharmacological PARP-inhibitor L-2286 has protective effect in an SHR model against the development of the early stage of hypertensive cardiac remodeling.

- The aim of this work was to provide evidence for new molecular mechanisms of the cardioprotective effect of PARP inhibition.

- We estimated its effect on cardiac fibrosis.

- We tested whether PARP inhibition had beneficial effect on signal transduction pathways taking part in cardiac remodeling.

In the second experiment we investigated the effects of the bradykinin B1 receptor antagonist test substance, FGY-1153 on the development of hypertensive organ damages in spontaneously hypertensive rats (SHR).

- We tried to examine the effect of bradykinin B1 receptor antagonism on body weight, food consumption and blood pressure.

- We tried to examine the effect of bradykinin B1 receptor antagonism on hypertension induced cardiovascular remodeling (intima media thickness, interstitial fibrosis, LVHT).

- We tested whether bradykinin B1 receptor antagonist had beneficial effect on signal transduction pathways taking part in cardiovascular remodeling.

THE EFFECT OF PARP INHIBITION IN CARDIAC REMODELING

Effect of PARP inhibition on gravimetric parameters of spontaneously hypertensive rats

Body weights did not differ significantly among the three groups (WKY: 71.01±0.11 g, SHR-C: 72.03±2.36 g, SHR-L: 69.92±3.21 g, 6-week-old rats) at the beginning of our study. However, at the end of the 24-week-long treatment period, body weights of WKY group were significantly higher than those of SHR-C and SHR-L groups (WKY: 392.7±14.01 g, SHR-C: 323.8±11.27 g, SHR-L: 321.9±6.84 g, $p<0.01$ WKY vs. SHR groups, 30-week-old rats). The degree of myocardial hypertrophy was determined by ventricular weight to body weight ratio (WV/BW, mg/g). This parameter was significantly increased in SHR groups compared to the WKY group (WV/BW: WKY: 2.95±0.17, SHR-C: 4.48±0.12, SHR-L: 3.85±0.15, $p<0.05$ WKY vs. SHR groups). Similar results were obtained in case of weights of ventricles (WV, WKY: 1.16±0.17 g, SHR-C: 1.45±0.18 g, SHR-L: 1.24±0.24 g, $p<0.05$ WKY vs. SHR groups). The WV and WV/BW ratios were significantly decreased by L-2286 treatment ($p<0.05$ SHR-L vs. SHR-C). The lung wet weight-to-dry weight ratio was not elevated significantly in SHR-C and SHR-L compared to WKY groups (Table 1). All these results indicate the presence of cardiac hypertrophy without congestive heart failure in the SHR-C group that was ameliorated in the SHR-L group.

	WKY	SHR-C	SHR-L
BW ^{6w} (g)	71.01±1.89	72.02±2.36	69.9±3.21
BW (g)	393±14.01	323.8±11.27 ^a	321.86±6.8 ^{a,c}
WV (g)	1.16±0.17	1.45±0.18 ^b	1.24±0.24 ^{b,c}
WV/BW (mg/g)	2.95±0.17	4.48±0.12 ^b	3.85±0.15 ^{b,c}
Lung wet weight/dry weight	4.84±0.92	4.79±0.84	4.77±0.99
p-BNP (ng/ml)	2.19±0.011	2.33±0.034	2.31±0.031

Table 1. Effect of L-2286 treatment on gravimetric parameters and on plasma BNP in SHR. WKY: normotensive age-matched control rats, n=7, SHR-C: SHR age-matched control rats, n=8, SHR-L: SHR treated with L-2286 for 24 weeks, n=9. BW^{6w}: body weight of 6-week-old rats, BW: body weight, WV: weights of ventricles, BNP: plasma b-type natriuretic peptide. Values are means±S.E.M. ^a<0.01 (vs. WKY group), ^b<0.05 (vs. WKY group), ^c<0.05 (vs. SHR-C).

L-2286 treatment did not influence the levels of plasma BNP and blood pressure

Slightly elevated plasma BNP levels were found both in SHR-C and SHR-L groups (not significant vs. WKY group). Although plasma BNP level was a little higher in SHR-C group than in SHR-L group, this difference was also not statistically significant (Table 1). In both SHR groups,

blood pressure was significantly elevated compared to the WKY group ($p<0.05$). L-2286 treatment did not decrease significantly the elevated blood pressure (Table 3).

L-2286 decreased the interstitial collagen deposition in the myocardium

Histological analysis revealed slight interstitial collagen deposition in the WKY group. Chronic high blood pressure caused significantly higher collagen deposition in SHR-C rats that was significantly diminished ($p<0.05$) in the SHR-L group (Fig. 2).

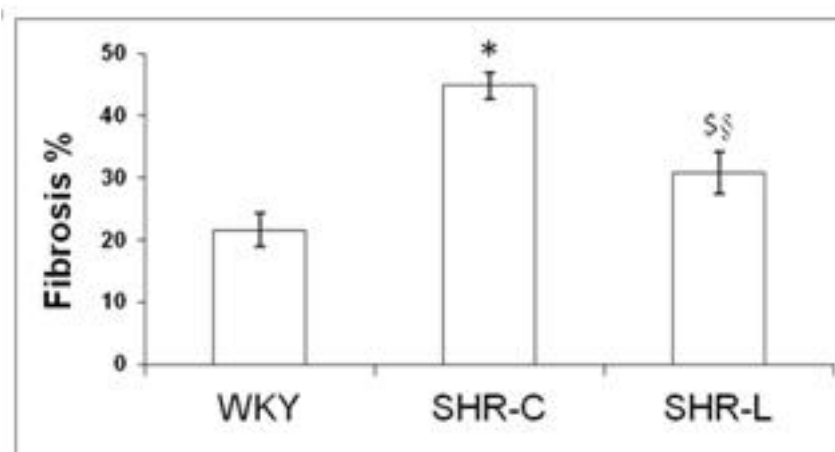


Figure 2. L-2286 treatment decreased the deposition of interstitial collagen. WKY: normotensive age-matched control rats. SHR-C: 30 week-old spontaneously hypertensive rats, SHR-L: 30 week-old spontaneously hypertensive rats treated with L-2286 for 24 week. Densitometric evaluation of the sections is shown. * $p<0.01$ vs. WKY, § $p<0.05$ vs. WKY, § $p<0.05$ vs. SHR-C.

PARP inhibition decreased the left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats

At the beginning of the study the echocardiographic parameters of the three groups did not differ significantly from each other (Table 2). At the age of 30 weeks there was no significant difference in LV systolic functions (EF and FS) between the WKY and SHR groups. Heart rate did not differ significantly during the anesthesia among the groups. LVESV and LVEDV were increased significantly in SHRs ($p<0.05$ WKY vs. SHR-C and SHR-L), and these unfavorable alterations were not reduced by L-2286 treatment. The thickness of the septum, and the posterior wall and the relative wall thickness were also increased in SHR groups (indicating the presence of ventricular hypertrophy) comparing to the WKY group ($p<0.05$), and these parameters could be significantly reduced by the administration of L-2286 ($p<0.05$ SHR-C vs. SHR-L group) (Table 3).

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

Table 2. Echocardiographic parameters in 6 weeks old SHR. WKY: normotensive age-matched control rats, n=7, SHR-C: SHR age-matched control rats, n=8, SHR-L: n=9, SHR treated with L-2286 for 24 weeks. EF^{6w}: ejection fraction, FS^{6w}: fractional shortening, LVEDV^{6w}: left ventricular (LV) end-diastolic volume, LVESV^{6w}: LV end-systolic volume, Septum^{6w}: thickness of septum, PW^{6w}: thickness of posterior wall, LV mass^{6w}: weights of LVs. ±S.E.M.

	WKY	SHR-C	SHR-L
SAP ^{30w} , (mmHg)	129±7	192±9 ^a	186±5 ^a
DAP ^{30w} , (mmHg)	89±5	127±8 ^a	125±4 ^a
MAP ^{30w} , (mmHg)	103±7	149±5 ^a	146±7 ^a
EF (%) ^{30w}	69.1±2.4	68.72±2.1	69.01±3.2
FS ^{30w}	39.8±1.9	39.04±1.85	40.57±2.66
LVEDV ^{30w} (ml)	279.18±18.18	335.87±10.36 ^a	326.94±9.18 ^a
LVESV ^{30w} (ml)	85.77±8.56	96.85±10.36 ^a	99.81±11.85 ^a
Septum ^{30w} (mm)	1.43±0.04	1.93±0.04 ^a	1.79±0.05 ^{a,b}
PW ^{30w} (mm)	1.54±0.08	2.15±0.12 ^a	1.87±0.03 ^{a,b}
RWT ^{30w}	0.38±0.05	0.504±0.02 ^a	0.445±0.012 ^{a,b}
LV mass ^{30w} (uncorrected) (mg)	1002.81±59.5	1370.35±79.87 ^a	1121.13±53.23 ^{a,b}
LV mass ³⁰ /BW ³⁰ (mg/g)	2.73±0.7	4.23±0.8 ^a	3.70±0.3 ^{a,b}

Table 3. L-2286 treatment moderately decreased the echocardiographic signs of LVHT in 30 weeks old SHR. WKY: normotensive age-matched control rats, n=7, SHR-C: SHR age-matched control rats, n=8, SHR-L: n=9, SHR treated with L-2286 for 24 weeks. EF^{30w}: ejection fraction, FS^{30w}: fractional shortening, LVEDV^{30w}: left ventricular (LV) end-diastolic volume, LVESV^{30w}: LV end-systolic volume, Septum^{30w}: thickness of septum, PW^{30w}: thickness of posterior wall, RWT^{30w}: relative wall thickness, LV mass^{30w}: weights of LVs. SAP, DAP, MAP^{30w}: systolic, diastolic and mean arterial blood pressure at 30-week-old age (n=3 from each group). Values are mean±S.E.M. ^ap<0.05 (vs. WKY group), ^bp<0.05 (vs. SHR-C group), ^cp<0.05 (vs. SHR-L).

Effect of L-2286 treatment on poly-ADP-ribosylation as well as on the phosphorylation state of Akt-1^{Ser473}/GSK-3 β ^{Ser9} and FKHR^{Ser256}

Akt-1^{Ser473} was moderately phosphorylated in WKY group. In SHR-C group, the phosphorylation of Akt-1^{Ser473} was more pronounced ($p < 0.01$ vs. WKY). Moreover, in SHR-L rats the L-2286 treatment caused further elevation in Akt-1^{Ser473} phosphorylation ($p < 0.01$ vs. WKY and SHR-C groups). The same result was obtained in the case of GSK-3 β ^{Ser9} phosphorylation.

To detect the effectivity of L-2286, the ADP-ribosylation of the samples were analysed by Western-blot. The lowest degree of ADP-ribosylation was present in SHR-L group, and the most pronounced ADP-ribosylation was seen in SHR-C group ($p < 0.05$ vs. WKY). Another target protein of Akt-1^{Ser473} (besides GSK3 β ^{Ser9}) is FKHR^{Ser256}. Consistently with the result of Akt-1^{Ser473} phosphorylation, the strongest phosphorylation (therefore inhibition) could be observed in SHR-L group ($p < 0.01$ vs. SHR-C and WKY). The lowest phosphorylation and therefore the highest activity of FKHR was seen in SHR-C group ($p < 0.05$ vs. WKY).

Effect of L-2286 on the amount of Hsp72 and 90

There was no significant difference among the three groups in the level of Hsp72. On the other hand, the level of Hsp90 was elevated in SHR-L group compared to WKY and SHR-C groups ($p < 0.01$ SHR-L vs. WKY or SHR-C groups), and the lowest amount of this protein was present in WKY samples.

Effect of L-2286 administration on MAPKs

Phosphorylation of p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}, ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} and JNK was the lowest in the WKY group compared to SHR-C and SHR-L groups (p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}: $p < 0.01$ vs. SHR groups, ERK 1/2: $p < 0.05$ vs. SHR groups, JNK: $p < 0.05$ vs. SHR groups). In the case of p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} and JNK, their phosphorylation was elevated in both SHR-C and SHR-L groups, but there were no significant differences between the two SHR groups.

Phosphorylation of ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} was increased significantly in SHR-C and SHR-L groups. L-2286 treatment did not alter significantly the phosphorylation in SHR-L group compared to the SHR-C group.

Influence of L-2286 treatment on the phosphorylation state of several PKC isoforms

The overall (pan) phosphorylation of PKC (pan β II^{Ser660}) was low in the WKY group and became significantly higher in SHR-C and SHR-L groups ($p < 0.01$ WKY vs. SHR groups). Administration of L-2286 could not affect the phosphorylation state of PKC pan β II Ser⁶⁶⁰ in SHR-L group compared to the SHR-C group.

The lowest phosphorylation could be observed in the WKY group in case of PKC α/β ^{Thr638/641}, δ ^{Thr505}, ζ/λ ^{Thr410/403} and ϵ ^{Ser729} ($p < 0.01$ vs. SHR groups). As PKC ζ antibody, we used a combined antibody (i.e. PKC ζ/λ Thr^{410/403}), which did not discriminate between PKC ζ and λ ; PKC λ being structurally highly homologous to PKC ζ in the COOH-terminal end of the molecule. L-2286 treatment decreased significantly the phosphorylation of PKC α/β ^{Thr638/641} and ζ , while it could increase the phosphorylation of ϵ ^{Ser729} (PKC α/β ^{Thr638/641}, ζ , ϵ ^{Ser729}: $p < 0.01$, SHR-L vs. SHR-C). In the case of PKC δ ^{Thr505} there was no significant difference between the SHR groups.

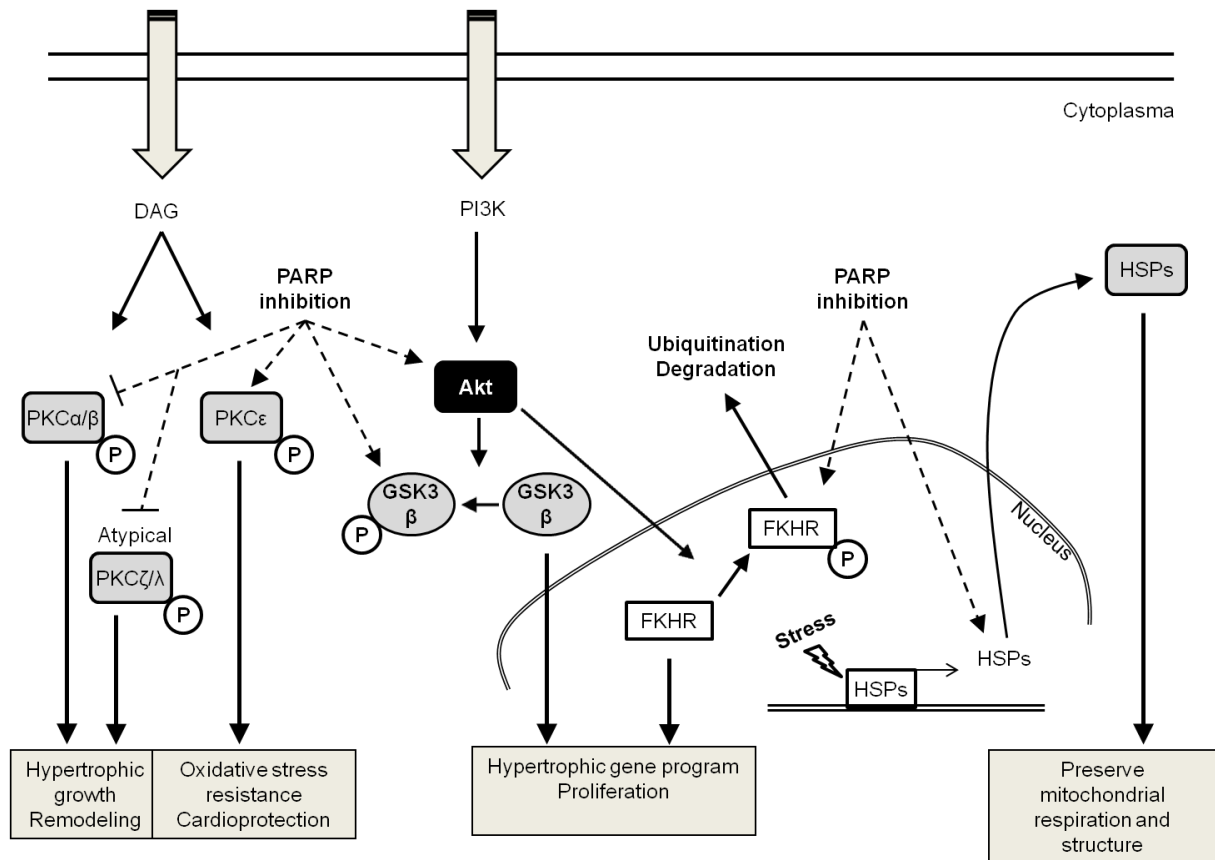


Figure 3. Summary of pathway alterations due to L-2286 treatment.

