

Possibilities of experimental and clinical antioxidant protection in cardiovascular diseases

PhD thesis

Author: Klara Magyar M.D.

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 Pecs, Medical School

2012

1. Abbreviations

AIF	Apoptosis-inducing factor
Ang II	Angiotensin II
AP-1	Activating protein-1
ASI	Aortic stiffness index
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase
IMT	intima media thickness
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MKP-1	MAP-kinase phosphatase-1
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Nitric oxide
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PGI	Prostacyclin
PKC	Protein kinase C
RES	Resveratrol
RIP1	Receptor-interacting protein 1
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SNP	Sodium nitroprusside
WKY	Wistar-Kyoto rat

2. Background

PARP inhibition in the prevention of vascular remodeling

Chronic hypertension leads to structural alterations in blood vessels which are known as vascular remodeling. Remodeling is an adaptive process that occurs in response to long-term changes in hemodynamic conditions, but it may also subsequently contribute to the pathophysiology of vascular diseases and circulatory disorders.

Reactive oxygen species (ROS) generation occurs in every layer of the vascular wall caused by mechanical forces such as shear stress and vasoactive agents. An important oxidative agent is peroxynitrite (ONOO^-) which is generated in the reaction of superoxide anions (O_2^-) and nitric oxide (NO) when the level of these molecules are very high in tissues. ROS and especially ONOO^- are responsible for severe DNA damage like single and double strand breaks leading to the activation of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) which uses the energy sources of cells by transferring ADP-ribose units from NAD^+ to nuclear proteins such as histones and PARP-1 itself. This process results rapid depletion of NAD^+ and intracellular ATP pools and impaired mitochondrial respiration, leading to cellular dysfunction, apoptosis or necrosis.

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.

In our research we investigated the action of PARP inhibition *in vivo* in a spontaneously hypertensive rat (SHR) model. A novel PARP-inhibitor L-2286 was used. L-2286 is derived from 2-mercapto-4(3H)-quinazoline and was chosen, because in an *in vitro* PARP assay it exhibited significantly better PARP inhibitory activity than basic quinazolines such as 4-hydroxyquinazoline or 2-merkapto-4(3H)-quinazolinone (Figure 1.)

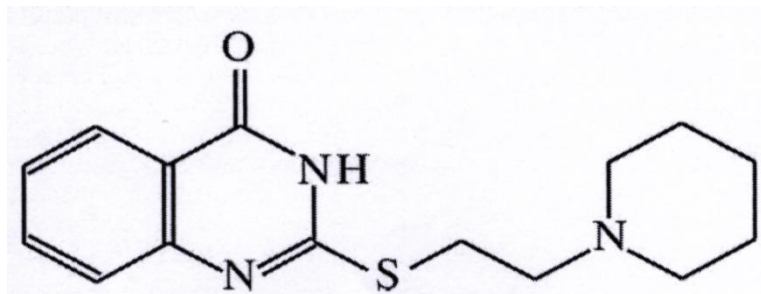


Figure 1. Chemical structure of L-2286 (2-[(2-piperidine-1-yl)thio]quinazolin-4(3H)-one).

Biological effects of resveratrol

Red wine contains high amount of polyphenolic compounds like resveratrol (trans-3,4,5-trihydroxystilbene), epicatechin, catechin, gallic acid, quercetin. Primarily resveratrol is thought to be responsible for the cardioprotective effect of red wine. Several studies supported its antioxidant activity, its ability to decrease low-density lipoprotein (LDL) oxidation, and function as a direct free radical scavenger. Resveratrol improves endothelial function, and has numerous beneficial effects on vascular tone and vessels in human and animal models. It has been shown that resveratrol improves the release of nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI) which both play a prominent role in the maintenance of endothelial function. In endothelial cells obtained from human umbilical vein, resveratrol enhanced the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) promoter. In other in vitro human investigations resveratrol resulted in NO depending relaxation of vascular rings of saphenous vein and internal mammary artery. Furthermore resveratrol plays an important role in the mitigation of platelet aggregation. The protective effect of resveratrol against thrombosis can be explained by the regulation of prostaglandin synthesis with reversible cyclooxygenase 2 (COX2) and irreversible cyclooxygenase 1 (COX1) inhibition. On thromboxane A2 (TXA2), which is produced by COX1 in platelets and enhances aggregation, resveratrol also has an inhibitory effect.

It has already been shown that resveratrol reduces serum cholesterol and triglyceride levels in rats. It has also been observed that the size, and the density of atherosclerotic lesions in the thoracic aorta as well as the thickness of intima were decreased and flow mediated dilatation (FMD) was improved by resveratrol. Several experiments have been carried out on FMD of the brachial artery, showing the ability of endothelium dependent dilatation of a vessel, which was further increased by red grape polyphenol extract.

3. Aims of the study

- 3.1. We tried to reveal the potential role of PARP activation in the pathogenesis of chronic hypertension-induced vascular remodeling.
 - 3.1.1. The aim of this work was to provide evidence for a new molecular mechanism of the vasoprotective effect of PARP inhibition.
 - 3.1.2. We tried to provide evidence whether long-term treatment with L-2286 could beneficially influence intima-media thickness of carotid arteries and aortic stiffness index

- 3.1.3. We tried to prove the protective effect of L-2286 on vasomotor dysfunction
- 3.1.4. We estimated the fibrosis decreasing effect
- 3.1.5. We tested whether PARP inhibition had beneficial effect on signal transduction pathways taking part in vascular remodeling
- 3.2. We investigated if resveratrol had a clinically measurable cardioprotective effect in patients after myocardial infarction receiving proper secondary preventive drug treatment.
 - 3.2.1. We tried to examine the effect of resveratrol treatment on echocardiographic parameters.
 - 3.2.2. We hypothesized that resveratrol could enhance endothelial function.
 - 3.2.3. We tested whether resveratrol influenced different hemorheological and laboratory parameters.

4. Materials and methods

4.1. Animal model and noninvasive blood pressure measurement

Ten-week-old male SHR rats were randomly divided into two groups. One group received no treatment (SHR-C, n = 10), whereas the other group (SHR-L, n = 10) received 5 mg/b.w. in kg/day L-2286, a water-soluble PARP inhibitor for 32 weeks. The third group was an age-matched normotensive control group (WKY-C, n=10). The fourth was a normotensive age-matched group receiving 5 mg/b.w. in kg/day L-2286 treatment (WKY-L, n=10). Noninvasive blood pressure measurement was carried out in every fourth week from the beginning of the study using tail-cuff method (Hatteras SC 1000 Single Channel System).

4.2. Transthoracic echocardiography

Aortic stiffness index (ASI) and intima-media thickness of carotid arteries (IMT) were measured by a VEVO 770 high-resolution ultrasound imaging system (VisualSonics, Toronto, Canada) - equipped with a 40 MHz transducer. Aortic elastic property was calculated according to a previously proposed and evaluated formula: $(ASI) = \ln(SBP/DBP) \times DD / (SD - DD)$.

4.3. Isometric force measurement

The common carotid arterial (CCA) rings were positioned between two stainless steel wires (diameter 0.0394 mm) in a 5-ml organ bath of a Small Vessel Myograph (DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). The rings were precontracted and equilibrated for 60 min until a stable resting tension was acquired. Tension is expressed as a percentage of the

steady-state tension (100%) obtained with isotonic external 60mM KCl. In the first series of experiments, the carotid rings were exposed to increasing doses of SNP (10^{-9} to 10^{-5} mol/L), ACh (10^{-9} to 10^{-5} mol/L) and in some experiments, arterial rings showing relaxation to ACh of more than 70% were counted as endothelium intact.