EFFECTS OF BRADYKININ B1 RECEPTOR ANTAGONISM IN HYPERTENSIVE ORGAN DAMAGES

Effect of FGY-1153 on body weight

Body weights were measured and recorded once weekly during the treatment period. There were no significant differences between the three groups (Fig. 4).

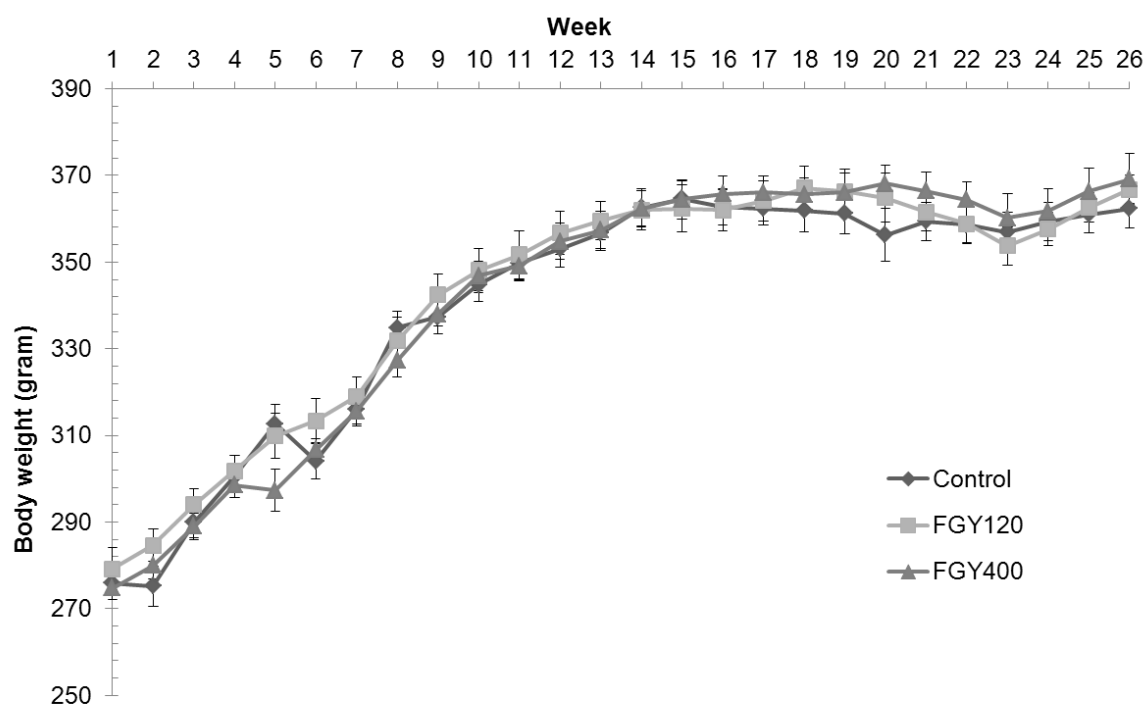


Fig. 4. Effect of FGY-1153 on body weight during the treatment period. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. One-way ANOVA analysis conducted for each week did not reveal statistically significant differences between groups.

Effect of FGY-1153 on food consumption

The quantity of food consumed by each cage of animals was measured and recorded once weekly during the treatment period. There were no overt differences between the food consumptions of the three groups throughout the study. (Fig. 5).

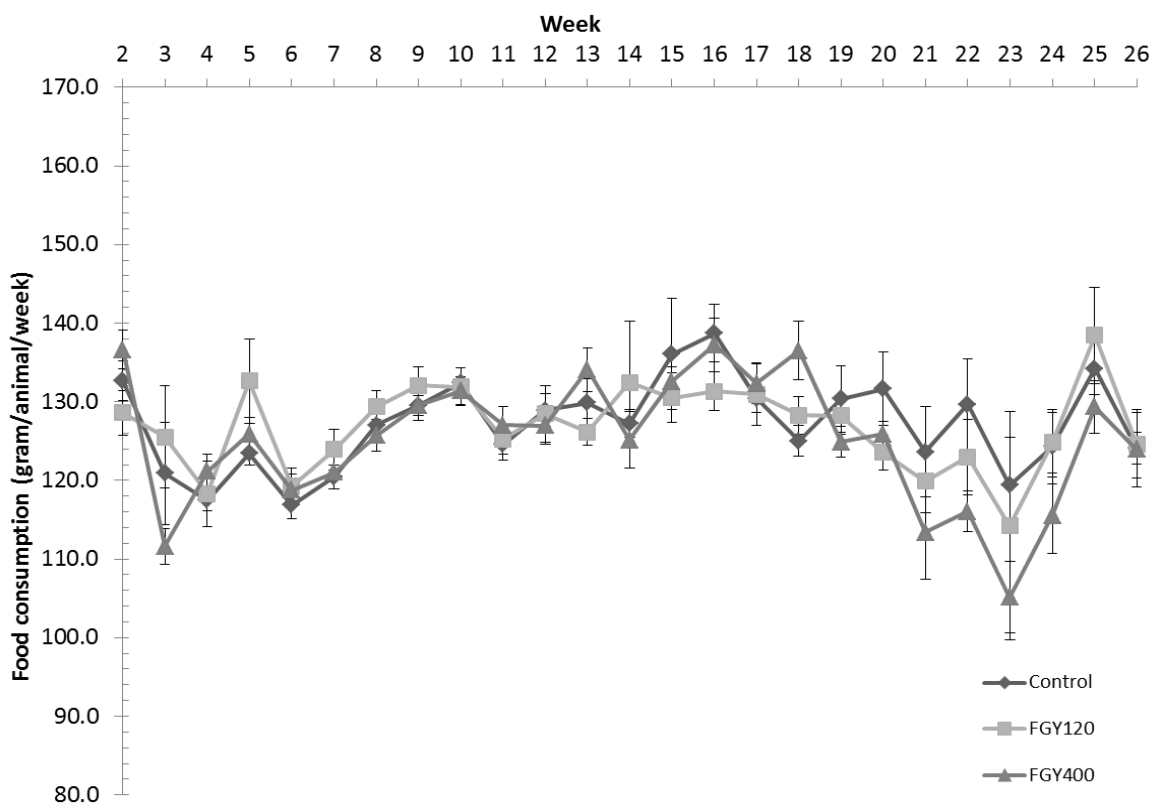


Fig. 5. Effect of FGY-1153 on food consumption during the treatment period. Data are presented as mean±S.E.M. Data were analysed with one-way ANOVA. No statistically significant differences were found at any time points between the groups.

Effect of FGY-1153 on blood pressure

At the beginning of the study there was no significant difference between the mean arterial blood pressure of the three groups (Control: 178.71±3.488 mm Hg, FGY120 group: 172.47±3.810 mm Hg, FGY400 group: 174.53±2.303 mm Hg, $p=0.374$). The FGY-1153 treatment seemed to have no significant effect on blood pressure parameters either at Week 13 or and Week 26. Mean arterial blood pressure values did not differ significantly between the groups at Week 13 (Control: 215.93±6.114 mm Hg, FGY120 group: 212.73±5.682 mm Hg, FGY400 group: 228.80±4.488 mm Hg, $p=0.096$) and at Week 26 (Control: 256.36±8.039 mm Hg, FGY120 group: 256.80±7.693 mm Hg, FGY400 group: 275.33±3.067 mm Hg, $p=0.078$).

Nevertheless, a non-significant trend of higher blood pressure in the FGY400 group compared to the other two groups was apparent.

Effect of FGY-1153 on echocardiographic parameters

Compared to the parameters measured at the beginning of the study, the septum and posterior wall thicknesses increased in all groups during the treatment period. However treatment with both low dose and high dose FGY-1153 significantly attenuated the elevation of these parameters indicating that the treatment with FGY-1153 reduced the hypertension induced left ventricular hypertrophy.

LVIDs and LVESV were also increased in all groups during the study, the elevation of these parameters were however significantly attenuated in the FGY120 group, but not in the FGY400 group. Left ventricular systolic function - expressed as ejection fraction (EF%) - showed a decreasing tendency in both the Control group and the FGY400 group by the end of the study compared to the initial parameters. In comparison with the Control group these changes were however significantly attenuated in the FGY120 group, indicating that the low dose FGY-1153 treatment prevented the hypertension induced decrease in systolic left ventricular function. The E/E' ratio showed an increasing tendency during the study in the Control group, while this parameter was significantly decreased in both of the FGY120 and FGY400 groups. It may indicate that FGY-1153 treatment could attenuate the diastolic dysfunction seen in SHR rats.

In the last column of Table 4 the typical values of structural and functional parameters of age-matched normotensive animals (WKY group) can be seen.

	SHR Week 0	Control Week 26	FGY120 Week 26	FGY400 Week 26	WKY age-matched
Septum (mm)	1.66 ± 0.01	2.09 ± 0.04	1.90 ± 0.04**	1.88 ± 0.02**	1.67 ± 0.07**
Post. Wall(mm)	1.58 ± 0.02	1.94 ± 0.02	1.82 ± 0.01*	1.81 ± 0.04*	1.644 ± 0.11*
LVIDd	7.28 ± 0.07	8.28 ± 0.08	7.94±0.09*	7.98 ± 0.11	8.00 ± 0.25
LVIDs	4.40 ± 0.07	5.38 ± 0.09	4.85 ± 0.08**	5.12 ± 0.14	4.52 ± 0.12**
LVEDV (ml)	280.49 ± 6.06	373.54 ± 8.11	340.79 ± 9.25*	344.72 ± 10.78	349.85± 24.66
LVESV (ml)	88.72 ± 3.33	141.56 ± 5.89	111.69 ± 4.15**	127.31 ± 8.66	97.07 ± 5.54**
EF (%)	68.48 ± 0.75	62.16 ± 1.24	67.10 ± 1.33*	63.36 ± 1.37	71.67 ± 0.87**
E/E'	35.16 ± 1.54	42.17 ± 5.26	30.05 ± 0.86*	26.50 ± 2.77*	30.00 ± 2.26
RWT	0.447 ± 0.004	0.485 ± 0.014	0.469 ± 0.007	0.464 ± 0.011	0.413 ± 0.01**

Table 4. Evaluation of echocardiographic parameters. Data of all animals are presented in the first column (SHR Week 0, N=21) at the beginning of the study and data from the three groups (Control, FGY120, FGY400 Week 26) (N=7 in each groups) are indicated at the end of the treatment period. Last column represents the data of age-matched normotensive animals (WKY, N=7). Values are expressed as mean±S.E.M. Comparisons between WKY and Control groups were made by independent samples t-test. Data of Control and Treatment groups were analysed with one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. (*p<0.05, **p<0.01 vs. Control).

Effect of FGY-1153 on the interstitial fibrosis of heart and great vessels

The ANOVA analysis of interstitial fibrosis in SHR heart samples revealed no statistically significant difference between Control and Treatment groups ($p=0.783$). The collagen content however in WKY hearts was significantly lower ($p=0.025$) compared to the hypertensive Control group (Mean area fractions $\pm$ SEM: WKY: 0.390 ± 0.021 ; Control: 0.657 ± 0.069 ; FGY120: 0.636 ± 0.088 ; FGY400: 0.582 ± 0.041 ;). A statistically non-significant increase of vascular collagen could be observed in carotid arteries and aortas in Control group compared to WKY. No significant differences could be found between Control, FGY120 and FGY400 groups (Mean area fractions $\pm$ SEM: Aorta: WKY: 1.084 ± 0.112 ($p=0.536$ vs. Control); Control: 1.378 ± 0.414 ; FGY120: 1.239 ± 0.526 ; FGY400: 1.458 ± 0.324 , ($p=0.936$); Carotid arteries: WKY: 4.860 ± 0.532 ($p=0.229$ vs Control); Control: 5.994 ± 0.660 ; FGY120: 5.745 ± 1.465 ; FGY400: 5.158 ± 1.097 ; ($p=0.866$), data not shown).

Effect of FGY-1153 on the intima-media thickness of great vessels

In comparison with the Control group, the intima-media thickness (IMT) of aorta was not altered significantly ($p=0.718$) neither in the FGY120 nor in the FGY400 groups. IMT was however significantly smaller in WKY group (Fig. 6) ($p=0.0012$ vs. Control).

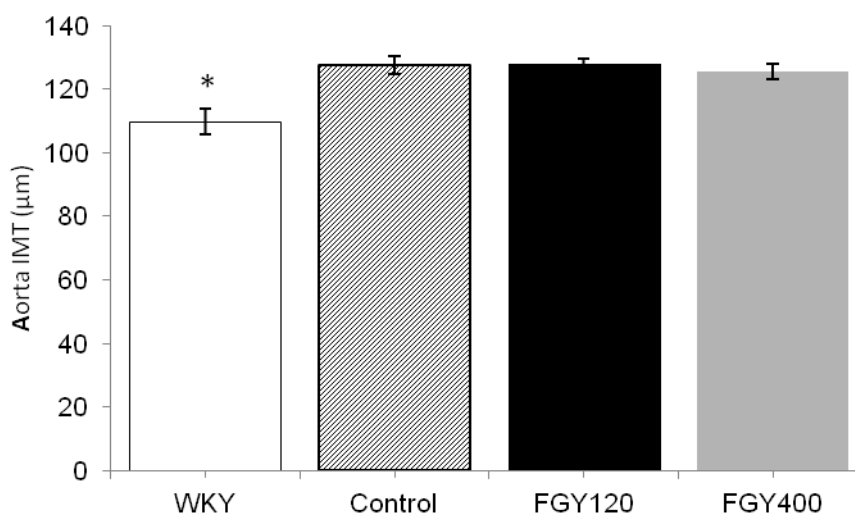


Fig. 6. Effect of FGY-1153 on the aortic intima-media thickness. (* $p<0.05$ vs. Control group).

In comparison with the Control group, the intima-media thickness of carotid vessels was slightly decreased in both the FGY120 and FGY400 groups. However the alterations were not significant ($p=0.149$). The IMT of carotid arteries was the lowest in the WKY group (Fig. 7) ($p=0.031$ vs. Control).

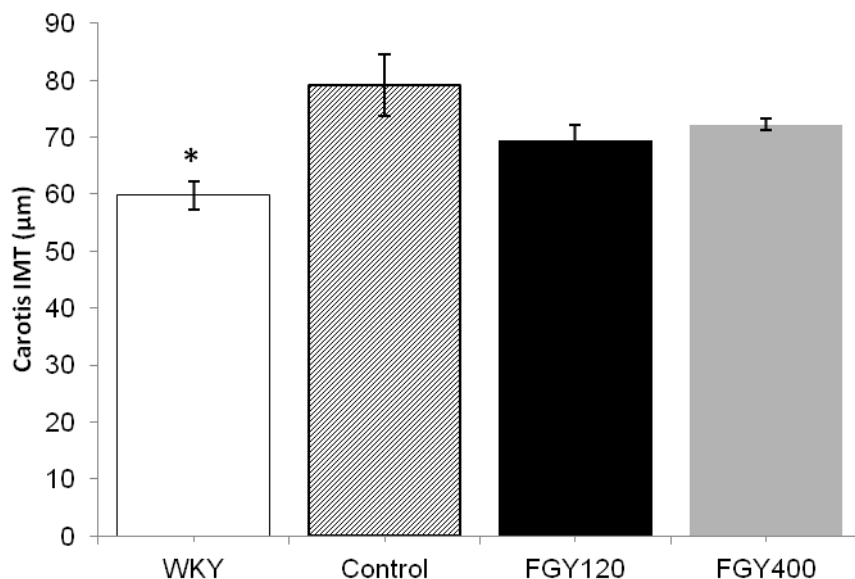


Fig. 7. Effect of FGY-1153 treatment on intima-media thickness of carotid vessels. (* $p<0.05$ vs. Control group).