4.4. Immunohistochemistry and confocal laser fluorescence microscopy

Carotid arteries and aortic segments were fixed immediately after excision in buffered paraformaldehyde solution (4%) for 1 day. Five micrometer thick sections were cut.

Immunohistochemical staining was performed for nitrotyrosine and for poly(ADP-ribose) (PAR). Binding was visualized with biotinylated secondary antibody followed by the avidin-biotin-peroxidase detection system. Using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as the chromogen, progress of the immunoreaction was monitored under a light microscope and the reaction was stopped by the removal of the DAB. Some slices were stained with Masson's trichrome staining to detect the interstitial fibrosis as described earlier and quantified with the NIH ImageJ analyzer system. All histological samples were examined by an investigator in a blinded fashion.

Fluorescence immunohistochemistry was performed for apoptosis inducing factor (AIF), NF-kappa B (NF- κ B) and MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). The stainings were finished by Hoechst counterstain. Sections were examined using a confocal laser scan microscope (Olympus Fluoview 1000). Recording for RRX (excited with the green laser, Helium-Neon) was followed by recording for Hoechst with a 405 nm laser.

4.5. Western blot analysis

Carotid arteries and aortic segments were homogenized in ice-cold 50 mM Tris-buffer, pH 8.0 and harvested in 2x concentrated SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Proteins were separated on 10 or 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. After blocking (2 h with 3% non-fat milk in Tris-buffered saline), membranes were probed overnight at 4°C with primary antibodies and the next day with the secondary antibodies. The antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. After scanning, results were quantified by NIH Image J program.

4.6. Electron microscopy

1-mm long blocks were cut from the aorta and were fixed in 4% buffered formaldehyde mixed with a 2,5% glutaraldehyde solution for 24 hours in refrigerator. After dehydration blocks were embedded in gelatin capsules containing Durcupan. The blocks were placed in termostate for 48 hours at 56°C. From the embedded blocks 1 micrometer thick semithin and

serial ultrathin sections (70 nanometer) were cut with a Leica ultramicrotome, and mounted either on mesh, or on Collodion-coated single-slot, copper grids. Additional contrast was provided to these sections with uranyl acetate and lead citrate solutions, and they were examined with JEOL 1200EX-II electron microscope.

5. Materials and methods II.

5.1. Resveratrol:

Resveratrol (*trans*-3,4,5-trihydroxystilbene) was a kind gift from Admarc Med Diagnostics & Nutraceuticals (Fót, Hungary). 10 mg resveratrol capsule was applied once daily which is in commercial use and possesses official permission for being marketed.

5.2. Subjects and protocol:

40 patients were enrolled into our double-blind, placebo-controlled, randomized study (42-80 year old, mean age 66.3 ± 8.9 years, 26 men, 14 women). All patients had a history of myocardial infarction (at least 6 months prior to randomisation) and angiographically verified coronary artery disease. In one group 10 mg resveratrol, in the other group 10 mg placebo was administered for 3 months. Patients received a medical therapy recommended by the current guidelines for secondary prevention of acute myocardial infarction (AMI).

5.3. Clinical chemistry

From blood samples white blood cell count, C-reactive protein, TNF- α , glucose, glycosylated hemoglobin-HgA_{1c}, fasting lipid levels (total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL), LDL-cholesterol) were measured in the Department of Laboratory Medicine, University of Pecs.

5.4. Hemorheological parameters

Hematocrit was measured in a microhematocrit centrifuge, plasma fibrinogen concentration was determined by Clauss' method. Plasma and whole blood viscosities were determined in Hevimet 40 capillary viscosimeter. RBC aggregation was measured in Myrenne aggregometer, applying the light transmission method of Schmid-Schönbein et al. Red blood cell filterability was measured in Carat FT-1 filtrometer using St. George's technique. In this filtrometer RBC suspension was measured at four pairs of light sources and detectors. The apparatus is interfaced to a computer, which automatically analyzes sequential flow rates and thus distinguishes the relative cell transit time (RCTT) and the pore clogging rate. In our experiments filtration pressure was set for 4 cm of water. Collagen-induced platelet

aggregation (2 μ g/ml collagen) was measured using a Carat TX4 optical platelet aggregometer.

5.5. Brachial artery flow-mediated dilatation

FMD was measured on the right brachial artery after 10 minutes resting in a supine position. Images were acquired using a Technus MPX ultrasound System with a linear vascular transducer. Arterial flow velocity was measured using pulsed wave Doppler signals at a 70° angle to the vessel 5 cm above the antecubital fossa. A pneumatic cuff was then inflated to suprasystolic pressure (250 mmHg) on the forearm for 4 min and a second scan was taken 15 sec. after the cuff deflation and arterial lumen diameter was measured 90 sec. after cuff deflation. FMD was determined as the percentage change in vessel diameter measured at rest and at 90 sec. after cuff release.

5.6. Echocardiography

Echocardiographic measurements were performed with a Vivid 7 Pro (GE, USA) equipment with 3S transducer according to international guidelines. Systolic and diastolic left ventricular function were determined at baseline and at the end of the study period.

6. Conclusion

Vasoprotection by PARP inhibition in a SHR model

The major findings of this study are that chronic inhibition of nuclear PARP enzyme reduces ADP-ribosylation of nuclear proteins and thus prevents the development of vascular remodeling with the restoration of vascular structure and function while changing the altered patterns of signal transduction.

Despite the lack of blood pressure lowering effect, PARP-inhibitor treatment exerted significant protection against the transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in the SHRs and in our present work we also found that chronic inhibition of PARP with L-2286 did not decrease the blood pressure in SHR animals, but it could decrease the hypertension-induced remodeling of the great arteries.

Chronic elevated blood pressure causes the thickening of the vascular wall in carotid arteries. Increased intima–media thickness (IMT) from ultrasound measurements of the carotid artery is considered as a marker of more generalized atherosclerosis, and has been shown to predict the occurrence of cardiovascular events such as stroke and myocardial infarction.

The PARP-inhibitor L-2286 however decreased significantly the hypertension-induced vascular wall thickening in great vessels. Furthermore L-2286 improved the altered vascular

elasticity, expressed as aortic stiffness index, too. The thickness and the elastic properties of vascular wall are determined primarily by the amount of smooth muscle cells and by the amount of collagen content. The vascular collagen content was determined by transmission electron microscopy and by Masson's trichrome staining. Both methods showed a very prominent increase of vascular fibrosis in non-treated SHR animals. Moreover, on electron microscopic pictures the invasivity of fibrosis could also be seen, because the collagen bundles damaged the basal membrane and broke into the lumen. Pharmacological inhibition of nuclear PARP-1 exerted a significant decrease in the process of fibrotic remodeling and this treatment protected the integrity of vascular structure, too.

Endothelial dysfunction, a phenomenon that can easily be demonstrated as an impaired vasorelaxation in response to endothelium-dependent vasodilators such as acetyl-choline (ACh). Impaired relaxation of carotid arteries to ACh in hypertensive animals was significantly improved in the L-2286 treated group compared to the SHR-C group.

Oxidative stress and decreased bioavailability of NO are the most important causes of endothelial dysfunction. In accordance with this, the signs of increased oxidative stress were detected in our study in hypertensive animals measuring the amount of nitrotyrosine formation. The PARP-inhibitor treatment did not affect the blood pressure, however it could decrease significantly the formation of ROS/RNS and of course the activity of PARP enzyme. Although L-2286 has a moderated direct scavenger effect too, its main effect on ROS formation is the consequence of its mitochondrial protective effect.

Furthermore L-2286 treatment increased the phosphorylation state of Akt-1 in the vascular wall, too. Akt-1 is one of the most important prosurvival intracellular signal transduction factors. The activation of Akt-1 yields in numerous beneficial consequences, e.g. its activation can also decrease the ROS production through the inhibition of NADPH oxidases.

The nuclear translocation of AIF increased significantly in untreated SHR animals, which is a consequence of oxidative stress. The L-2286 treatment significantly decreased the nuclear translocation of the pro-apoptotic AIF in vascular smooth muscle cells. Blocking the nuclear translocation has also another beneficial effect, it can influence the vascular remodeling through the modulation of proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. PARP-inhibitor treatment decreased the nuclear translocation of AIF either by decreased formation of PAR, or the modulation of signaling pathways including the activation of Akt-1 which attenuates AIF translocation.

The importance of MAP kinases was extensively studied in experimental models of various cardiovascular pathologies. Our workgroup previously proved in cell culture, that PARP-1 inhibition by pharmacons, small interfering RNA silencing of PARP-1 expression, or the transdominant expression of enzymatically inactive PARP-1 resulted in the inactivation of these MAPKs through the increased expression and enlarged cytoplasmic localization of MAPK phosphatase-1 (MKP-1). In our recent work this finding was confirmed among much more complicated experimental settings, in a chronic murine model of hypertension. The increased MKP-1 and therefore decreased activity of MAP kinases can be a very important underlying mechanism of the diminished vascular collagen accumulation observed in L-2286 treated SHR. The decreased phosphorylation state of MAP kinases exerts protection against vascular remodeling, because it can reduce the fibrosis through a TGF- β independent pathway. On the other hand the elevated AngII level via p38-MAPK causes NF- κ B activation which in turn can increase the fibrosis via a TGF- β 1 dependent pathway and can enhance the production of inflammatory proteins that have central role in the development of endothelial dysfunction and atherosclerosis.

Effect of resveratrol treatment in postinfarction patient

In this study the possible cardioprotective effects of resveratrol were examined in patients after myocardial infarction. According to previous studies the cardiovascular benefits of resveratrol presumably includes vasorelaxation, antioxidant, antiplatelet and cholesterol lowering effects.

Several studies have shown the favourable effects of resveratrol on endothelial function but these investigations were carried out on animal models, in vitro human vessels or examined only the acute intake of resveratrol. In our study endothelial function was measured by FMD and a significant improvement ($p < 0.05$) was detected in vasorelaxation in resveratrol treated group. According to previous studies these effects are presumably due to an increase in NO level and signalling and the stimulation of Ca^{2+} activated K^+ channels.

The importance of hemorheological processes in the progression of atherosclerosis is well known. Previous studies have proved the inhibitory effect of resveratrol on platelet aggregation in vitro. The inhibition of platelet aggregation is presumably due to the enhancement of the activity of endogenous antiplatelet substances like prostaglandins. In addition, under in vitro circumstances it was shown that resveratrol inhibits type I collagen mRNA expression, and the adhesion of platelets to collagen in a concentration dependent

manner. RBC deformability has an important role in coronary microcirculation since the average capillary diameter is below the diameter of RBC. Decreased RBC deformability reduces the coronary microcirculation. According to previous studies certain unfavourable changes in hemorheological parameters can be observed in patients after myocardial infarction. In our investigation a significant decrease of RBC deformability and an increase of platelet aggregation was also experienced in the placebo group but resveratrol treatment prevented these disadvantageous changes ($p < 0.05$).

High level of LDL-cholesterol is very harmful to endothelial cells and has an important role in the development of atherosclerosis. According to the literature the effects of resveratrol on lipid parameters are rather conflicting. Some investigations have proved that resveratrol lowered total cholesterol, increased HDL level and reduced formation of atherosclerotic plaques. In our research a favourable effect of resveratrol was discovered on plasma LDL level ($p < 0.05$), but no significant effect was detected on other lipid parameters, like total cholesterol, HDL cholesterol and on triglyceride levels.

During our study no significant changes could be measured in white blood cell count, plasma fibrinogen and C-reactive protein levels.

Resveratrol possesses direct protective effect on cardiomyocytes which was demonstrated in several animal studies. In a myocardial remodeling model cardiac fibrosis was inhibited by resveratrol, furthermore resveratrol protected cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury through suppression of superoxide levels and activation of potassium channels in animal models. In our study resveratrol treatment resulted in a slight but not significant improvement of left ventricular systolic function. On the other hand diastolic function of the left ventricle was significantly improved which might be attributed to the inhibitory effect of resveratrol on myocardial fibrosis with the inhibition of phosphorylation of PKC α/β and activation of Akt pathways described in animal models.

In conclusion, our clinical trial provided evidences that resveratrol exerts multiple protective effects on the cardiovascular system in patients after myocardial infarction developing its beneficial effect in addition to routine medical therapy used in the secondary prevention of myocardial infarction. 3-months of resveratrol treatment improved FMD, increased red blood cell deformability, inhibited platelet aggregation, decreased LDL cholesterol level and improved left ventricular diastolic function

7. Summary of new scientific results:

7.1. Investigation of vasoprotective effect of L-2286 in a chronic hypertension model

- 7.1.1. Pharmacological inhibition of PARP-1 enzyme exerts significant protective effect against hypertensive vascular remodeling in spite of the lack of any antihypertensive effect.
- 7.1.2. Decreased vascular fibrosis as a consequence of elevated MKP-1 activity and thus diminished MAPK phosphorylation are the main underlying mechanisms.
- 7.1.3. PARP-1 inhibition activates Akt which can prevent mitochondrial damages and attenuates cell death
- 7.1.4. PARP is a promising therapeutical target to prevent hypertensive vascular 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.

7.2. Biological effects of resveratrol in postinfarction patients receiving adequate secondary prevention treatment

- 7.2.1. Resveratrol administration improves endothelial function measured by FMD.
- 7.2.2. Resveratrol has a very important favourable effect on several hemorheological and lipid parameters which play an important part in the progression of atherosclerosis
- 7.2.3. Resveratrol treatment causes improvement of left ventricular diastolic function which is a consequence of resveratrol fibrosis decreasing effect.
- 7.2.4. Resveratrol administration (without alcohol intake) might be recommended in postinfarction patients to slow down remodeling and progression of atherosclerosis.

8. 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 2007 and 2011.

I would like to express my thanks to my teacher and program leader, Professor Kálmán Tóth, who managed my studies and gave a support and useful advises during my work. 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 convey my thanks to my project leader Róbert Halmosi for his excellent work and help to perform echocardiographic examinations. I would like to express my gratitude to Professor Ákos Koller, Professor János Hamar, Professor László Seress, Professor Kálmán Hideg who gave me useful advices and help during the experiments.

Dr. Eszter Szabados, Zoltán Vámos, Éva Bartha, Kitti Bruszt, Izabella Solti, Alíz Szabó, László Deres, Krisztián Erős, Eszter Bognár gave also a hand with a part of the experiments.

I am grateful to Istvánne 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:

RITA BENKO, SAROLTA UNDI, MÁTYÁS WOLF, KLARA MAGYAR, ZSUZSANNA TOVOLGYI, ZOLTAN RUMBUS, LORAND BARTHO.