Effect of FGY-1153 on the TGF β /SMAD2 signaling pathway in heart and great vessels

Western blot analysis of heart samples.

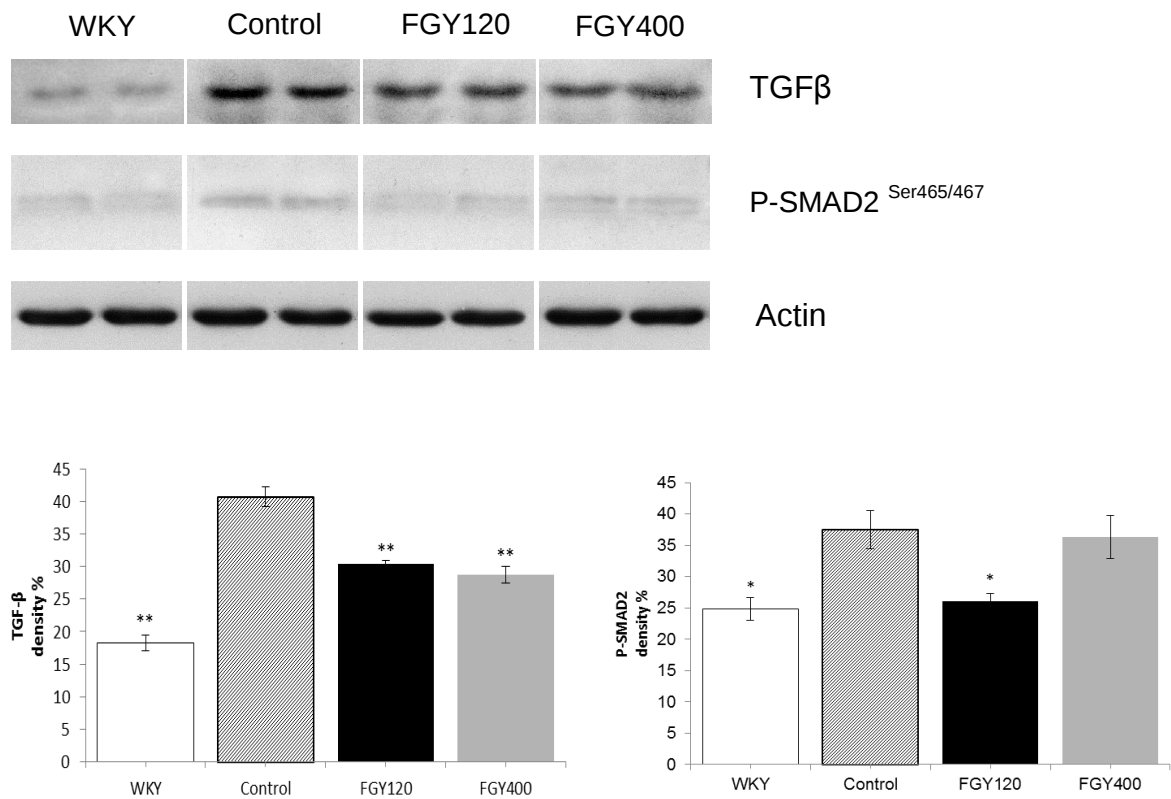


Fig. 8. The effect of FGY-1153 on the TGF β /SMAD2 signaling pathway in heart samples. Western blot analysis showed that FGY-1153 treatment inhibited the cardiac expression of TGF β and the phosphorylation of the SMAD2 protein in the FGY120 group, however the high dose treatment had no effect on the phosphorylation of SMAD2 in the FGY400 group. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Data were analysed with one-way ANOVA followed by Dunett's post-hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control

Western blot analysis of aorta samples.

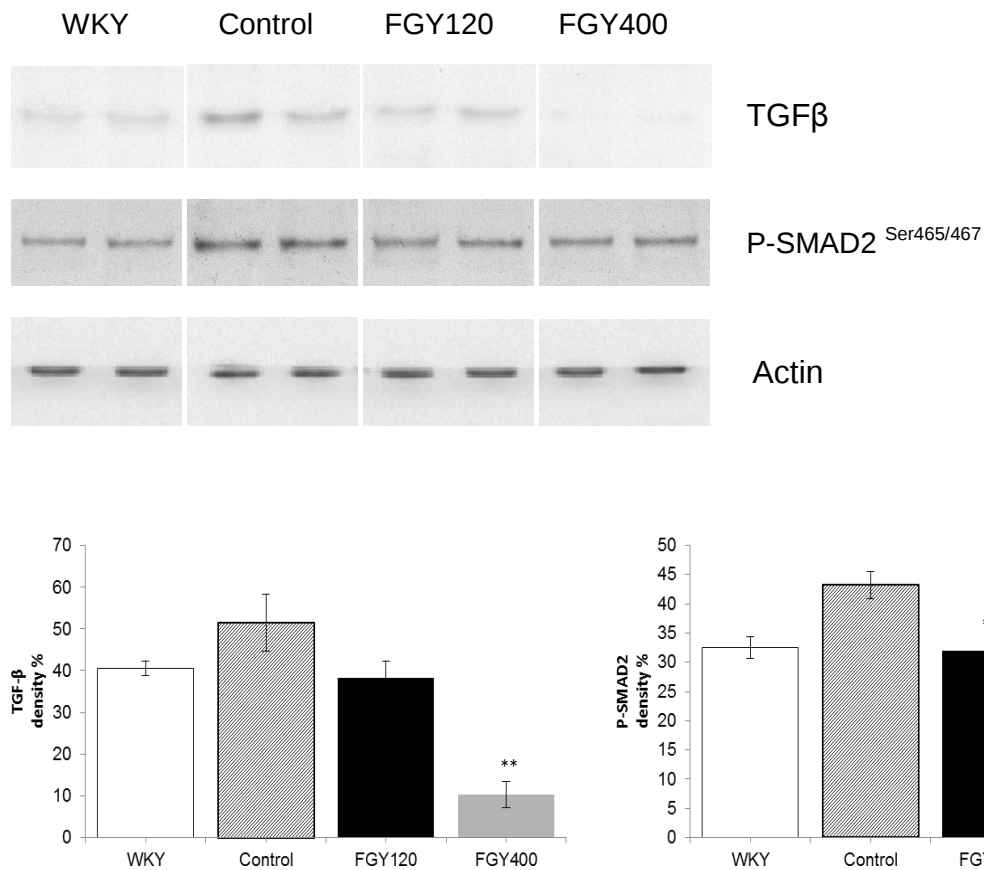


Fig. 9. The effect of FGY-1153 on the TGFβ/SMAD2 signaling pathway in the aortic wall. Western blot analysis showed that low dose FGY-1153 treatment had no significant effect on the TGFβ expression, however the high dose treatment significantly inhibited the expression of TGFβ in the FGY400 group in comparison with both the Control and FGY120 group. The phosphorylation of the SMAD2 protein was significantly decreased in both the FGY120 and in FGY400 aortic samples. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean±S.E.M. Data were analysed with one-way ANOVA followed by Dunett's post-hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control

Western blot analysis of carotis samples.

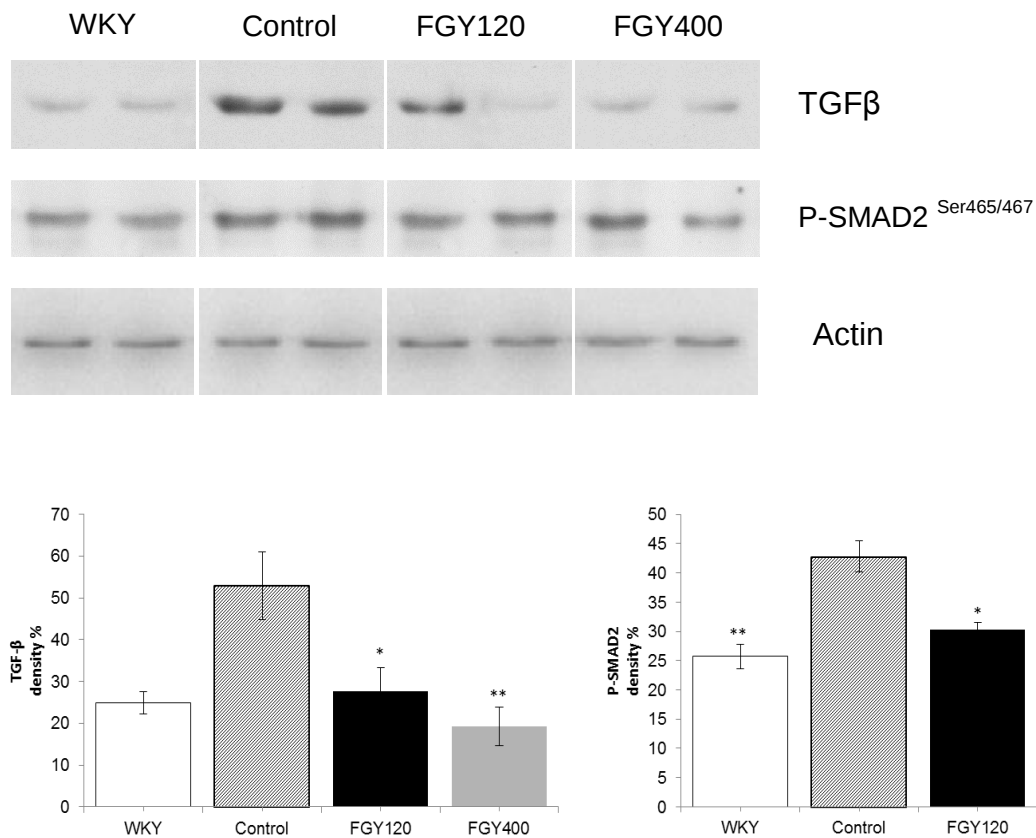


Fig. 10. The effect of FGY-1153 on the TGFβ/SMAD2 signaling pathway in the carotid arteries. Western blot analysis showed that both TGFβ expression and SMAD2 phosphorylation levels were significantly higher in Control group relative to WKY. Both high and low dose FGY-1153 treatment significantly inhibited the expression of TGFβ. The phosphorylation of the SMAD2 protein was significantly decreased in both the FGY120 and in FGY400 groups in carotid tissues. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean±S.E.M. Data were analysed by independent samples t-test between WKY and Control groups. Comparisons of Control and Treatment groups were made by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Effect of FGY-1153 on the phosphorylation of Akt/GSK-3 β signaling cascade in heart and great vessels

Western blot analysis of heart samples

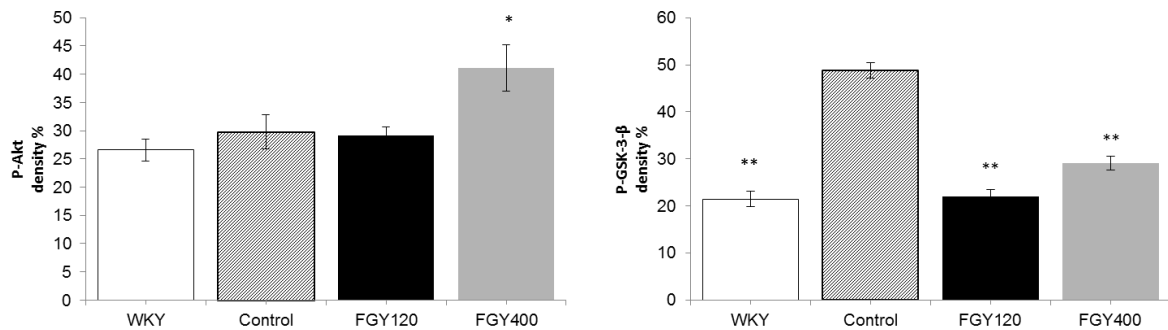
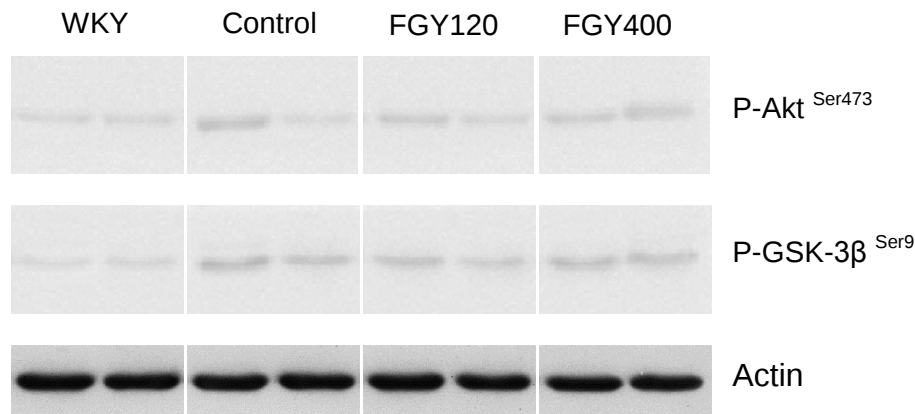


Fig. 11. The effect of FGY-1153 on the Akt/GSK-3 β signaling cascade in heart samples. Western blot analysis showed GSK-3 β phosphorylation to be significantly lower in WKY group relative to Control. High dose of FGY-1153 treatment significantly elevated phosphorylation of Akt protein, and both low dose and high dose treatment significantly attenuated the GSK-3 β phosphorylation. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Data were analysed by independent samples t-test between WKY and Control groups. Comparisons of Control and Treatment groups were made by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Western blot analysis of aorta samples.

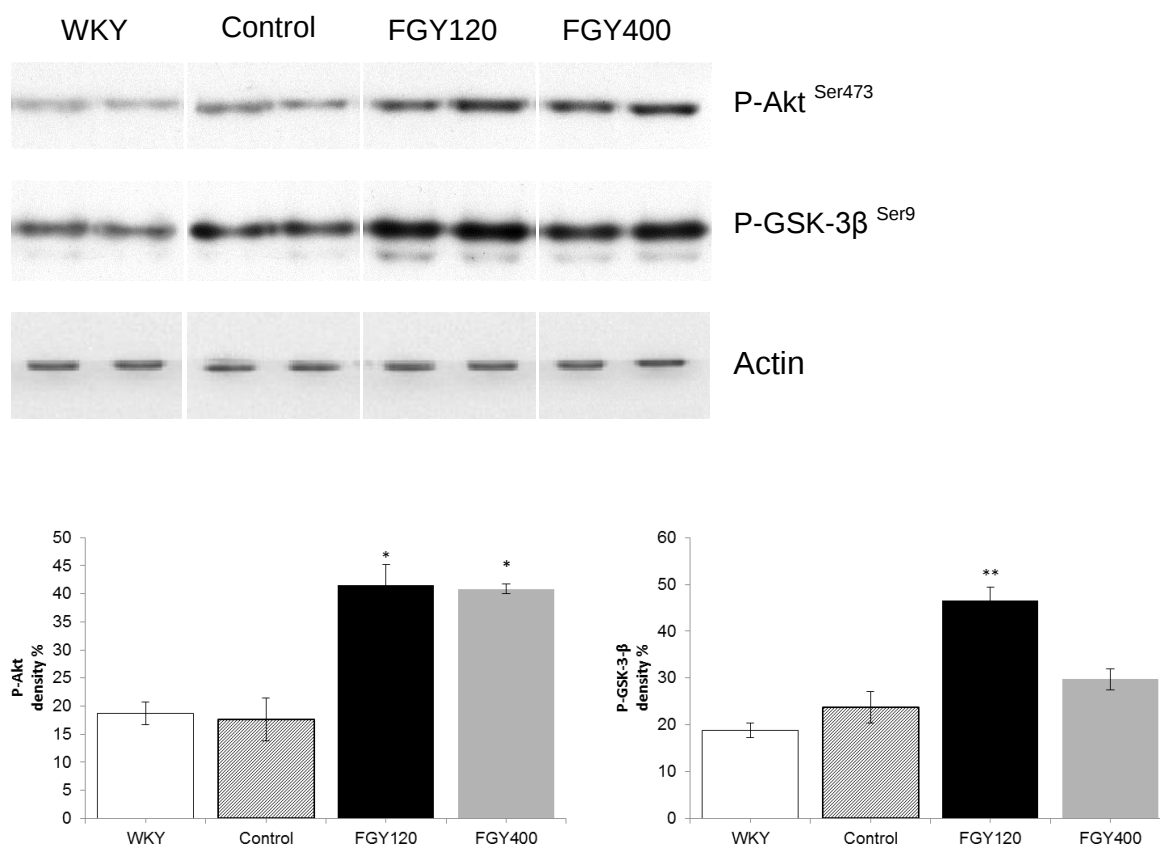


Fig. 12. The effect of FGY-1153 on the Akt/GSK-3β signaling cascade in aortic wall. Western blot analysis showed that FGY-1153 treatment significantly promoted the phosphorylation of Akt protein in the aortic tissues of both FGY120 and FGY400 groups, and the GSK-3β phosphorylation in the FGY120 group. However the high dose treatment had no effect on the GSK-3β phosphorylation in the FGY400 group. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean±S.E.M. Data were analysed by independent samples t-test between WKY and Control groups. Comparisons of Control and Treatment groups on GSK-3β data were made by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. On Akt data one-way ANOVA with Welch correction were conducted followed by Dunnett T3 post hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

Western blot analysis of carotis samples.