P(2) purinoceptors account for the non-nitroergic NANC relaxation in the rat ileum. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2006; 373:319-24. IF: 2.779

RITA BENKO, SAROLTA UNDI, MATYAS WOLF, ANDRAS VERECKEI, LASZLO ILLÉNYI, MIKLOS KASSAI, LASZLO CSEKE, DEZSO KELEMEN, PETER ORS HORVATH, ATILA ANTAL, KLARA MAGYAR, LORAND BARTHO

P2 purinoceptor antagonists inhibit the non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the human colon in vitro. Neuroscience. 2007; 147:146-52. IF: 3.352

EVA BARTHA, IZABELLA SOLTI, LASZLO KERESKAI, JANOS LANTOS, ENIKO PLOZER, KLARA MAGYAR, ESZTER SZABADOS, TAMAS KALAI, KALMAN HIDEG, ROBERT HALMOSI, BALAZS SUMEGI, KALMAN TOTH

PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Res. 2009; 83:501-10. IF: 5.801

E. BARTHA, I. SOLTI, A. SZABO, G. OLAH, K. MAGYAR, E. SZABADOS, T. KALAI, K. HIDEG, K. TOTH, D. GERO, C. SZABO, B. SUMEGI, R. HALMOSI

Regulation of kinase cascade activation and heat shock protein expression by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in doxorubicin-induced heart failure. J Cardiovasc Pharmacol. 2011 Oct;58(4):380-91. IF: 2.287

MAGYAR KLÁRA, HALMOSI RÓBERT, PÁLFI ANITA, FEHÉR GERGELY, CZOPF LÁSZLÓ, FÜLÖP ADRIENN, BATTYÁNYI ISTVÁN, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN, SZABADOS ESZTER

A rezveratrol kardioprotektív hatása posztinfarktusos betegekben. Kard prev rehab. 2010; III. évf., 4: 23-27.

KLARA MAGYAR, ROBERT HALMOSI, ANITA PALFI, GERGELY FEHER, LASZLO CZOPF, ADRIENN FULOP, ISTVAN BATTYANY, BALAZS SUMEGI, KALMAN TOTH, ESZTER SZABADOS

Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. Clin Hemorheol Microcirc. 2012 Jan 1;50(3):179-87. IF: 3.398

KLARA MAGYAR, LASZLO DERES, KRISZTIAN EROS, KITTI BRUSZT, LASZLO SERESS, ZOLTAN VAMOS, KALMAN HIDEG, TAMAS KALAI, ANDRAS BALOGH, FERENC GALLYAS JR., AKOS KOLLER, BALAZS SUMEGI, KALMAN TOTH, ROBERT HALMOSI

PARP-1 is a new therapeutic target in hypertensive vascular remodeling. Plos Medicine. Manuscript under preparation.

Published abstracts:

UNDI SAROLTA, BENKÓ RITA, WOLF MÁTYÁS, MAGYAR KLÁRA, BARTHÓ LORÁND

A guanilát-cikláz gátló ODQ hatása az elektromos téringerléssel kiváltott simaizom válaszokra és a perisztaltikus reflexre. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavasz Szimpóziuma, Budapest, 2005. 06. 6-7. Absztrakt füzet 73. old.

MAGYAR KLÁRA, PTE ÁOK V.

Tudományos Diákköri Konferencia

Egy guanilát-cikláz gátló vegyület hatása az elektromos téringerléssel (EFS) kiváltott simaizom-válaszokra és a perisztaltikus reflexre. Pécs, 2006. március 30-április 1. Absztrakt füzet 72. old.

UNDI SAROLTA, BENKÓ RITA, WOLF MÁTYÁS, MAGYAR KLÁRA, BARTHÓ LORÁND

Egy guanilát-cikláz gátló vegyület hatása az elektromos téringerléssel kiváltott simaizom-válaszokra és a perisztaltikus reflexre.

Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június 7-9. Absztrakt füzet 270. old.

RITA BENKÓ, SAROLTA UNDI, MATYAS WOLF, KLARA MAGYAR, LASZLO, ILLÉNYI, MIKLOS KASSAI, LASZLO CSEKE, ÖRS-PETER HORVÁTH, ANDRAS ANTAL AND LORAND BARTHÓ

NO and ATP co-mediate the non adrenergic, non-cholinergic (NANC) relaxation in the human colon and rat ileum The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR), Peking, Kína, 2006. július 2-7. Absztrakt füzet 110-11. old.

BARTHA ÉVA, MAGYAR KLÁRA, SOLTI IZABELLA, KOVÁCS KRISZTINA, HIDEG KALMAN, SÜMEGI BALÁZS, HALMOSI RÓBERT, TÓTH KÁLMÁN. Poli(ADP-ribóz)polimeráz enzim gátlásának hatása fiatal hipertenzív patkány szívekre. Magyar Kardiológusok Társasága 2008. évi Tudományos Kongresszusa, 2008. május 7-10., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. B, 2007;38:B8

EVA BARTHA, KLARA MAGYAR, SOLTI I, LASZLO KERESKAI, TAMAS KALAI, ROBERT HALMOSI, KALMAN HIDEG, BALAZS SÜMEGI, KALMAN TOTH. Protective effect of a quinazoline-type poly(ADP-Ribose)polymerase inhibitor against the development of hypertensive cardiomyopathy and heart failure. Scientific Session 2008 of American Heart Association, November 8-12, 2008, New Orleans, Circulation

BARTHA ÉVA, SOLTI IZABELLA, KERESKAI LÁSZLÓ, PLÓZER ENIKŐ, MAGYAR KLÁRA, LANTOS JÁNOS, KÁLAI TAMÁS, HIDEG KÁLMÁN, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN, HALMOSI RÓBERT A PARP-gátlás késlelteti a szívelégtelenség kialakulását spontán hipertenzív patkány modellben. Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, 2009;39:A39

MAGYAR KLÁRA, HALMOSI RÓBERT, PÁLFI ANITA, FÜLÖP ADRIENN, SZABADOS ESZTER, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN

A Resveratrol kardioprotektív hatása ischaemiás szívbetegekben. Magyar Kardiológusok Társasága Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, 2009;39:A71

MAGYAR KLÁRA, VÁMOS ZOLTÁN, BRUSZT KITTI, SOLTI IZABELLA, CSÉPLŐ

PÉTER, HIDEG KÁLMÁN, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN, HALMOSI RÓBERT,
KOLLER ÁKOS

Egy új PARP-gátló vazoprotektív hatása spontán hipertóniás patkányokban. Magyar Kardiológusok Társasága 2010. évi Tudományos Kongresszusa, 2010. május 5-8., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. G, 2010;40:G45

MAGYAR KLÁRA, VAMOS ZOLTÁN, BRUSZT KITTI, SOLTI IZABELLA, HIDEG KÁLMÁN, KOLLER ÁKOS, SÜMEGI BALÁZS, SERESS LÁSZLÓ, HALMOSI RÓBERT
Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlásának vazoprotektív hatása spontán hipertenzív patkánymodellben. 40. Membrán-transzport konferencia, 2010. május 18-21., Sümeg. Absztrakt füzet 100. old.

KLARA MAGYAR, ZOLTAN VAMOS, KITTI BRUSZT, IZABELLA SOLTI, KALMAN HIDEG, BALAZS SUMEGI, AKOS KOLLER, ROBERT HALMOSI, KALMAN TOTH
Vasoprotective effects of a novel PARP- inhibitor in spontaneously hypertensive rats. Congress of the European Society of Cardiology, 28 August - 01 September, 2010, Stockholm, Sweden EHJ, 31, Abstract Suppl., 84.

KITTI BRUSZT, KLARA MAGYAR, ZOLTAN VAMOS, ANDRAS BALOGH, TAMAS KÁLAI, KALMAN HIDEG, LASZLO SERESS, BALAZS SUMEGI, AKOS KOLLER, ROBERT HALMOSI, KALMAN TOTH.

Vasoprotective effect of a quinazoline-type Poly(ADP-Ribose)polymerase inhibitor against vascular remodeling in chronic hypertension. VI. International Symposium On Myocardial Cytoprotection, 7.9 October, 2010, Pécs, Hungary, Experimental and Clinical Cardiology, 2010; 5, 42.