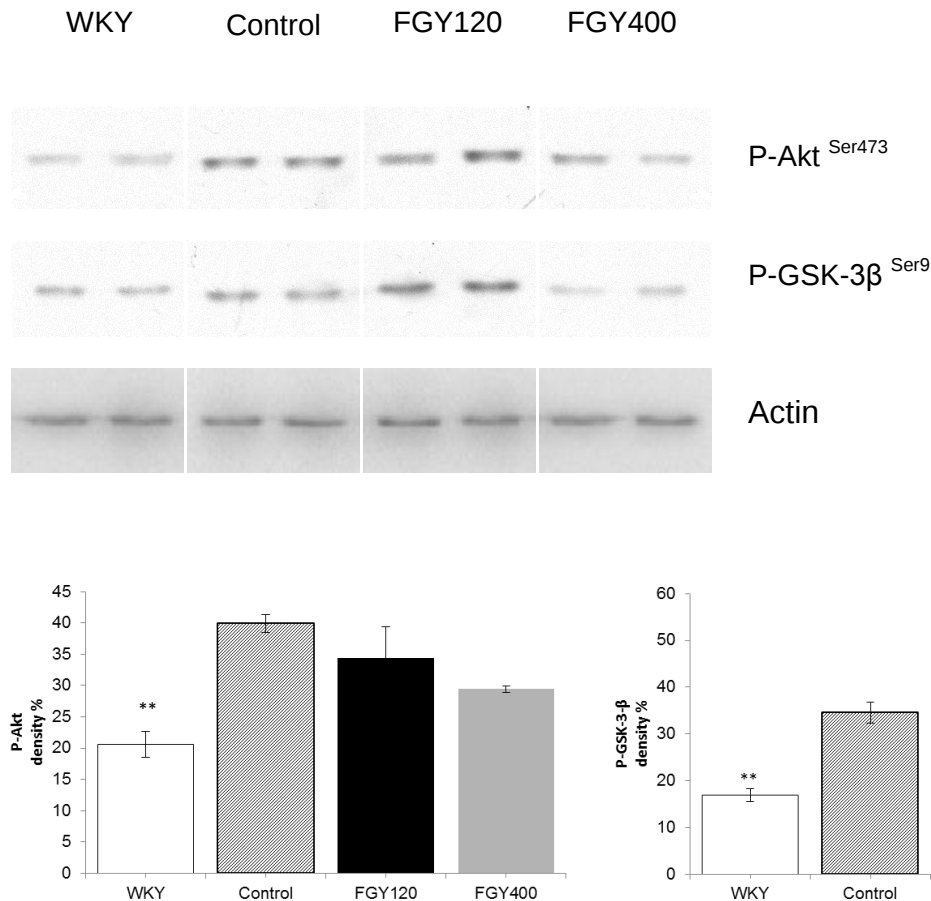


Fig. 13. The effect of FGY-1153 on the Akt/GK-3β signaling cascade in carotid vessels. Western blot analysis showed that phosphorylation level of both Akt and GSK-3β proteins were significantly higher in Control group relative to WKY. Low dose FGY-1153 treatment promoted while high dose treatment decreased the phosphorylation of GSK-3β protein, however it did not significantly influenced the Akt-1 phosphorylation in the carotid tissues of SHR rats. Actin is shown as loading control. Representative immunoblots from four experiments and densitometric evaluation are demonstrated. Data are presented as mean±S.E.M. Data were analysed by independent samples t-test between WKY and Control groups. Comparisons of Control and Treatment groups were made by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. *p<0.05, **p<0.01 vs. Control.

CONCLUSIONS

In our study, we examined the effect of a PARP inhibitor (L-2286) in SHR at the stage of the development of LV hypertrophy. L-2286 exerted a beneficial effect on the progression of myocardial hypertrophy (thickness of PW and septum, RWT) and myocardial fibrosis. In the background of these changes, we did not observe any blood pressure lowering effect of PARP-inhibition. According to our results, PARP-inhibition can exert this antihypertrophic effect due to the activation of several prosurvival (especially Akt-1/GSK-3 β , FKHR, PKC ϵ and Hsp90) and the inhibition of prohypertrophic (PKC- α/β II, - ζ/λ) protein kinases.

In conclusion, pharmacological inhibition of PARP-1 enzyme exerted significant protection against hypertensive cardiac remodeling in spite of the lack of having any antihypertensive effect. Therefore PARP can be a promising therapeutic target to prevent hypertensive cardiac complications even in those patients who do not reach the target blood pressure because of complaints or because of side effects caused by antihypertensive drug therapy. Our previous [36] and present results can introduce a new concept into the treatment of essential hypertension, namely to lower blood pressure to a more tolerable level and to prevent target organ damages by PARP-inhibition.

The long-term administration of the bradykinin B1 receptor antagonist compound FGY-1153 did not have any deleterious effects in SHR rats. Moreover we could observe some protective effect against the development of hypertensive cardiovascular remodeling despite that FGY-1153 did not have any antihypertensive effect. Inhibition of the TGF- β -Smad signaling may be the main underlying mechanism in the background of the cardiovascular protective effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were carried out at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry and the 1st Department of Medicine, Medical School of the University of Pecs between 2011 and 2014.

I would like to express my thanks to my program leader, Professor Kálmán Tóth who gave a support and useful advises during my work, and to my project leader Dr. Róbert Halmosi who managed my experiments and helped me to perform echocardiographic examinations.

I am grateful to Professor Balázs Sümegi who taught me a biochemical way of thinking. He directed my work on the field of PARP inhibitors and he ensured the possibility of undisturbed work in his department for me.

I would like to express my gratitude to Professor László Seress, Professor Róbert Gábel, Professor Kálmán Hideg who gave me useful advices and help during the experiments.

Krisztián Erős, Dr. Krisztina Szabadfi, Dr. Anita Pálfi, Dr. Éva Bartha and Noémi Bencze gave also a hand with a part of the experiments.

I am grateful to Istvánné Pásztor, Heléna Halasz, Bertalan Horváth and László Girán, who gave much assistance in the laboratory work.

I express my thanks to my family and friends for their encouraging support during my studies and work.

PUBLICATIONS OF THE AUTHOR

MOLNÁR L, KISZLER G, POLLÁK E, DERES L; Distribution pattern of γ -amino butyric acid immunoreactive neural structures in the central and peripheral nervous system of the tubificid worm, *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia* 564:(1) pp. 33-43. (2006)

MAGYAR K, DERES L, EROS K, BRUSZT K, SERESS L, HAMAR J, HIDEK K, BALOGH A, GALLYAS F JR, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R; A quinazoline-derivative compound with PARP inhibitory effect suppresses hypertension-induced vascular alterations in spontaneously hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta*. 19;1842(7):935-944. [Epub ahead of print] (2014)

DERES L, BARTHA E, PALFI A, EROS K, RIBA A, LANTOS J, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, GALLYAS F, TOTH K, HALMOSI R; PARP-inhibitor treatment prevents hypertension induced cardiac remodeling by favorable modulation of heat shock proteins, Akt-1/GSK-3 β and several PKC isoforms. *PLoS One*; 9(7): e102148. doi:10.1371/journal.pone.0102148 (2014)

Abstracts

MAGYAR K, RIBA A, VAMOS Z, BALOGH A, DERES L, HIDEK K, SUMEGI B, KOLLER A, HALMOSI R, TOTH K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the vasoprotection elicited by PARP inhibition in hypertensive rats; Paris, France, 2011.08.27. 2011. *Congress of the European Society of Cardiology, August 27-31, 2011, Paris, France [EHJ, Abstract Suppl.]*

MAGYAR K, RIBA A, VAMOS Z, BALOGH A, DERES L, KÁLAI T, HIDEK K, SERESS L, SÜMEGI B, KOLLER A, HALMOSI R, TÓTH K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of PARP-inhibition in a chronic hypertensive rat model; Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani (FAMÉ) társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája. Pécs, Magyarország, 2011.06.08-2011.06.11. (Magyar Élettani Társaság) Pécs: pp. 200-201.

VAMOS Z, CSÉPLŐ P, DERES L, IVIC I, KÓSA D, MÁTICS R, HAMAR J, KOLLER A. Aging alters Angiotensin-II-induced vasomotor responses. Osijek, Croatia, 2011.09.24. 2011. *Croatian Physiological Society Meeting, Osijek, sept. 24-25., 2011.*

VAMOS Z, CSEPLŐ P, DERES L, HAMAR J, KOLLER A. Aging dependent changes in angiotensin II-induced contractions of isolated rat carotid arteries. München, Németország, 2011.10.11-2011.10.18. 2011. *Meeting of the European Society for Microcirculation, München, okt. 11-18.,2011.*

VAMOS Z, CSÉPLŐ P, KÓSA D, DERES L, IVIC I, HAMAR J, KOLLER A. Aging alters angiotensin II - induced vasomotor responses. Correlation with changes in AT₁-receptor expression. *Hypertonia és nephrologia* 15:(S3) p. 44. (2011) *Magyar Hypertonia Társaság XIX. Kongresszusa Budapest, Magyarország, 2011.11.30-2011.12.03.*

DERES L, MAGYAR K, TAKÁCS I, ERŐS K, BALOGH A, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K, HALMOSI R. Pharmacological PARP-inhibition decreases vascular fibrosis in spontaneously hypertensive rat model; Balatonfüred, Magyarország, 2012.05.09-2012.05.12. 2012. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2012. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2012; 42:A21*

DERES L, VAMOS Z, ERŐS K, MÁTICS R, CSÉPLŐ P, HALMOSI R, SÜMEGI B, TÓTH K, KOLLER A. Subcellular aspects of AT₁-receptor mediated vasomotor responses in relation to age; Balatonfüred, Magyarország, 2013.05.08. 2013. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2013; 43:B16*

ERŐS K, DERES L, MAGYAR K, RIBA Á, HIDEG K, SERESS L, SÜMEGI B, TÓTH K, HALMOSI R. Effect of PARP-1 inhibition on the mitochondrial fragmentation in an *in vivo* SHR model; Balatonfüred, Hungary, 2013. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2013; 43:B16*

VAMOS Z, DERES L, ERŐS K, MÁTICS R, IVIC I, BERTALAN A, SIPOS E, KOLLER A, CSÉPLŐ P. Aging alters angiotensin II - induced vasomotor responses. Correlation with changes in AT₁-receptor expression. Balatonfüred, Hungary, 2013. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2013; 43:B32*

EROS K, DERES L, MAGYAR K, RIBA A, HIDEG K, SERESS L, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Effect of PARP-1 Inhibition on the Mitochondrial Fragmentation in an *in vivo* SHR Model. VII. *International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G13*

HALMOSI R, DERES L, EROS K, MAGYAR K, BARTHA E, TAKACS A, KALAI T, SERESS L, GALLYAS F, SUMEGI B, TOTH K. The Protective Effect of PARP-inhibitors Against Hypertension Induced Myocardial and Vascular Remodeling. VII. *International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G15*

MAGYAR K, TAKACS A, DERES L, EROS K, SERESS L, VAMOS Z, HIDEG K, KALAI T, BALOGH A, KOLLER A, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Pharmacological inhibition of PARP-1 Enzyme Prevents Hypertensive Vascular Remodeling. VII. *International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G20*

DERES L, EROS K, BENCZE N, SERESS L, SUMEGI B, FARKAS S, TOTH K, HALMOSI R. The effects of a bradykinin B1 receptor antagonist on the development of hypertensive organ damages; Balatonfüred, Hungary, 2014. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2014. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2014; 44:E25*

VAMOS Z, CSEPLO P, DERES L, SETALO GY Jr, MATICS R, KOLLER A. Age dependent changes in subcellular mechanism responsible for AT1-receptor mediated vasoconstriction; Balatonfüred, Hungary, 2014. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2014. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2014;44:E40*

EROS K, BARTHA E, DERES L, RIBA A, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Effect of poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition on myocardial remodeling in a chronic hypertensive rat model; Hungary, 2014. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2014. Balatonfüred, Cardiologia Hungarica 2014;44:E51*

DERES L, EROS K, BENCZE N, SERESS L, SUMEGI B, FARKAS S, TOTH K, HALMOSI R. The effects of a bradykinin b1 receptor antagonist on the development of hypertensive organ damages in SHR model; *Barcelona, Spain, Congress of the European Society of Cardiology 30. August to 03 September 2014.*

**POTENCIÁLIS FARMAKOLÓGIAI CÉLPONTOK VIZSGÁLATA HIPERTENZÍV
CÉLSZERV-KÁROSODÁS KIALAKULÁSÁBAN ÉS PROGRESSZIÓJÁBAN**

Ph.D. tézis

Szerző: Deres László

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Témavezető: Dr. Halmosi Róbert Ph.D.



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
I. sz. Belgyógyászati Klinika
Pécs
2015.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AKT	protein kináz B (PKB)
BNP	B-típusú natriuretikus peptid
BW	testtömeg
DAP	diasztolés artériás vérnyomás
EF	ejekciós frakció
ERK ½	extracelluláris szignál-regulált kináz
FS	fractional shortening
GSK-3β	glikogén szintáz kináz-3β
HF	heart failure (szívelégtelenség)
IMT	intima-media vastagság
IR	iszkémia-reperfúzió
IVS (d)	interventricular septum vastagság diasztolében
IVS (s)	interventricular septum vastagság szisztolében
JNK	c-jun N-termiális kináz
LVEDV	bal kamra végdiasztolés térfogat
LVESV	bal kamra végszisztolés térfogat
LVID (d)	bal kamra végdiasztolés diameter
LVID (s)	bal kamra végszisztolés diameter
MAP	artériás középnyomás
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NIH	National Institute of Health
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
PARP	poly(ADP-ribóz) polimeráz
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C
PW (d)	bal kamra poszterior fal vastagság diasztolében
PW (s)	bal kamra poszterior fal vastagság szisztolében
ROS	reaktív oxigén gyök
RWT	relatív falvastagság
SAP	szisztolés artériás nyomás
SHR-C	spontán hipertenzív patkány placebóval kezelve
SHR-L	spontán hipertenzív patkány L-2286-tal kezelve
SPB	szisztolés vérnyomás
TBS	TRIS-pufferelt sóoldat
TGF-β	transforming growth factor-β
TL	tibia hossz
WKY	Wistar-Kyoto patkány

Bevezetés

A magas vérnyomás az egyik legfontosabb közegészségügyi probléma középkorú és idősödő emberek körében. Fontos rizikófaktor a további kardiovaszkuláris megbetegedéseknek, mint a hirtelen szívhalál, stroke, miokardiális infarktus, szívelégtelenség, vesebetegségek. A hipertenzió kezelése az elmúlt évtizedekben keveset fejlődött így optimálisnak ma sem nevezhető. Az antihipertenzív szerek mellékhatásai, a vérnyomás csökkentése nyomán kialakuló panaszok és a nem megfelelő compliance miatt a gyakorlatban az ideális vérnyomáskontroll nehezen érhető el. Ezen túl a vérnyomás optimális tartományra történő csökkentése idősebb betegek esetében káros is lehet. Újabb kutatások az erek és a szív hipertenzió indukálta remodelációjának kivédésére fókuszálnak a magas vérnyomás csökkentése mellett vagy anélkül.

A krónikus hipertenzió állatkísérletes modellje

Az SHR állatok használata széles körben elterjedt a magas vérnyomás betegség okozta szívkárosodás és vaszkuláris remodelling kísérleti modellezésére. Az SHR állatokat eredetileg Okamoto és Aoki mutatta be, mint a genetikai hipertenzió modelljét. A hipertrófia és a romló szívfunkciók progressziója hasonló a klinikai gyakorlatban - magas vérnyomásban szenvedő betegek esetében - tapasztaltakkal. A perzisztens hipertónia az SHR állatok 6 hetes korára kifejlődik. Ezt követi a stabil hipertenzió és a kompenzatórikus hipertrófia kialakulásának viszonylag hosszabb periódusa. 18 hetes kortól már megjelenhetnek a romló szívfunkciók jelei (tachypnea, nehézlégzés).

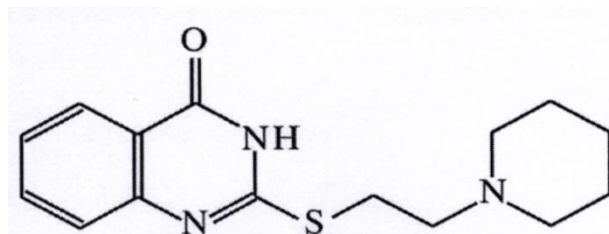
A hipertenzó másik fontos, korai következménye a vaszkuláris remodelling kialakulása, amit a vaszkuláris simaizom sejtek hipertrofiája és a megnövekedett extracelluláris mátrix produkció jellemez. A remodeláció kezdetben adaptív összetevője egy a krónikus nyomástúlerhelés hatására kialakuló folyamatnak, amely végül hozzájárul a hipertenzív célszerv-károsodás létrejöttéhez.

A PARP gátlás kardiovaszkuláris hatásai

Ismert, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim aktivációja fontos szerepet játszik a posztinfarktus és a krónikus hipertenzió indukálta szívelégtelenség kialakulásában. A PARP-1 enzim funkciója, hogy érzékeli a DNS károsodást és a jelátvitelben résztvevőként kötődjön mind az egyes, mind a kettős szálú DNS törésekhez. A károsodott DNS-hez kötődve a PARP-1 homodimereket formál és katalizálja a NAD⁺ hasítását nikotinamidra és ADP-ribózra, hogy hosszú ADP-ribóz polimereket építsen fel, melyeket a sérült DNS-szakaszokhoz és különféle fehérjékhez kapcsol.

A PARP enzim elhasználja a sejtek energiaforrásait azáltal, hogy ADP-ribóz egységeket helyez át a NAD⁺-ról nukleáris fehérjékre, mint a hisztonokra és a PARP enzimre önmagára is. Ez a folyamat a NAD⁺ és az intracelluláris ATP raktárak csökkenéséhez és a mitokondriális funkció károsodásához vezet, celluláris diszfunkciót, apoptózist és nekrozist okozva. A PARP aktiváció ROS termeléséhez,

calcium szint emelkedéshez, JNK, p38 MAP-kináz és RIP aktivációhoz vezet, melyek részt vesznek a mitokondriális membrán rendszer destabilizálásában és pro-apoptotikus enzimek felszabadulásához vezetnek a mitokondriális belső membránból, mint a Citokróm C, AIF és endonukleáz G. Továbbá a PARP enzim NF-kappaB és AP-1 transzkripció faktorokat aktivál, melyek fokozzák a kardiovaszkuláris remodellinget.



1. ábra: Az L-2286 (2-[(2-Piperidine-1-ylethyl)thio]quinazolin-4(3H)-one) szerkezeti képlete.

Korábbi kísérleteink során sikerült kimutatni az L-2286 jelű PARP-gátló vegyület (1. ábra) kedvező hatásait iszkémia-reperfúziós károsodásban, oxidatív sejtkárosodásban, valamint posztinfarktus és krónikus magas vérnyomás indukálta szívelégtelenséggel szemben. Ez a PARP-gátló molekula egy 2-mercapto-4(3H)-quinazoline származék mely - ugyan rendelkezik csekély scavenger aktivitással - az említett hatásait főként az Akt-1/GSK-3 β , MAPK és PKC jelátvitel befolyásolása révén fejti ki.

A bradykinin B1 receptor antagonisták jelentősége

A megfelelő vérnyomáskontroll elérését nehezíti az antihipertenzív gyógyszerek és néhány non-kardiovaszkuláris hatóanyag (pl. fájdalomcsillapítók, NSAID-k) interakciója is.

A fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő non-szteroid hatóanyagok használata napjainkban széleskörűen elterjedt. Sajnos e hatóanyagok mindegyike (kivéve az alacsony dózisu aspirin) jelentősen növeli a kardiovaszkuláris mortalitási és morbiditási kockázatot. Ezért tartottuk fontosnak, hogy, egy új típusú, bradykinin B1 receptor antagonistá analgetikum kardiovaszkuláris hatásait vizsgáljuk. Korábbi kutatásokban beszámoltak már egyes bradykinin B1 receptor antagonisták kedvező hatásairól bizonyos szív- és érrendszeri megbetegedésekben.

A kininek biológiailag aktív peptidek melyek számos fiziológiai folyamatban játszanak fontos szerepet, pl. vazodilatáció, inflammáció vagy a fájdalomérzet kialakítása. E folyamatok mediációja a bradykinin B1 és B2 receptorokon keresztül történik. A B2 receptor konstitutívan expresszálódik, ligandjai az intakt kininek, bradykinin és kallidikin. Közvetíti az ACE-gátlók kedvező hatásait és fontos szerepe van a gyulladásos folyamatok akut fázisának kialakításában. Ezzel szemben a B1 receptorokat a kininek karboxipeptidáz metabolitjai aktiválják, des-Arg9-BK és des- Arg10-kallidin. A B1 receptor expressziója normál körülmények között alacsony, de pl. szöveti sérüléskor, citokinek és

endotoxinok hatására gyors receptor-upreguláció zajlik le, ligand-indukálta receptor-internalizáció viszont nem jellemzi. A B1 receptor fontos mediátora a krónikus gyulladásos folyamatok és a fájdalomérzet kialakításának ezért lehet egy új farmakológiai célpont ezen állapotok kezelésében, káros szív- és érrendszeri hatások nélkül.

Célkitűzések

A jelen kísérlet célja, hogy bizonyítsa a PARP gátló L-2286 protektív hatását a hipertenzív kardiális remodelling kialakulásának korai szakaszában in vivo SHR modellben.

- Jelen kísérlet célja hogy a PARP-gátlás kardioprotektív hatásának új molekuláris mechanizmusait tárja fel.
- Vizsgáltuk a kardiális fibrózisra gyakorolt hatását.
- Megvizsgáltuk, hogy a PARP gátló L-2286 kedvezően befolyásolja-e a kardiális remodellingben érintett jelátviteli utak mintázatát.

Második kísérletünkben az FGY-1153 bradykinin B1 receptor antagonistá hatásait vizsgáltuk hipertenzív célszerv-károsodás kialakulásában, SHR modellben.

- Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonizmus testtömegre, tápfogyasztásra, és vérnyomásra gyakorolt hatását.
- Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonizmus hatását a hipertenzió indukálta kardiovaszkuláris remodellingre (intima media vastagság, interstitialis fibrózis, bal kamra hipertrófia).
- Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonistá esetleges kedvező hatásait a kardiovaszkuláris remodellingben érintett jelátviteli utakra.

A PARP GÁTLÁS HATÁSA A KARDIÁLIS REMODELLINGBEN

A PARP gátlás hatása spontán hipertenzív patkányok gravimetrikus paramétereire

A testtömeg a vizsgálat kezdetén nem tért el szignifikáns mértékben a három csoport között (WKY: $71,01 \pm 0,11$ g, SHR-C: $72,03 \pm 2,36$ g, SHR-L: $69,92 \pm 3,21$ g, 6 hetes korban). Azonban a 24 hetes kezelési periódus végén a WKY csoport testtömege jelentősen magasabb volt, mint az SHR-C és az SHR-L csoportok értékei. (WKY: $392,7 \pm 14,01$ g, SHR-C: $323,8 \pm 11,27$ g, SHR-L: $321,9 \pm 6,84$ g, $p < 0,01$ WKY vs. SHR csoportok, 30 hetes korban). A miokardiális hipertrófia mértékét a kamra súly / testtömeg arányával határoztuk meg (WV/BW, mg/g). Ez a paraméter szignifikánsan megemelkedett az SHR csoportokban a WKY csoporthoz képest (WV/BW: WKY: $2,95 \pm 0,17$, SHR-C: $4,48 \pm 0,12$, SHR-L: $3,85 \pm 0,15$, $p < 0,05$ WKY vs. SHR csoportok). Hasonló eredményeket kaptunk a kamrasúly esetében is (WV, WKY: $1,16 \pm 0,17$ g, SHR-C: $1,45 \pm 0,18$ g, SHR-L: $1,24 \pm 0,24$ g, $p < 0,05$ WKY vs. SHR csoportok). A WV és WV / BW arány szignifikánsan csökkent az L-2286 kezelés hatására ($p < 0,05$ SHR-L vs. SHR-C). A tüdő száraz tömeg/nedves tömeg aránya nem emelkedett szignifikáns mértékben az SHR-C és SHR-L csoportokban a WKY csoporttal összehasonlítva (1. táblázat). Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy a szívelégtelenség még nem, de a szívhypertrofia már megjelent az SHR-C csoportban ami az SHR-L csoportban mérséklődött.

	WKY	SHR-C	SHR-L
BW ^{6w} (g)	$71,01 \pm 1,89$	$72,02 \pm 2,36$	$69,9 \pm 3,21$
BW ^{30w} (g)	$393 \pm 14,01$	$323,8 \pm 11,27^a$	$321,86 \pm 6,8^{a,c}$
WV (g)	$1,16 \pm 0,17$	$1,45 \pm 0,18^b$	$1,24 \pm 0,24^{b,c}$
WV/BW (mg/g)	$2,95 \pm 0,17$	$4,48 \pm 0,12^b$	$3,85 \pm 0,15^{b,c}$
Lung wet weight/dry weight	$4,84 \pm 0,92$	$4,79 \pm 0,84$	$4,77 \pm 0,99$
p-BNP (ng/ml)	$2,19 \pm 0,011$	$2,33 \pm 0,034$	$2,31 \pm 0,031$

1. táblázat: L-2286 kezelés hatása a gravimetrikus paraméterekre és a plazma BNP szintre SHR patkányokban. WKY: normotenzív koregyeztetett kontroll patkányok (n=7), SHR-C: SHR kontroll patkányok (n=8), SHR-L: 24 hétig L-2286-tal kezelt SHR patkányok (n=9). BW^{6w}: 6 hetes patkányok testsúlya, BW: testsúly, WV: kamrák súlya, BNP: B-típusú natriuretikus peptid. $\pm$ S.E.M. ^a $<0,01$ (vs. WKY), ^b $<0,05$ (vs. WKY), ^c $<0,05$ (vs. SHR-C).

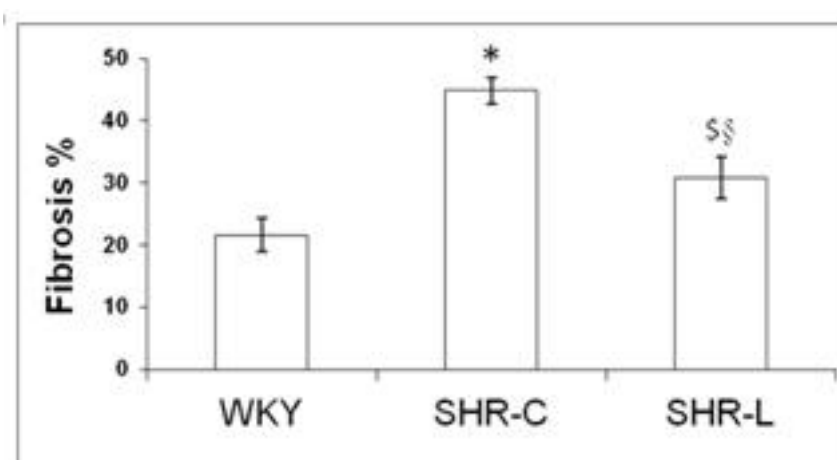
Az L-2286 kezelés nem befolyásolta a BNP plazma szintjét és a vérnyomást

A plazma BNP szint az SHR-C és az SHR-L csoportokban enyhén emelkedett (nem jelentős a WKY csoporthoz képest). A plazma BNP szint enyhén emelkedett az SHR-C csoportban az SHR-L

csoporthoz képest, ez a különbség nem szignifikáns (1. táblázat). A vérnyomás mindkét SHR csoportban magasabb volt a WKY csoporthoz viszonyítva ($p < 0.05$). Az L-2286 kezelés nem csökkentette a vérnyomást (3. táblázat).

Az L-2286 csökkentette az intersticiális fibrózist a szívizomban

A szövettani vizsgálat az intersticiális kollagén nem számottevő felhalmozódását mutatta ki a WKY csoportban. A krónikus magas vérnyomás jelentősen magasabb kollagén lerakódást okozott az SHR-C patkányokban, míg a SHR-L csoportban ez az elváltozás szignifikáns mértékben csökkent ($p < 0.05$) (2. ábra).



2. ábra: Az L-2286 kezelés csökkentette az intersticiális kollagén mennyiségét. WKY: normotenzív koregyezettett kontroll patkányok, SHR-C: 30 hetes spontán hipertenzív patkányok, SHR-L: 30 hetes patkányok, 24 hétig L-2286-tal kezelve, denzitometriás értékek. $p < 0.01$ vs. WKY, § $p < 0.05$ vs. WKY, § $p < 0.05$ vs. SHR-C.

A PARP gátlás csökkentette a bal kamra hipertrófiát spontán hipertenzív patkányokban

A kísérlet kezdetén nem volt szignifikáns különbség a három csoport echokardiográfiás paramétereinek között. (2. táblázat). 30 hetes korban nem volt szignifikáns különbség az LV szisztolés funkciókban (EF és FS). A WKY és SHR csoportok pulzusszáma az altatás alatt nem tért el jelentősen egymástól. LVESV és LVEDV értékek szignifikánsan emelkedtek az SHR csoportokban ($p < 0.05$ WKY vs. SHR-C és SHR-L) és ezeket a kedvezőtlen változásokat nem csökkentette az L-2286 kezelés. A septum vastagság, a posterior fal vastagság és relatív falvastagság is megnőtt az SHR csoportokban (jelezve a kamrai hipertrófia jelenlétét) a WKY csoporttal összehasonlítva ($p < 0.05$) és ezeket az elváltozásokat az L-2286 kezelés szignifikáns mértékben csökkentette ($p < 0.05$ SHR-C vs. SHR-L group) (3. táblázat).

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

2. táblázat: Echokardiográfiás paramétereket 6 hetes SHR állatokban WKY: normotenzív koregyeztetett kontroll patkányok, n=7; SHR-C: SHR kontroll patkányok, n=8; SHR-L: n=9, 24 hétig L-2286-tal kezelt SHR. EF^{30w}: ejekciós frakció, F^{30w}: fractional shortening, LVEDV^{30w}: LV vég-diasztolés térfogat, LVESV^{30w}: LV vég-szisztolés térfogat, Septum^{30w}: septum vastagság, PW^{30w}: posterior fal vastagság, , LV mass^{30w}: LV tömeg. ±S.E.M.