KLARA MAGYAR, KITTI BRUSZT, ZOLTAN VAMOS, IZABELLA SOLTI, TAMAS KÁLAI, KALMAN HIDEG, LASZLO SERESS, BALAZS SUMEGI, AKOS KOLLER, ROBERT HALMOSI, KALMAN TOTH

Vasoprotective effects of poly(ADP-ribose)polimerase inhibition in a spontaneously hypertensive rat model. VI. International Symposium On Myocardial Cytoprotection, 7.9 October, 2010, Pécs, Hungary, Experimental and Clinical Cardiology 2010; 5, 48

MAGYAR KLARA, VAMOS ZOLTAN, BRUSZT KITTI, BALOGH ANDRAS, KALAI TAMAS, HIDEG KALMAN, SERESS LÁSZLO, SUMEGI BALAZS, KOLLER AKOS, HALMOSI ROBERT, TOTH KALMAN

Inhibition of Poly(ADP-ribose) polymerase reduces hypertension induced vascular remodeling in spontaneous hypertensive rat model. Second international Symposium on Hypertension, november 18-21, 2010, Osijek, Croatia, Kidney and Blood Pressure Research 2010; 33: 425

MAGYAR KLÁRA, RIBA ÁDÁM, VAMOS ZOLTÁN, BALOGH ANDRÁS, DERES LÁSZLÓ, HIDEG KÁLMÁN, SÜMEGI BALÁZS, KOLLER ÁKOS, HALMOSI RÓBERT, TÓTH KÁLMÁN

Az Akt és a MAP kináz rendszer szerepe krónikus hipertenzív patkánymodellben a PARP gátlás által kiváltott védelemben. Magyar Kardiológusok Társasága 2011. évi Tudományos Kongresszusa, 2011. május 11-14. Card. Hung. Suppl. F, 41: F36.

MAGYAR K., RIBA A., VAMOS Z., DERES L., HIDEG K., SUMEGI B., KOLLER A., HALMOSI R., TOTH K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of PARP inhibition in a chronic hypertensive rat model. FAMÉ 2011. június 8-11., Pécs, Acta Phys. Suppl., 684, 73, 2011.

HALMOSI R., BARTHA E., SOLTI I., OLAH G., MAGYAR K., KALAI T., GERO D., SZABO CS., SUMEGI B., TOTH K. Regulation of kinase cascade activation and heat shock protein expression by poly(ADP-ribose)polymerase inhibition in doxorubicin-induced heart failure. Annual Congress of the Heart Failure Association of European Society of Cardiology, May 21-24., 2011, Gothenburg, Sweden. European Journal of Heart Failure Supplements 10 (S1), S66, 2011.

K. MAGYAR, A. RIBA, Z. VAMOS, A. BALOGH, L. DERES, K. HIDEG, B. SUMEGI, A. KOLLER, R. HALMOSI, K. TOTH

The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the vasoprotection elicited by PARP inhibition in hypertensive rats, European Society of Congress, Paris, France, 27, Eur. Heart J, 32 (Abstract Supplement), 34, 2011.

MAGYAR KLÁRA, RIBA ÁDÁM, BRUSZT KITTI, BALOGH ANDRÁS, HIDEG KÁLMÁN, SERESS LÁSZLÓ, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN, HALMOSI RÓBERT

Az L-2286 jelű PARP-gátló vegyület lehetséges szerepe a miokardialis őssejt regenerációban. Magyar Kardiológusok Társasága 2012. évi Tudományos Kongresszusa, 2012. május 9-12. Card. Hung. Suppl. A., 42:A30.

DERES LÁSZLÓ, MAGYAR KLÁRA, TAKÁCS IMRE, ERŐS KRISZTIÁN, BALOGH ANDRÁS, HIDEG KÁLMÁN, SÜMEGI BALÁZS, TÓTH KÁLMÁN, HALMOSI RÓBERT

A PARP-gátlás csökkenti a vaszkuláris fibrózist spontán hipertenzív patkánymodellben Magyar Kardiológusok Társasága 2012. évi Tudományos Kongresszusa, 2012. május 9-12. Card. Hung. Suppl. A., 42: A21

K. MAGYAR, I. TAKACS, K. BRUSZT, A. BALOGH, K. HIDEG, L. SERESS, B. SUMEGI, R. HALMOSI, K. TOTH

The potential role of a PARP-inhibitor in the myocardial stem cell regeneration, Congress of European Society of Cardiology, Munich, Germany, 25 Aug 2012 - 29 Aug 2012, Eur. Heart J, 2012, 33 (Suppl. 1).

Az antioxidáns védelem klinikai és kísérletes lehetőségei kardiovaszkuláris betegségekben

Ph.D. tézis

Szerző: Dr. Magyar Klára

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán
Témavezető: Dr. Halmosi Róbert, Ph.D.

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

2012

1. Rövidítések jegyzéke

AIF	Apoptózist indukáló faktor
Ang II	Angiotenzin II
AP-1	Aktiváló protein-1
ASI	Aorta stiffness index
ERK1/2	Extracellularis szignál regulált kináz
IMT	intima média vastagság
JAK/STAT	Janus kináz/transzkripció szignál transzducer és aktivátor
JNK	c-jun N-terminál kináz
MAPK	mitogen aktiválta protein kináz
MKP-1	MAP-kináz foszfatáz-1
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid
NF- κ B	Nukleáris faktor kappa B
NO	Nitrogén monoxid
PARP	poli(ADP-ribóz)polimeráz
PGI	Prosztaciklin
PKC	Protein kináz C
RES	Rezveratrol
RIP1	Receptor-interacting protein 1
ROS	Reaktív szabad gyökök
RNS	Reaktív nitrogen termékek
SHR	Spontán hipertenzív patkány
SNP	Nátrium nitroprusszid
WKY	Wistar-Kyoto patkány

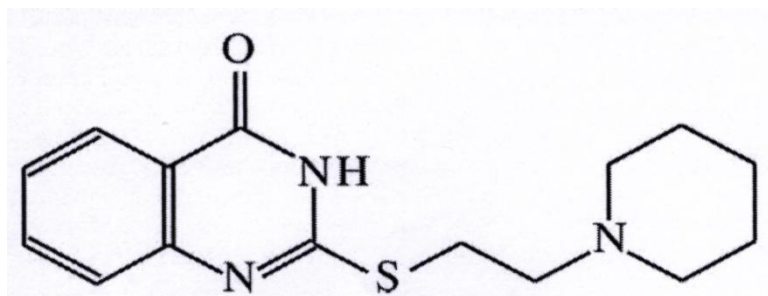
2. Bevezetés

PARP-gátlás szerepe a vaszkuláris remodelling megelőzésében

A tartósan fennálló hipertónia az erek strukturális átépülését hozza létre, melyet vaszkuláris remodellingnek nevezünk. A remodelling egy adaptációs folyamat, mely hosszú ideig fennálló hemodinamikai tényezők következtében alakul ki, de fontos szerepet játszik a különböző érbetegségek és keringési betegségek patofiziológiájában is.

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) mechanikai erők hatására, mint a falfeszülés, vasoaktív ágensek, képződnek az érfal minden rétegében. Egy igen fontos szabadgyök a peroxinitrit (ONOO⁻), mely a szuperoxid anion (O₂⁻) és a nitrogén-monoxid (NO) reakciója során keletkezik, abban az esetben ha ezek a molekulák nagy mennyiségben vannak jelen a szövetekben. ROS és különösen a ONOO⁻ felelősek a súlyos DNS károsodásért, az egyes és kettős -szálú DNS lánc törésekért és a következményes poli(ADP-ribóz)polimeráz-1 enzim (PARP) aktivációjáért. 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 termeléshez, 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 transzkripciós faktorokat aktivál melyek fokozzák a kardiovaszkuláris remodellinget.

Kísérleteink során egy PARP-gátló vegyület hatását vizsgáltuk in vivo körülmények között spontán hipertenzív patkány (SHR) modellben. Az L-2286 jelű PARP-gátló vegyületet használtuk, mely 2-mercapto-4(3H)-quinazoline származék, de in vitro PARP assay vizsgálatok során szignifikánsan jobb PARP gátló hatást észleltünk, mint az alap quinazolin vegyületek esetén (1. ábra).



1. Ábra: Az L-2286 ((2-((2-Piperidin-1-ylethil)tio)quinazolin-4(3H)-egy) szerkezeti képlete.

A resveratrol biológiai hatása:

A vörösbor kardioprotektív hatása a piros szőlő héjában található fitoalexineknek, ezenbelül is elsősorban a rezveratrolnak (trans-3,4,5-trihidroxystilbene) tulajdonítható. Számos irodalmi adat igazolta antioxidáns és szérum lipidszint csökkentő hatását. Javítja az endotél funkciót és számos kedvező hatása van a vaszkuláris tónusra. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy elősegíti a nitrogén-monoxid (NO) és a prosztaciklin (PGI) felszabadulást, melyek az endotél funkció megtartásában jelentős szerepet játszó faktorok. Humán érből származó in vitro kísérletekben a rezveratrol felerősítette az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) promóterének aktivitását, valamint NO függő relaxációt eredményezett. Védő szerepe trombózis ellen is igazolódott. Befolyásolja a prosztaglandin szintézist, valamint gátolja a thromboxane A₂ (TXA₂) hatását, mely hatásokon keresztül a thrombocytá aggregációt gátolja. Továbbá állatkísérletekben igazolták, hogy az ateroszklerotikus plakkok mérete és denzitása az intima vastagsága csökkent rezveratrol kezelés hatására, valamint fokozta az endothelium-függő vazodilatációt.

3. Célkitűzések

- 3.3. A kísérletek célja az volt, hogy bizonyítsa a PARP enzim aktivációjának lehetséges szerepét a krónikusan fennálló hipertónia okozta vaszkuláris remodelling patogenezisében.
 - 3.3.1. Megvizsgáltuk egy új molekuláris mechanizmus szerepét a PARP gátlás okozta érvédelemben.
 - 3.3.2. Bizonyítani szeretnénk volna, hogy a hosszútávú kezelés az L-2286 jelű PARP gátló vegyülettel kedvezően befolyásolja az intima-media vastagságot az arteria carotisokban és az aorta stiffness indexet.
 - 3.3.3. Vizsgáltuk az L-2286 kezelés protektív hatását a vazomotor diszfunkcióra.
 - 3.3.4. Megvizsgáltuk az esetleges fibrózis csökkentő hatását.
 - 3.3.5. Bizonyítani szeretnénk volna, hogy a PARP gátlásnak kedvező hatása van a vaszkuláris remodellingben részt vevő jelátviteli útvonalak esetén.
- 3.4. Feltételezésünk az volt, hogy a rezveratrolnak klinikailag is mérhető kardioprotektív hatása van posztinfarktusos betegekben, akik a megfelelő szekunder prevenció kezelésben részesülnek.
 - 3.4.1. Megvizsgáltuk a rezveratrol kezelés hatását az echokardiográfiás paraméterekre.
 - 3.4.2. Megmértük, hogy a rezveratrol javítani tudja-e az endotél funkciót.

3.4.3. A különböző hemorheológiai és labor paraméterekre kifejtett hatását szeretnénk volna vizsgálni.

4. Eszközök és módszerek

4.1. Kísérletes modell és noninvazív vérnyomásmérés

10 hetes hím SHR patkányokat random módon két csoportba osztottunk. Az egyik csoportban lévő állatok nem kaptak kezelést (SHR-C, n = 10), míg a másik csoportban lévőket 5 mg /ttkg L-2286-al (vízoldékony PARP-gátló vegyület) kezeltük 32 héten keresztül. A harmadik csoport kortárs normotenzív kontroll volt (WKY-C, n=10). A negyedik csoportba kortárs normotenzív állatok tartoztak, melyek L-2286 kezelést kaptak 32 héten keresztül.

A noninvazív vérnyomásmérést a kísérletsorozat kezdetétől négy hetente végeztünk farokvérnyomásmérő (Hatteras SC 1000 Single Channel System) segítségével.

4.2. Echokardiográfiás módszerek

Az aorta stiffness index (ASI) és az arteria carotisok intima-media vastagságának (IMT) meghatározása VEVO 770 nagy felbontású ultrahanggal történt (VisualSonics, Toronto, Kanada) egy 40 MHz felbontású transzducer segítségével. Az aorta elasztikus tulajdonságát egy képlet segítségével számoltuk ki: $ASI = \ln(SBP/DBP) \times DD / (SD - DD)$.

4.3. Izometriás mérések

Az arteria carotis communisokból készült gyűrűket egy kísér miográf (DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia) 5 ml-es szervfürdőjébe helyeztük. A kísérlet elején és végén meghatároztuk a maximális kontrakcióra adott választ 60 mM KCl segítségével. A kísérlet első részében növekvő dózisú SNP-t (10^{-9} to 10^{-5} mol/L), majd Ach-t (10^{-9} to 10^{-5} mol/L) adtunk az érgyűrűkhöz. Ha az Ach-ra történő relaxációs válasz meghaladta a 70%-t, abban az esetben tekintettük az endotheliumot intaktnak.

4.4. Immunhisztokémia és konfokális lézer fluoreszcens mikroszkópia

Az arteria carotisokat és az aortákat paraformaldehid oldatban (4%) fixáltuk 1 napon keresztül. 5 mikrométer vastag metszeteket készítettünk. Immunhisztokémiai festést végeztünk nitrotirozin és poli(ADP-ribóz) (PAR) elsődleges antitestek segítségével. Az elsődleges antitesttel történő inkubáció után a specifikus kötődést biotinilált, másodlagos antitest, majd az avidin-biotin-peroxidáz komplex használatával tettük láthatóvá (Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Kromogénként 3,3'-diaminobenzidint (DAB) használtunk.

Néhány metszetet Masson trichróm festéssel festettünk meg, hogy detektáljuk az interstitialis fibrózist. A metszeteket NIH ImageJ program segítségével elemeztük.

Immunfluoreszcens módszer segítségével detektáltuk az apoptózis-indukáló factor (AIF), NF-kappa B (NF- κ B) és a MAP kináz foszfatáz-1 (MKP-1) aktivációt. A festést Hoechst magfestés használatával fejeztük be. A metszeteket konfokális lézer scan mikroszkóppal (Olympus Fluoview 1000) vizsgáltuk.

4.5. Western blot analízis

Az arteria carotis és aorta mintákat 50 mg-ot jéghideg homogenizáló pufferben dolgoztuk fel, amely 8-as pH-jú volt. 50 mM-os Tris puffert tartalmazott (valamint 1:100-szoros hígításban 50 mM nátrium metavanadátot) és 2x-es töménységű SDS-poliakrilamid gél elektroforézis minta pufferben folytattuk tovább a feldolgozást. A nátrium metavanadátot foszfatáz inhibitorként használtuk. A fehérjéket 10 vagy 12%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk szét. Blokkolás után (2h 3%-os zsírmentes tejjel Tris pufferált sóoldatban) a membránokat egy éjszakán át 4°C-on az elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd másnap a másodlagos antitesttel. A kialakult komplexeket az „enhanced” kemilumineszcencia módszerével tettük láthatóvá. Szkennelés után az eredményeket a NIH ImageJ program segítségével értékeltük.