	WKY	SHR-C	SHR-L
SAP ^{30w} , (mmHg)	129±7	192±9 ^a	186±5 ^a
DAP ^{30w} , (mmHg)	89±5	127±8 ^a	125±4 ^a
MAP ^{30w} , (mmHg)	103±7	149±5 ^a	146±7 ^a
EF (%) ^{30w}	69.1±2.4	68.72±2.1	69.01±3.2
FS ^{30w}	39.8±1.9	39.04±1.85	40.57±2.66
LVEDV ^{30w} (ml)	279.18±18.18	335.87±10.36 ^a	326.94±9.18 ^a
LVESV ^{30w} (ml)	85.77±8.56	96.85±10.36 ^a	99.81±11.85 ^a
Septum ^{30w} (mm)	1.43±0.04	1.93±0.04 ^a	1.79±0.05 ^{a,b}
PW ^{30w} (mm)	1.54±0.08	2.15±0.12 ^a	1.87±0.03 ^{a,b}
RWT ^{30w}	0.38±0.05	0.504±0.02 ^a	0.445±0.012 ^{a,b}
LV mass ^{30w} (uncorrected) (mg)	1002.81±59.5	1370.35±79.87 ^a	1121.13±53.23 ^{a,b}
LV mass ³⁰ /BW ³⁰ (mg/g)	2.73±0.7	4.23±0.8 ^a	3.70±0.3 ^{a,b}

3. Táblázat: Az L-2286 kezelés mérsékelten csökkentette az LVHT echokardiográfiás jeleit 30 hetes SHR állatokban. WKY: normotenzív koregyeztetett patkányok, n=7, SHR-C: SHR kontroll állatok, n=8, SHR-L: n=9, 24 hétig L-2286-tal kezelt SHR. EF^{30w}: ejekciós frakció, F^{30w}: fractional shortening, LVEDV^{30w}: LV vég-diasztolés térfogat, LVESV^{30w}: LV vég-szisztolés térfogat, Septum^{30w}: septum vastagság, PW^{30w}: posterior falvastagság, RWT^{30w}: relatív falvastagság, LV mass^{30w}: LV tömeg. SAP, DAP, MAP^{30w}: szisztolés, diasztolés

és artériás középnyomás 30 hetes korban (n=3). $\pm$ S.E.M. ^ap<0.05 (vs. WKY), ^bp<0.05 (vs. SHR-C), ^cp<0.05 (vs. SHR-C).

Az L-2286 kezelés hatása a poli-ADP-ribozilációra, az Akt-1^{Ser473}/GSK-3 β ^{Ser9} és az FKHR^{Ser256} foszforilációjára

Akt-1^{Ser473} foszforilációja a WKY csoportban mérsékelt volt. Az SHR-C csoportban az Akt-1^{Ser473} foszforilációja kifejezettebb (p<0.01 vs. WKY). Ugyanakkor az SHR-L állatokban az L-2286 kezelés hatására tovább fokozódott az Akt-1^{Ser473} foszforiláció (p<0.01 vs. WKY and SHR-C). Ugyanezt az eredményt tapasztaltuk a GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációjában is.

Az L-2286 hatásosságának kimutatására vizsgáltuk az ADP-riboziláció mértékét Western-blottal. A legalacsonyabb ADP-ribozilációt az SHR-L csoportban detektáltuk. Az SHR-C csoportban az ADP-riboziláció fokozottan jelen volt (p<0.05 vs. WKY). Az Akt-1^{Ser473} másik targetje (GSK3 β ^{Ser9} mellett) a FKHR^{Ser256} transzkripciós faktor. Az Akt-1^{Ser473} foszforilációjának megfelelően, a legnagyobb mértékű foszforilációt (azaz inhibíciót) az SHR-L csoportban tapasztaltunk (p<0.01 vs. SHR-C and WKY). Az FKHR legalacsonyabb foszforilációja, azaz legnagyobb aktivitása az SHR-C csoportban volt megfigyelhető (p<0.05 vs. WKY).

Az L-2286 hatása a Hsp72 és 90 mennyiségére

A Hsp72 esetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A Hsp90 azonban megemelkedett az SHR-L csoportban a WKY és SHR-C csoportokhoz képest (p<0.01 SHR-L vs. WKY vagy SHR-C), e protein legalacsonyabb szintjét a WKY mintákban mértük.

Az L-2286 hatása a MAPK-ra

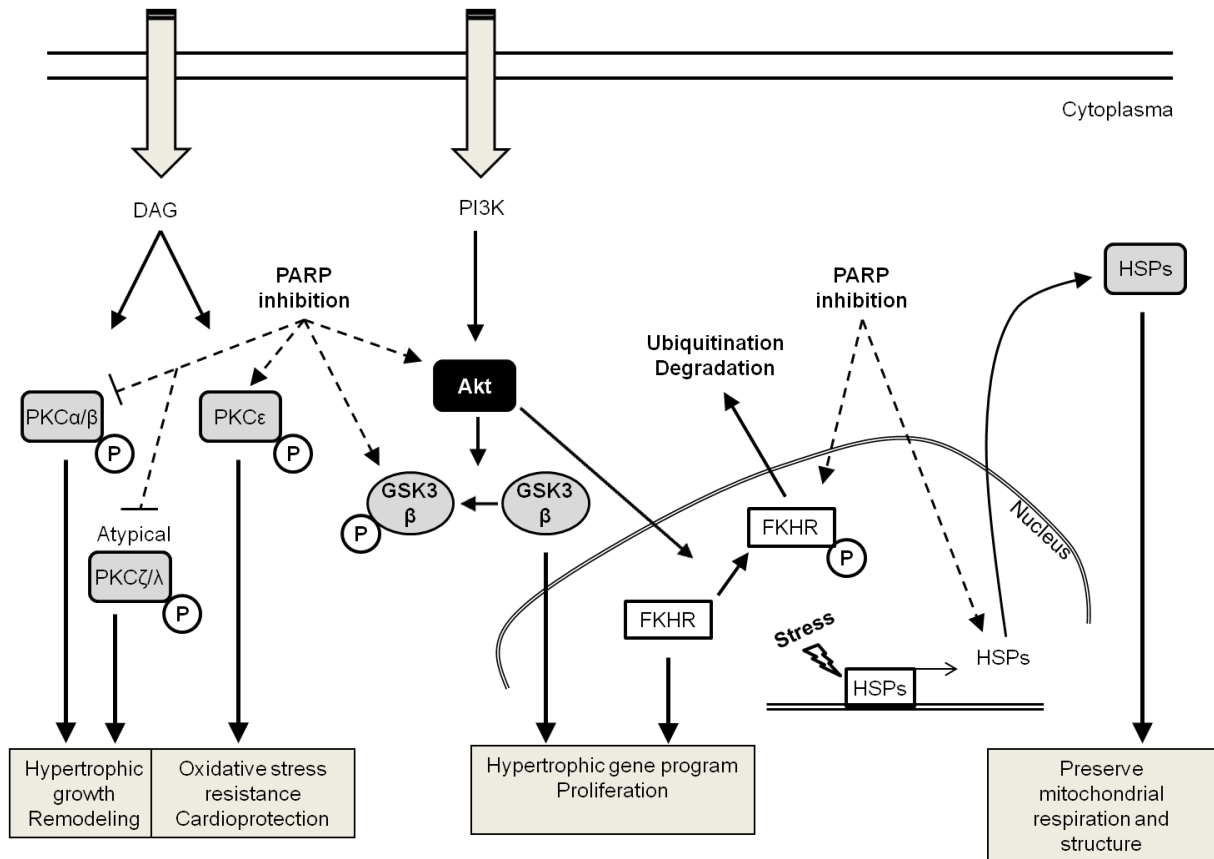
A p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}, ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} és JNK foszforilációja a WKY csoportban bizonyult a legalacsonyabbnak az SHR-C és SHR-L csoportokhoz képest (p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}: p<0.01 vs. SHR csoportok, ERK 1/2: p<0.05 vs. SHR csoportok, JNK: p<0.05 vs. SHR csoportok). A p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182} és JNK esetében foszforilációjuk emelkedett volt mind az SHR-C, mind az SHR-L csoportokban, de a csoportok között szignifikáns különbség nem mutatkozott.

Az ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} aktiváció szignifikánsan magasabb volt az SHR-C és SHR-L csoportokban, de a két csoport között - az L-2286 kezelés hatására - nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

Az L-2286 kezelés hatása a PKC izoformák foszforilációjára

A total (pan) PKC (pan β II^{Ser660}) foszforiláció alacsonynak bizonyult a WKY csoportban és szignifikánsan magasabb volt az SHR-C és SHR-L csoportokban (p<0.01 WKY vs. SHR). Az L-2286 kezelés nem volt befolyással a PKC pan β II Ser⁶⁶⁰ foszforilációjára az SHR-L csoportban az SHR-C csoporthoz viszonyítva.

A PKC α/β ^{Thr638/641}, δ ^{Thr505}, ζ/λ ^{Thr410/403} és ϵ ^{Ser729} esetében a legalacsonyabb foszforilációt a WKY csoportban figyeltük meg ($p < 0.01$ vs. SHR csoportok). A PKC ζ esetében kombinált antitestet használtunk (PKC ζ/λ Thr^{410/403}), mely nem különbözteti meg a PKC ζ és λ izoformákat. PKC λ magas strukturális homológiát mutat a PKC ζ -val. Az L-2286 kezelés szignifikánsan csökkentette a PKC α/β ^{Thr638/641} és ζ , míg emelte az ϵ ^{Ser729} foszforilációját (PKC α/β ^{Thr638/641}, ζ , ϵ ^{Ser729}: $p < 0.01$, SHR-L vs. SHR-C). A PKC δ ^{Thr505} esetében nem volt szignifikáns különbség a két SHR csoport között.

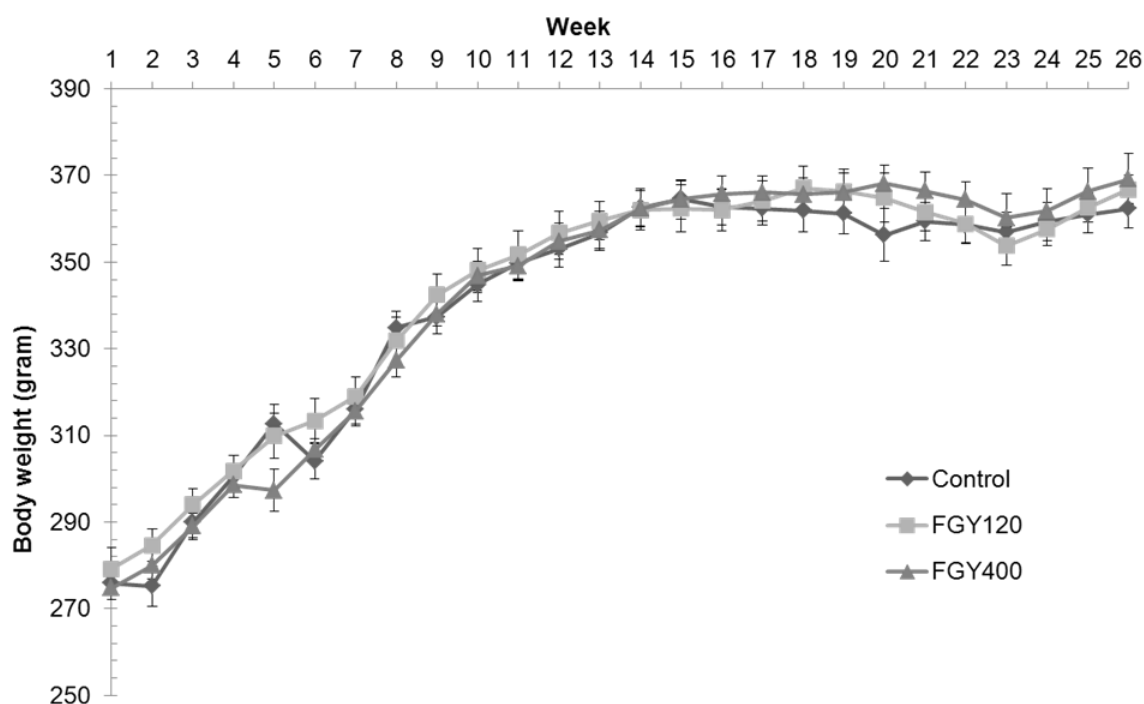


3. ábra: Az L-2286 hatása a vizsgált jelátviteli utakra.

EGY BRADYKININ B1 RECEPTOR ANTAGONISTA HATÁSA HIPERTENZÍV CÉLSZERV-KÁROSODÁSBAN

Az FGY-1153 kezelés hatása a testtömegre

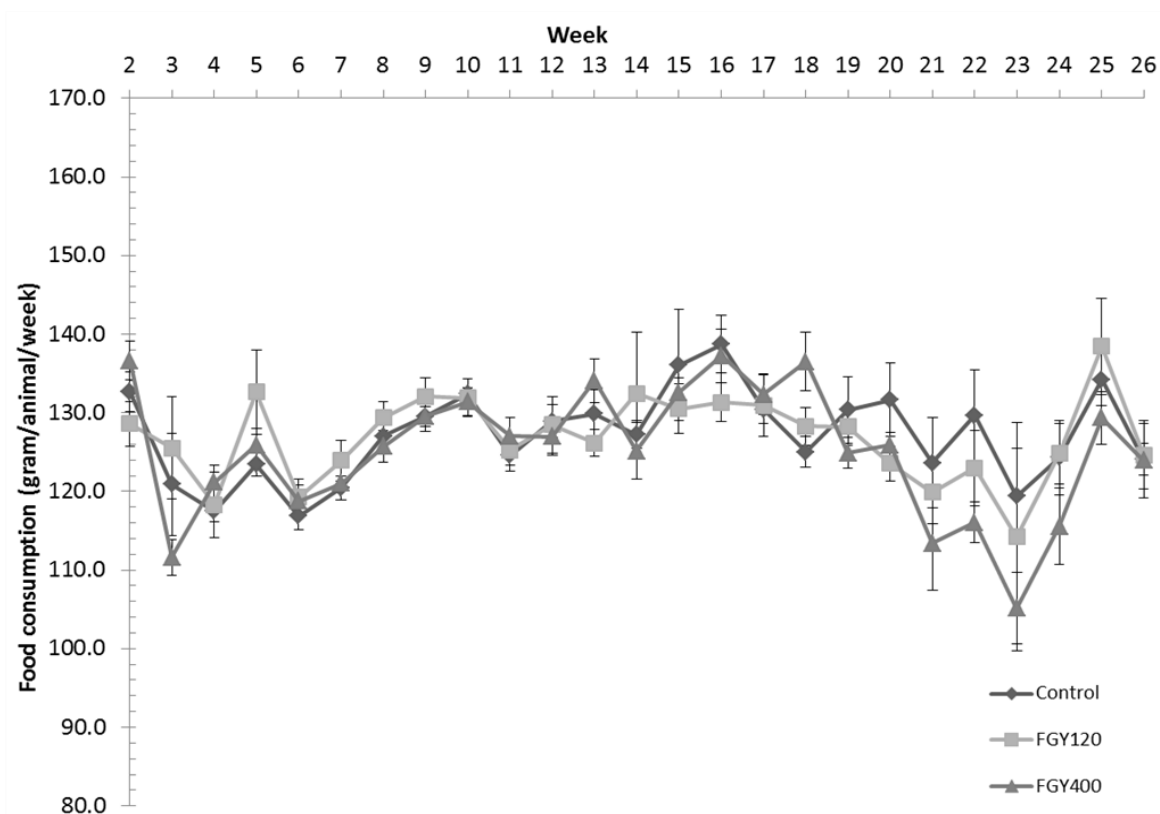
A testtömeget a kezelés időtartama alatt hetente mértük és rögzítettük. Nem volt szignifikáns különbség a három csoport között. (4. ábra)



4. ábra: Az FGY-1153 testtömegre gyakorolt hatása a kezelés időtartama alatt. $\pm$ S.E.M. One-way ANOVA

Az FGY-1153 kezelés tápfogyasztásra gyakorolt hatása

Az elfogyasztott táp mennyiségét hetente rögzítettük a kezelés időtartama alatt. Szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a három csoport tápfogyasztása között (5. ábra).