4.6. Elektron mikroszkópia

1 mm hosszúságú darabokra vágtuk az aortát és 4%-os pufferolt formaldehid oldat és 2,5%-os glutáraldehid oldat keverékébe helyeztük 24 órára. Dehidrált követően a beágyazáshoz Durcupan gyantát (Sigma) használtunk, a metszeteket Leica ultramikrotómmal metszettük. Az ultravékony metszeteket rácsos rézgridekre vettük fel, majd az uranil acetátal és ólom citráttal végzett kontrasztzás után Jeol 1200EX-II típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

5. Eszközök és módszerek II

5.1. Rezveratrol

Vizsgálatunk során 40 ismert posztinfarktusos beteget randomizáltunk két csoportba (42-80 év, átlag életkor 66.3 ± 8.9 év, 26 férfi, 14 nő). Mindegyik beteg anamnézisében lezajlott miokardiális infarktus (legalább 6 hónappal a randomizálás előtt) valamint coronarográfiával igazolt, revaszkularizációra nem alkalmas 3-ér betegség szerepel. 20 beteg napi 10 mg rezveratrol kapszula (Admarc Med Diagnostics & Nutraceuticals, Fót, Magyarország), 20 beteg pedig placebo kezelésben részesült 3 hónapon keresztül. A betegek gyógyszeres kezelése a vizsgálati periódus alatt nem változott, az ajánlásoknak megfelelő szekunder prevenciók kezelésben részesültek.

5.2. Laboratóriumi paraméterek

A kubitális vénából származó vérmintából meghatároztuk a fehérvérsejtszámot, C-reaktív proteint, TNF- α -t, vércukor szintet, hemoglobint és a lipidprofil (koleszterin, triglicerid, high-density lipoprotein (HDL), LDL-koleszterin szintet).

5.3. Hemoreológiai paraméterek

A hematokritot mikrohematokrit centrifuga, a plazma fibrinogén koncentrációt Clauss' módszer segítségével határoztuk meg. A plazma- és teljesvér-viszkozitást Hevimet 40 kapillaris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Magyarország) mértük. A vörösvértest-aggregáció mérése Myrenne MA-1 aggregométerrel történt Schmid-Schönbein fény-transzmissziós módszerét alkalmazva. Az aggregáció mértékét az aggregációs indexekkel jellemezzük (AI). A vörösvérsejt filterabilitást, amely a sejt deformabilitására utaló paraméter, Carat FT-1 filtrométerben mértük a St George's technikát alkalmazva. Trombocita aggregometriás méréseinket Carat TX-4 típusú trombocita aggregométerrel végeztük.

5.4. Flow-mediálta vazodilatáció

A flow-mediálta dilatációt (FMD) Celermajer módszerével mértük. Nyugalmi állapotban az artéria átmérőjét és az áramlást detektáltuk, majd az alkaron a vérnyomásmérő mandzsettáját 250 Hgmm-re felfújtuk 4 percig. A felengedést követően 15 másodpercig regisztráltuk a centrális áramlást majd 90 másodperc után megmértük az ér átmérőjét. Az FMD értéket a nyugalmi és a felengedés után 90. másodperccel mért értékek százalékos különbségében adtuk meg.

5.5. Echokardiográfia

A betegek transthoracalis echokardiográfias vizsgálatát GE Vivid 7 Pro készülékkel végeztük a nemzetközi (AHA/ACC) és a magyar ajánlásoknak megfelelően.

6. Következtetések

PARP inhibitor vazoprotektív hatása SHR modellben

Kísérleteink során bizonyítani tudtuk hogy a hosszútávú PARP gátlás csökkenti a magban található fehérjék ADP-ribozilációját és ezáltal megakadályozza a vaszkuláris remodelling kialakulását az erek szerkezetének és funkciójának megtartásával, miközben kedvező hatása van az ér átépülésében szerepet játszó jeláltviteli útvonalakra is. Az állatmodellként használt spontán hipertenzív patkányokban munkacsoportunk a korábbi kísérletek során sem tapasztalt vérnyomáscsökkentő hatást a PARP-gátló kezelés következtében, viszont eredményeink azt

mutatták, hogy a kezelés lassította a hipertenzív kardiopatia szívelégtelenségbe történő átalakulását. Jelenlegi munkánkban az L-2286 kezelés szintén nem befolyásolta az állatok vérnyomását, ellenben csökkentette a hipertónia okozta érfalkárosodást.

Ennek a károsodásnak egyik igen fontos jele az érfal megvastagodása. Ultrahangos méréseink során a hipertóniás állatok arteria carotisában az intima-media vastagság (IMT) fokozódását találtuk, mely generalizált atherosclerosisra és a későbbiekben a kardiovaszkuláris események, mint stroke és miokardiális infarktus gyakoriságának növekedésére utal.

Az L-2286 kezelés nemcsak a hipertónia-indukálta érfalmegvastagodást csökkentette, hanem javította az érfal rugalmasságát is, melynek meghatározására az aorta stiffness indexet használtuk. Az érfal vastagságát és elasztikus tulajdonságait a simaizomsejtek a kollagén mennyisége határozza meg. A kollagén mennyiségét elektron mikroszkóppal és Masson trikróm festéssel néztük meg. Mindkét módszerrel jelentős vaszkuláris fibrózis fokozódást láttunk a kezeletlen hipertóniás állatok esetén. Az elektron mikroszkópos felvételeken a fibrózis invazivitása is látható, mivel a kollagén kötegek a bazal membránt is károsítva betörnek a lumenbe. Tehát elmondhatjuk, hogy a PARP-gátlás szignifikáns mértékű fibrotikus remodelling csökkenést okozott és az érszerkezet integritásának megtartásában is igen fontos szerepet játszott.

Az endotél funkció károsodása esetén csökkent vazorelaxációs választ látunk az endotél függő vazodilatátorra az ACh-ra. Munkánkban a hipertóniás kezeletlen állatokban az észlelt csökkent Ach függő vazodilatációs válasz szignifikáns mértékben javult az L-2286 kezelés hatására. Az endotél diszfunkció kialakulásának az oxidatív stress és az NO csökkent életképessége a legfontosabb okai. Ennek megfelelően kísérletünkben a hosszasan fennálló hipertónia következtében fokozódott oxidatív stressz jeleit találtuk, melyet a nitrotirozin mennyiségének meghatározásával szemléltettünk. Habár a PARP-gátló kezelés nem befolyásolta a vérnyomást, tudta csökkenteni a ROS/RNS termelődést. Az L-2286-nak ismert direkt szabadgyökfogyó hatása is, a fő magyarázat azonban az oxidatív stressz csökkentésére ennek a vegyületnek a mitokondriumokra gyakorolt védő hatása.

Továbbá az L-2286 kezelés fokozta az Akt foszforiláltságát az érfalban, mely az egyik legfontosabb sejttúlélésben szerepet játszó jelátviteli útvonal. Az Akt-1 jelátviteli útvonal aktivációjának nagyon sok kedvező hatása van, többek között a NADPH oxidáz gátlásán keresztül csökken a ROS termelődés.

Kísérleteink további részében az apoptózis kimutatására a proapoptotikus AIF nukleáris transzlokációját vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy az oxidatív stressz a kezeletlen

állatokban nagy mértékben fokozta a sejtelhalás mértékét. Az L-2286 kezelés hatására nagy mértékben csökkent a pro-apoptotikus AIF nukleáris transzlokációja az érfalban található simaizom sejtekben. A PARP-gátló kezelés nukleáris transzlokációt gátló hatása befolyásolhatta a vaszkuláris remodellinget azáltal, hogy megváltoztatta az érfalban található simaizom sejteknek a proliferációját és migrációját. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a csökkent PAR termelődés csökkent AIF aktivációt okozott, mely a sejt túlélésében fontos szerepet játszó Akt-1 jelátviteli útvonal aktivációjának a következménye.