5. ábra: FGY-1153 tápfogyasztásra gyakorolt hatása a kezelés időtartama alatt. $\pm$ S.E.M, one-way ANOVA.

Az FGY-1153 kezelés hatása a vérnyomásra

A vizsgálat kezdetekor nem volt szignifikáns különbség a csoportok artériás vérnyomásaiban (Kontroll: 178.71 ± 3.488 mm Hg, FGY120: 172.47 ± 3.810 mm Hg, FGY400: 174.53 ± 2.303 mm Hg, $p=0.374$). Az FGY-1153 kezelés nem volt szignifikáns hatással a vérnyomásra, sem a 13. hét, sem a 26. hét adatait tekintve. Az átlagos arteriális vérnyomás értékek nem tértek el szignifikáns mértékben a két kezelt csoport között a 13. héten (Kontroll: 215.93 ± 6.114 mm Hg, FGY120: 212.73 ± 5.682 mm Hg, FGY400: 228.80 ± 4.488 mm Hg, $p=0.096$) és a 26. héten (Kontroll: 256.36 ± 8.039 mm Hg, FGY120: 256.80 ± 7.693 mm Hg, FGY400: 275.33 ± 3.067 mm Hg, $p=0.078$). Ugyanakkor látható hogy az FGY-400 csoportban a vérnyomás valamivel magasabb a másik két csoporthoz képest, az eltérés nem szignifikáns.

Az FGY-1153 kezelés hatása az echokardiográfiás paraméterekre

A vizsgálat kezdetéhez képest a septum és a posterior fal vastagsága növekedett mindegyik csoportban a kezelés ideje alatt. Azonban mind az alacsony-, mind a magas dózisú kezelés jelentősen csökkentette ezen paramétereket, a magas vérnyomás okozta bal kamrai hipertrófiát.

LVIDs és az LVESV is megnövekedett minden csoportban a vizsgálat során, bár ezen paraméterek növekedése jelentősen csökkent az FGY120 csoportban, de a FGY400 csoportban nem. A bal kamrai szisztolés funkció – ejekciós frakcióban kifejezve (EF%) - csökkenő paramétereket mutatott mind a Kontroll csoportban, mind az FGY400 csoportban a vizsgálat végére a kezdeti paraméterekhez képest. Összehasonlítva a Kontroll csoporttal ezek a változások azonban jelentősen csökkentek az FGY120 csoportban jelezve, hogy az alacsony dózisú FGY-1153 visszafogta a magas vérnyomás okozta csökkent szisztolés balkamra funkció kialakulását. Az E / E 'arány növekvő tendenciát mutatott a vizsgálat során a kontroll csoportban, miközben ezen paraméter szignifikánsan csökkent mind a FGY120, mind FGY400 csoportokban. Ez arra utalhat, hogy az FGY-1153 kezelés képes csökkenteni az SHR patkányokban megjelenő diasztolés diszfunkciót.

A 4. táblázat utolsó oszlopában a koregyeztetett normotenzív állatokat (WKY csoport) jellemző struktúrális és funkcionális paraméterek értékei láthatóak.

	SHR Week 0	Control Week 26	FGY120 Week 26	FGY400 Week 26	WKY age-matched
Septum (mm)	1.66 ± 0.01	2.09 ± 0.04	1.90 ± 0.04**	1.88 ± 0.02**	1.67 ± 0.07**
Post. Wall (mm)	1.58 ± 0.02	1.94 ± 0.02	1.82 ± 0.01*	1.81 ± 0.04*	1.644 ± 0.11*
LVIDd	7.28 ± 0.07	8.28 ± 0.08	7.94 ± 0.09*	7.98 ± 0.11	8.00 ± 0.25
LVIDs	4.40 ± 0.07	5.38 ± 0.09	4.85 ± 0.08**	5.12 ± 0.14	4.52 ± 0.12**
LVEDV (ml)	280.49 ± 6.06	373.54 ± 8.11	340.79 ± 9.25*	344.72 ± 10.78	349.85 ± 24.66
LVESV (ml)	88.72 ± 3.33	141.56 ± 5.89	111.69 ± 4.15**	127.31 ± 8.66	97.07 ± 5.54**
EF (%)	68.48 ± 0.75	62.16 ± 1.24	67.10 ± 1.33*	63.36 ± 1.37	71.67 ± 0.87**
E/E'	35.16 ± 1.54	42.17 ± 5.26	30.05 ± 0.86*	26.50 ± 2.77*	30.00 ± 2.26
RWT	0.447 ± 0.004	0.485 ± 0.014	0.469 ± 0.007	0.464 ± 0.011	0.413 ± 0.01**

4. táblázat: Echokardiográfiás paraméterek értékelése. Az SHR állatok vizsgálat kezdetén mért adatai a az első oszlopban kerülnek bemutatásra, (SHR Week 0, N=21) a három csoportból származó adatok (Control, FGY120, FGY400 Week 26) (N=7 in each groups) a kezelési időszak végét jelölik. Az utolsó oszlop mutatja a koregyeztetett normotenzív állatok adatait (WKY, N=7). Az értékek átlagértékek ±S.E.M. (*p<0.05, **p<0.01 vs. Control).

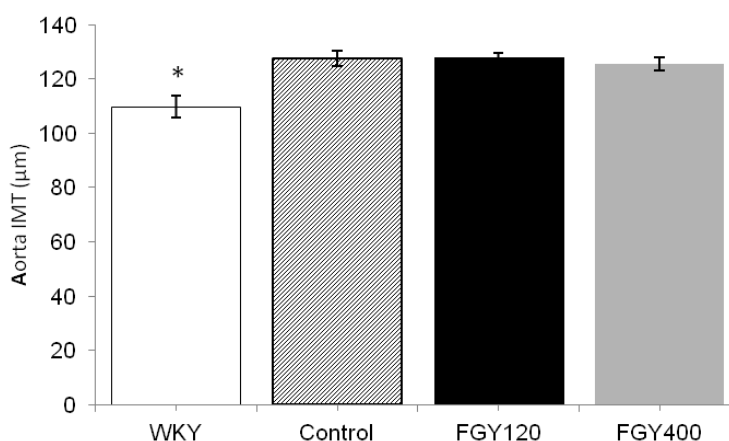
Az FGY-1153 hatása az intersticiális fibrózisra a szívben és a nagyerekben

Az SHR szívmintákon mért intersticiális fibrózis adatok ANOVA analízise nem mutatott ki szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoportok között (p=0.783). Azonban a WKY csoportban a kollagén mennyisége szignifikáns mértékben alacsonyabb a hipertenzív Kontroll csoportéhoz képest (Mean area fractions ± SEM: WKY: 0.390±0.021; Kontroll: 0.657±0.069; FGY120: 0.636±0.088; FGY400: 0.582±0.041; 6.ábra). A vaszkuláris kollagén mennyiségének statisztikailag nem

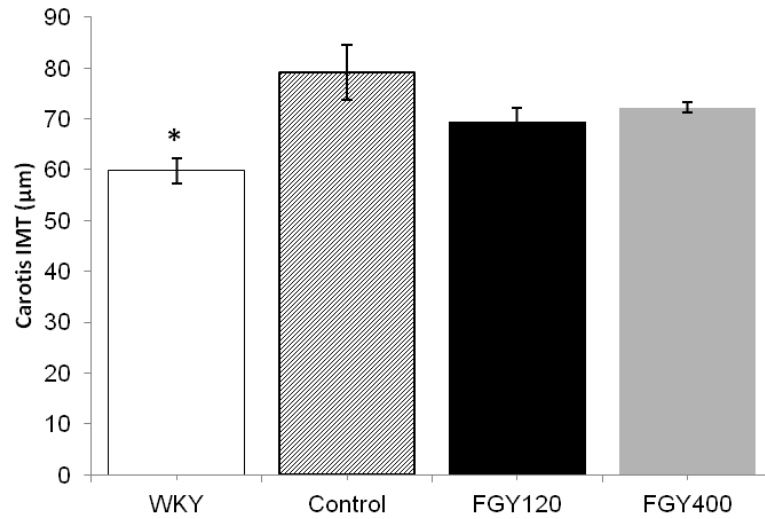
szignifikáns emelkedése figyelhető meg a Kontroll csoport carotisaiban és az aortáiban a WKY csoporthoz képest. A Kontroll, FGY120 és FGY400 csoportok értékei között szignifikáns különbség azonban nem mutatkozott (Mean area fractions $\pm$ SEM: Aorta: WKY: 1.084 ± 0.112 ($p=0.536$ vs. Kontroll); Kontroll: 1.378 ± 0.414 ; FGY120: 1.239 ± 0.526 ; FGY400: 1.458 ± 0.324 , ($p=0.936$); Carotis: WKY: 4.860 ± 0.532 ($p=0.229$ vs. Kontroll); Kontroll: 5.994 ± 0.660 ; FGY120: 5.745 ± 1.465 ; FGY400: 5.158 ± 1.097 ; ($p=0.866$)).

Az FGY-1153 hatása a nagyerek intima media vastagságára

Az aorta esetében a Kontroll csoporttal összevetve sem az FGY120 sem az FGY400 csoport intima media vastagsága nem tért el szignifikáns mértékben. A WKY csoportban ugyanakkor, az IMT szignifikáns mértékben kisebb ($p=0.0012$ vs. Kontroll) mint a hipertenzív Kontroll csoportban (6.ábra).



6.ábra: Az FGY-1153 hatása az aorta intima media vastagságára. (* $p<0.05$ vs. Kontroll).

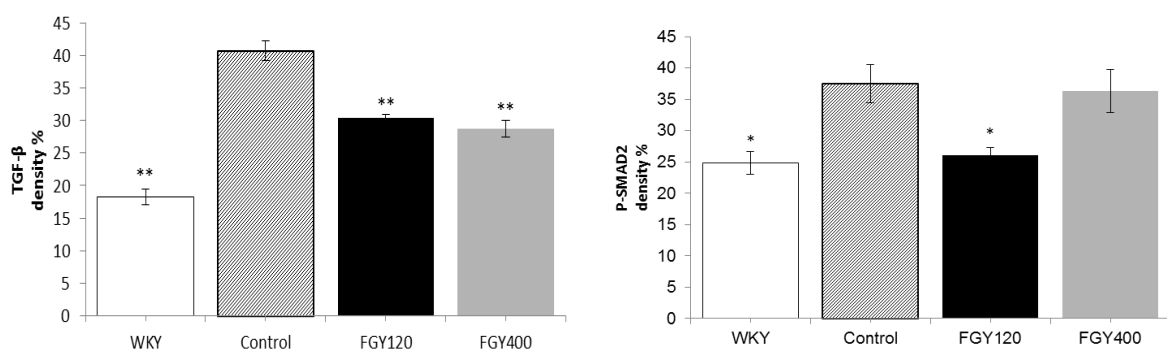
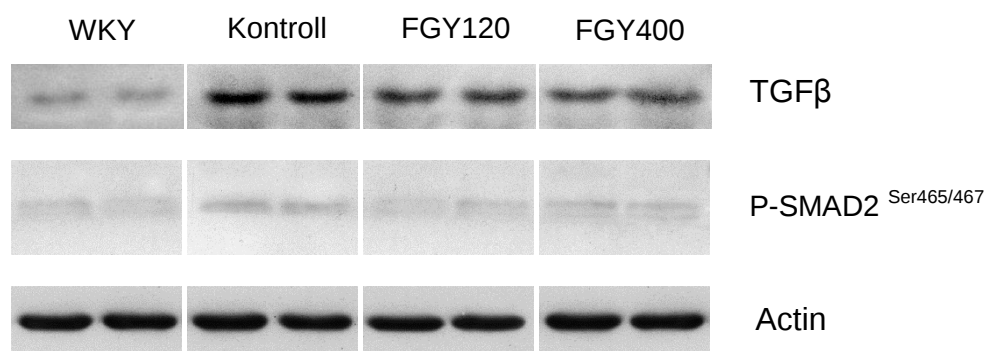


7.ábra: Az FGY-1153 hatása a carotis intima media vastagságára. (* $p < 0.05$ vs. Control group).

Az FGY120 és FGY400 csoportok carotisaiban mért intima media vastagság csökkent a Kontroll csoportéhoz viszonyítva. Ugyanakkor ez a változás nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0.149$). Az IMT a WKY csoportban a legalacsonyabb (7.ábra) ($p = 0.031$ vs. Kontroll).

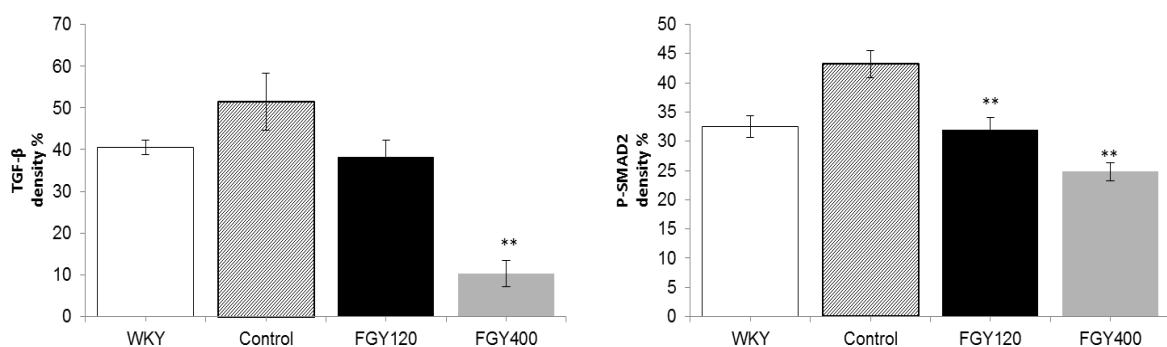
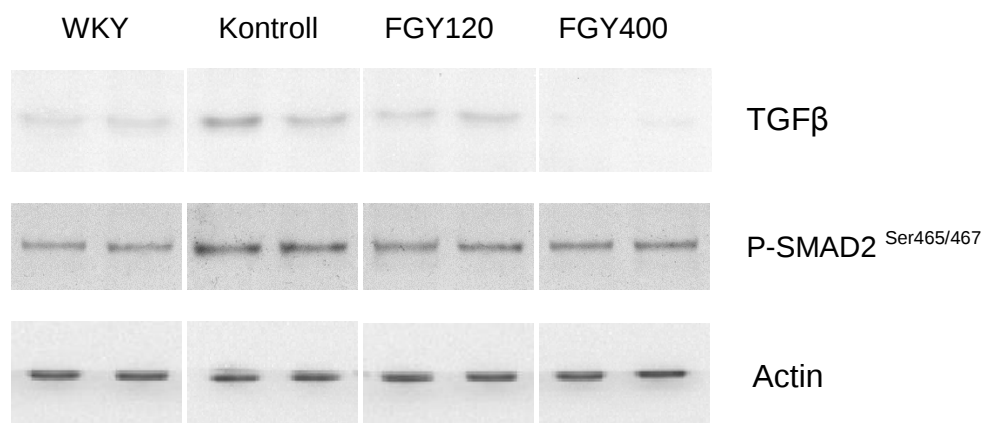
Az FGY-1153 hatása a TGF β /SMAD2 jelátviteli útvonalra a szívben és a nagyerekben

Western blot analízis, szív



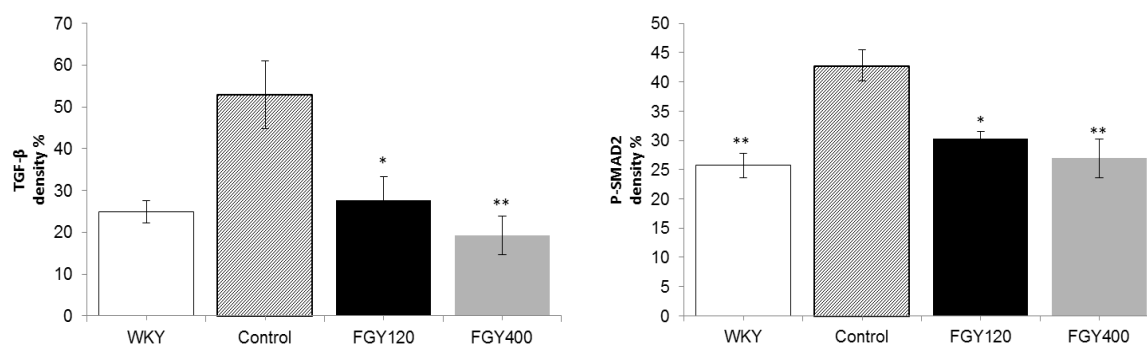
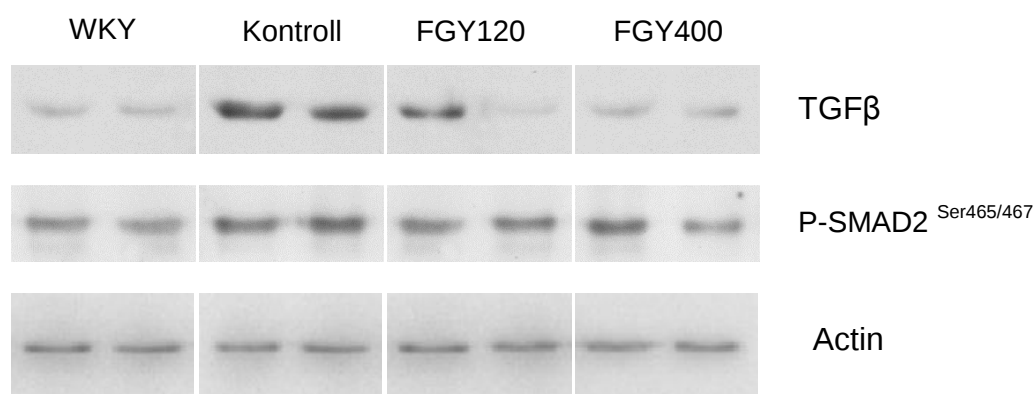
11.ábra Az FGY-1153 hatása a TGF β /SMAD2 jelátviteli útvonalra a szívben. FGY-1153 kezelés gátolta a TGF β kardialis expresszióját és a SMAD2 protein foszforilációját az FGY120 csoportban, ugyanakkor a magas dózisú kezelés nem volt hatással a SMAD2 foszforilációjára az FGY400 csoportban. (n=4), $\pm$ S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

Western blot analysis, aorta



12.ábra: Az FGY-1153 hatása a TGFβ/SMAD2 jelátviteli útvonalra az aorta falban. Az alacsony dózisú FGY-1153 kezelésnek nem volt szignifikáns hatása TGFβ expresszióra, ugyanakkor a magas dózisú kezelés szignifikánsan gátolta a TGFβ expresszióját az FGY400 csoportban a Kontroll és az FGY120 csoportokhoz viszonyítva. A SMAD2 protein foszforilációja szignifikánsan csökkent mindkét kezelt csoportban FGY120,FGY400. (n=4), ±S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

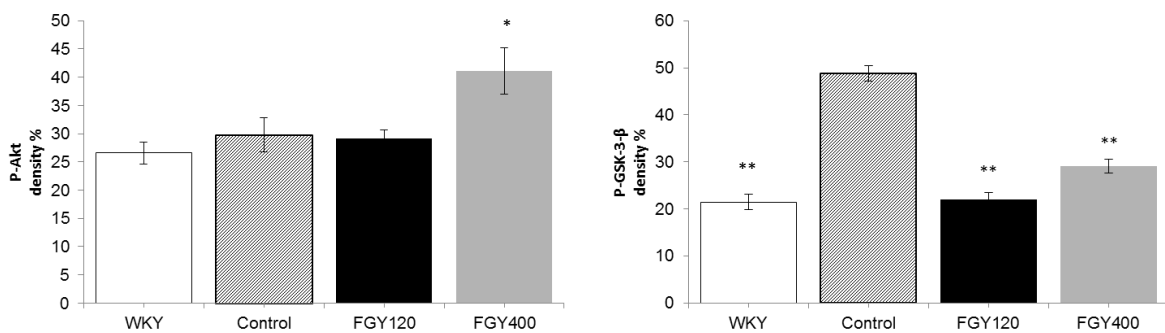
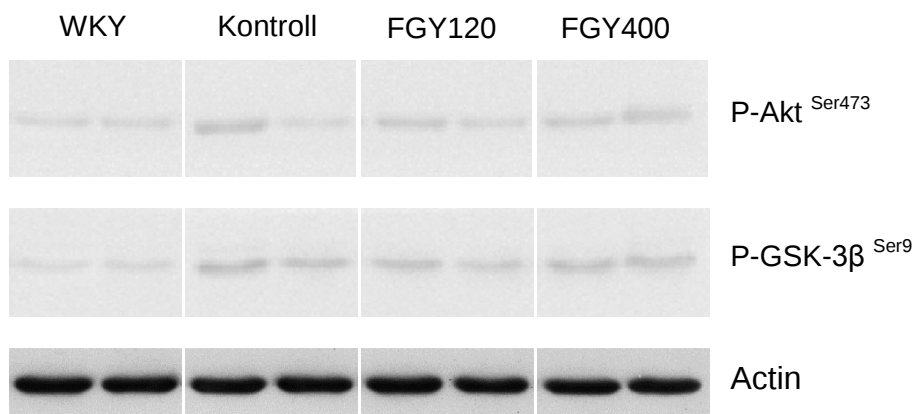
Western blot analízis, carotis



13.ábra: Az FGY-1153 hatása a TGFβ/SMAD2 jelátviteli útvonalra a carotis falban. A TGFβ expresszió és SMAD2 foszforiláció mértéke szignifikánsan magasabb a Kontroll csoportban a WKY-hoz viszonyítva. Mind az alacsony mind a magas dózisú FGY-1153 kezelés szignifikáns mértékben gátolta a TGFβ expressziót. A SMAD2 protein foszforilációja szignifikánsan csökkent mindkét kezelt csoportban FGY120, FGY400. (n=4), ±S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

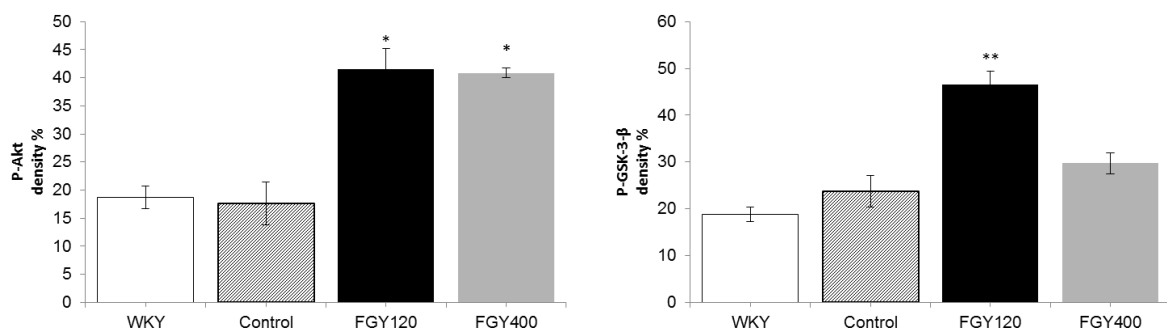
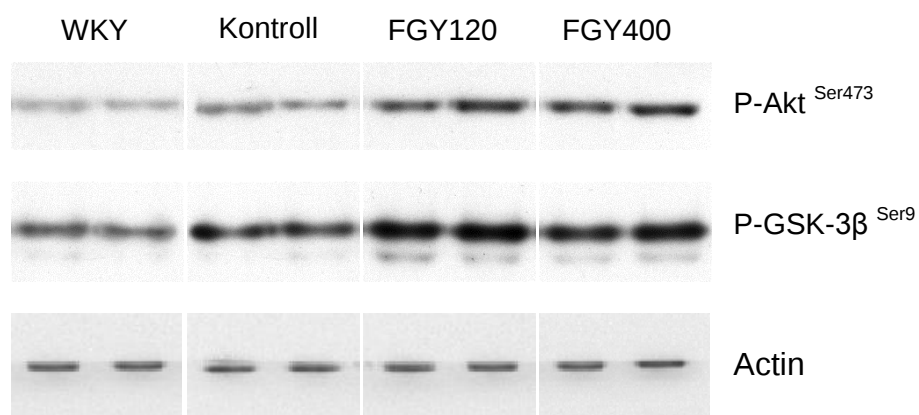
Az FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3 β szignalizációs kaszkádra szívben és nagyerekben

Western blot analízis, szív



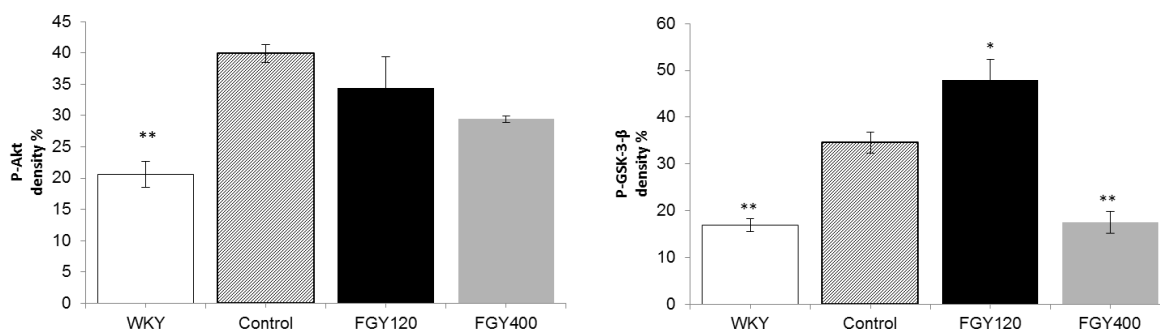
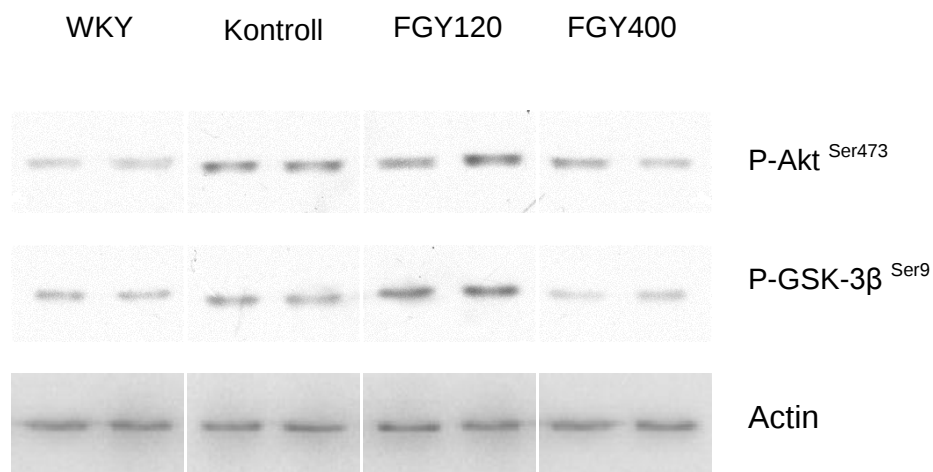
14.ábra: Az FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3 β szignalizációs kaszkádra szívben. A GSK-3 β foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb a WKY csoportban a Kontroll csoporthoz viszonyítva. A magas dózisú FGY-1153 kezelés szignifikáns mértékben emelte az Akt protein aktivációját, valamint mind az alacsony, mind a magas dózisú kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a GSK-3 β foszforilációt.(n=4), $\pm$ S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

Western blot analysis, aorta



15.ábra: Az FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3 β szignalizációs kaszkádra az aorta falban. Az FGY-1153 szignifikáns mértékben elemte az Akt protein foszforilációt mindkét FGY120 és FGY400 csoportban, és a GSK-3 β foszforilációját az FGY120 csoportban. A magas dózisú kezelésnek nem volt hatása a GSK-3 β foszforilációjára az FGY400 csoportban. $\pm$ S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

Western blot analysis, carotis



16.ábra: FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3β szignalizációs kaszkádra a carotis falban. Az Akt és GSK-3β proteinek foszforilációs szintje szignifikáns mértékben magasabb a Kontroll csoportban a WKY-hoz viszonyítva. Az alacsony dózisú FGY-1153 kezelés emelte, míg a magas dózisú kezelés csökkentette a GSK-3β protein foszforilációját, ugyanakkor nem volt szignifikáns hatása az Akt-1 foszforilációjára az SHR állatok carotisaiban. ±S.E.M, *p<0.05, **p<0.01 vs. Kontroll.

ÖSSZEGZÉS

Jelen munkánkban az L-2286 jelű PARP-inhibítor hatásait vizsgáltuk a bal kamrai hipertrófia kialakulásának folyamatában SHR modellben. Az L-2286 kedvezően hatott a hipertrófia progressziójára (posterior fal és septum vastagság, RWT) és a miokardiális fibrózisra. A PARP-gátló kezelés a vérnyomást nem csökkentette, így ez nem állhat a fenti kedvező változások hátterében. Eredményink azt mutatják, hogy a PARP-gátlás anihipertrofikus hatását „prosurvival” jelátviteli utak aktivációja (Akt-1/GSK-3 β , FKHR, PKC ϵ és Hsp90) és a „prohipertrofikus” protein kinázok (PKC- α/β II, - ζ/λ) gátlása révén fejt ki.

Összefoglalva: a PARP-1 enzim farmakológiai gátlása jelentős prtektív hatással bír a hipertónia indukálta kardiális remodellingel szemben annak ellenére, hogy antihipertenzív hatással nem rendelkezik. Ezáltal a PARP enzim egy ígéretes farmakológiai célpont lehet a magas vérnyomás kardiális komplikációinak megelőzésében azokban a betegekben, akiknél a célvérnyomésérték elérése nehézségekbe ütközik az alkalmazott antihipertenzív terápia okozta panaszok vagy mellékhatások miatt. Korábbi és jelen munkánkban közölt eredményeink az esszenciális hipertónia kezelésének egy új koncepciójára világítanak rá, miszerint elegendő lenne a vérnyomást egy jobban tolerálható szintre mérsékelni a remodelláció okozta célszerv károsodás PARP-gátló kezeléssel történő kivédése mellett.

Az FGY-1153 bradykinin B1 receptor antagonistá hosszútávú alkalmazása nem volt káros hatással az SHR állatokra. Mitöbb egy mérsékelt protektív hatás volt megfigyelhető a hipertenzió indukálta remodellációval szemben, annak ellenére, hogy az FGY-1153 vérnyomás csökkentő hatással nem rendelkezik. E kardiovaszkuláris protekció mechanizmusának hátterében a TGF- β -Smad2 jelátvitel inhibíciója állhat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kísérleteinket a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben, valamint az I. sz. Belgyógyászati Klinikán végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán 2011 és 2014 között.

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki támogatott és hasznos tanácsokkal látott el. Szintén köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Halmosi Róbertnek kitűnő munkájáért, és az echocardiográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozom Prof. Sümegi Balázsnak, aki a biokémiai gondolkodásra tanított. A PARP gátlók terén segítette munkámat és zavartalan körülményeket biztosított számomra intézetében.

Igazán hálás vagyok Prof. Dr. Seress Lászlónak, Prof. Dr. Gábrriel Róbertnek és Prof. Dr. Hideg Kálmánnak a kísérletek során nyújtott hasznos tanácsaikért, segítségükért.

Köszönettel tartozom még Erős Krisztiánnak, Dr. Szabadfi Krisztinának, Dr. Pálfi Anitának, Dr. Bartha Évának és Bencze Noéminek a kísérletek során nyújtott segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Hálás vagyok Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak, Pásztor Istvánnénak, Halász Helénának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségért. Köszönöm az összes barátomnak, a családomnak a bátorítást, melyet tanulmányaim és munkám során nyújtottak.