A MAP kinázok fontos szerepét már számos kísérletes modellben vizsgálták különböző kardiovaszkuláris betegségek patológiájának tisztázása érdekében. Munkacsoportunk korábbi sejt kultúrák kísérleteiben farmakológiai PARP gátlás során a PARP-1 mRNS-ének gyengítése a MAP kinázok inaktivációjához vezetett a MAP kináz foszfatáz-1 megnövekedett citoplazmáris lokalizációján keresztül. Jelenlegi eredményeink mindezen felfedezéseket megerősítik egy bonyolultabb in vivo állatkísérletes hipertónia modellben is. A megnövekedett MKP-1 és ezáltal csökkent MAPK aktivitás igen fontos mechanizmus lehet a csökkent kollagen termelődés hátterében, melyet az L-2286-al kezelt állatok esetén találtunk.

A csökkent foszforilációs állapota a MAP kinázoknak védő hatású lehet a vaszkuláris remodellinggel szemben, mert kisebb a fibrózis mértéke a TGF- β -független jelátviteli útvonalon keresztül. Továbbá a MAP kináz útvonalon át fokozódó NF- κ B aktiváció tovább serkenti a fibrózis kialakulását a TGF- β 1 függő jelátviteli útvonalon keresztül, mely tovább fokozza a gyulladást előidéző fehérjék termelődését, melyeknek fontos szerepe van az endotél diszfunkció és az atherosclerosis kialakulásában.

A rezveratrol kezelés hatása posztinfarktusos betegekben

Tanulmányunkban 40 posztinfarktusos betegnél vizsgáltuk a rezveratrol lehetséges kardioprotektív hatását. Számos tanulmány igazolta a rezveratrol kedvező hatását az endotél funkcióra, azonban ezek a megfigyelések állat modellekben, in vitro humán erekben, vagy pedig a rezveratrol egyszeri bevétele alapján történtek. Vizsgálatunkban az endotél funkciót FMD-vel jellemeztük, mely szignifikáns mértékű ($p < 0.05$) javulást mutatott 3 hónapos rezveratrol kezelést követően. Korábbi kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy az FMD javulása az NO termelődés fokozódásán keresztül jön létre.

A hemorheológiai paraméterek szerepe az atherosclerosis kialakulásában jól ismertek. Korábbi kísérletek során in vitro modellekben már bizonyították a rezveratrol vérlemezke aggregáció gátló hatását, mely az aggregációt gátló prosztaglandinok termelődésének

fokozásával magyarázható. Ezen kívül kimutatták, hogy gátolja az I-es típusú kollagén mRNS-ének expresszióját és koncentrációfüggő módon a kollagén indukálta vérlemezke aggregációt. Betegeink nagy része (80%) a vizsgálat során aspirin terápiában részesült. A 3 hónapos vizsgálati periódus alatt a placebo csoportban észlelt fokozott trombocita aggregáció a kifejlődő aspirin intolerancia kialakulásával magyarázható, mely vizsgálatunk szerint nagymértékben csökkenthető rezveratrol kezeléssel. Mindezek alapján a rezveratrolnak fontos szerepe lehet az aspirin intolerancia kezelésében.

A vörösvértest deformabilitásnak fontos szerepe van a koronária mikrocirkulációban hiszen a kapillárisok átlagos átmérője kisebb a vörösvértest átmérőjénél, tehát a csökkent vörösvértest deformabilitás ronthatja a koronária keringést. A placebo csoportban a vörösvértest deformabilitás csökkenését észleltük, mely deformabilitás csökkenés a rezveratrol kezelt csoportban nem jelentkezett.

Az emelkedett szérum LDL-koleszterin szint károsítja az endothel sejteket és fontos szerepet játszik az atherosclerosis kialakulásában. Az irodalmi adatok nem egyértelműek a rezveratrol lipid csökkentő hatását tekintve. Tanulmányunkban a rezveratrol csökkentette az LDL-koleszterin szintet $p < 0.05$, valamint nem szignifikáns mértékben az összkoleszterin szintet, de más lipid paraméterekre nem volt kedvező hatással.

Számos állatmodellben kimutatták, hogy a rezveratrolnak direkt védő hatása van a cardiomyocitákra. Echocardiographiás vizsgálataink során a rezveratrol kezelt csoportban a bal kamra szisztolés funkció lényegében nem változott, a bal kamra diasztolés funkciójában azonban szignifikáns javulást észleltünk. Utóbbi összefüggésben állhat a rezveratrol állatkísérletek során észlelt fibrózist gátló hatásával.

7. Összefoglalás

7.2. L-2286 jelű vegyület vazoprotektív hatásának vizsgálata krónikus hipertenzív patkány modellben

7.2.1. A PARP-1 enzim farmakológiai gátlásának a hipertónia által okozott vaszkuláris remodellinggel szemben szignifikáns mértékben védő hatása van, annak ellenére, hogy nem rendelkezik antihipertenzív hatással.

7.2.2. Csökkenti az érfalban a fibrózis mértékét, mely a fokozott MKP-1 enzim fokozott aktivitásának és a MAP kinázok gátlásának köszönhető.

7.2.3. A PARP gátlás aktiválja az Akt-1 jelátviteli útvonalat, melynek fontos szerepe van a mitokondriális károsodás megelőzésében és a sejthalál csökkentésében.

7.2.4. A PARP enzim gátlása egy ígéretes terápiás lehetőség, hogy megelőzzük a hipertónia okozta vaszkuláris komplikációkat, főleg azokban a betegekben akiknél az alacsonyabb vérnyomás okozta panaszok, valamint a vérnyomáscsökkentő gyógyszerek mellékhatásai miatt nehezebb a célvérnyomásértékeket elérni.

7.3. Eredményeink azt mutatják, hogy a rezveratrol posztinfarktusos betegekben az alkalmazott szekunder gyógyszeres kezelés mellett további kardioprotektív hatással rendelkezik:

7.3.1. Javítja az endotél funkciót melynek meghatározására a flow-mediálta vazodilatációt használtuk.

7.3.2. A rezveratrolnak nagyon kedvező hatása van számos hemorheológiai és lipid paraméterre melyek az atherosclerosis előrehaladásában fontos szerepet játszanak.

7.3.3. A rezveratrol kezelés javítja a bal kamra diasztolés funkciót mely a rezveratrol fibrózist csökkentő hatásának következménye.

7.3.4. A rezveratrol adása (alkohol bevitel nélkül) ajánlható posztinfarktusos betegek számára, hogy lassítsa a remodellinget és az ateroszklerózis progresszióját.

8. Köszönetnyilvánítás

Kísérleteinket a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben, valamint az I. sz. Belgyógyászati Klinikán végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán 2007 és 2011 között.

Szeretnék köszönetet mondani tanáromnak és programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki irányította tanulmányaimat, támogatott és hasznos tanácsokkal látott el. Köszönettel tartozom Prof. Sümegi Balázsnak, aki a biokémiai gondolkodásra tanított. A PARP gátlók terén segítette munkámat és zavartalan körülményeket biztosított számomra intézetében.

Szintén köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Halmosi Róbertnek kitűnő munkájáért, és az echocardiográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

Igazán hálás vagyok Prof. Dr. Koller Ákosnak, Prof. Hamar Jánosnak, Prof. Dr. Seress Lászlónak, Prof. Dr. Hideg Kálmánnak a kísérletek során nyújtott hasznos tanácsaikért, segítségükért.

Köszönettel tartozom még Dr. Szabados Eszternek, Dr. Vámos Zoltánnak, Dr. Bartha Évának, Dr. Bruszt Kittinek, Dr. Szabó Alízna, Solti Izabellának, Deres Lászlónak, Erős Krisztiánnak és Bognár Eszternek a kísérletek során nyújtott segítségükért és hasznos tanácsaikért. Hálás vagyok Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak, Pásztor Istvánnának, Halász Helénának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségért. Köszönöm az összes barátomnak, a családomnak a bátorítást, melyet tanulmányaim és munkám során nyújtottak.

