

Az első évben az akut diabéteszes krízisben lévő betegek keringő leukocitáiban vizsgáltuk a PARP aktivációját és a nitroztirozin, mint nitroztív stressz marker jelenlétét. Eredményeink szerint a betegekben jelentős PARP aktiváció és nitroztív stressz alakul ki, amely a cukorháztartás normalizálása után rendeződik. Diabéteszes komplikációk miatt amputálásra került végtagok bérének mikroereiben in vitro vizsgáltuk az erek válaszkészségét. Eredményeink szerint az erek kontrakciós és dilatációs válasza részben megtartott. Patkánykísérletekben vizsgáltuk a PARP gátlószer PJ34 hatását a szívfunkcióra inzulin dependens diabetes mellitus modellben. A PJ34 kezelés szignifikánsan javította az állatok futóhengeren mért teljesítményét in vivo, és szintén javult az izolált szíveken mért teljesítmény. Egy másik kísérletsorozatban azt találtuk, hogy a diabéteszes állapot fokozza a LPS által kiváltott gyulladással választ, és ez a kombinált válasz erősen függ a PARP enzim aktivációjától. Ezen megfigyelések a diabéteszes betegekben jelezhető fokozottabb gyulladáskészség magyarázatában fontosak lehetnek.

A következő évben a diabéteszes patkányok szoros glükózkontroll versus intermittáló glükózkontroll protokolljában az in vivo kísérleteket elvégeztük, a vaszkuláris funkció kiértékelésre került és a PARP aktiváció kvantifikálása jelenleg folyik. A diabéteszes vesebetegség projektben a munka befejeződött, kimutattuk, hogy a PARP enzim aktivációja a vesebetegségben a podocita apoptózis és a vaszkuláris funkció rontása által fejti ki hatását. Kimutattuk diabéteszes szívek diszfunkcióját is, melyet PARP gátlás nem javított. Befejeztünk két, humán mintákat felhasználó kísérletet. Az egyikben diabéteszes betegek a. mammariális vaszkuláris funkciójában mértünk ki jelentős romlást, melyet PARP aktiváció kialakulása mellett jött létre. Egy másik sorozatban keringő vörsejtekből mértünk PARP aktivációt cukorbetegségben, amely inzulinos kezelés hatására rövid távon normalizálódott.

A pályázat utolsó évében az előző évben elkezdett munkákat befejeztük, és a közleményeket publikációra elküldtük. A további munkaszakaszokban a diabéteszes kapcsolatos ko-morbiditásokra (öregedés, atherosclerosis) tettük a hangsúlyt. Ischemia-reperfúziós és gyulladással szövetségi károsodás okozta PARP aktiváció ismertén fokozza a gyulladással asszociált AP-1 és NF-kappaB transzkripciós faktorok által regulált gének expresszióját. Kísérleteinkben az öregedéssel együttjáró PARP aktiváció génexpresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk szívekben. Fiatal és idős állatok szíveiben realtime RT-PCR-rel vizsgáltuk a COX-2 (ciklooxygenáz-2), iNOS (indukálható nitrogén monoxid szintáz), TNF-alpha (tumor nekrosis faktor-alpha), IL-1beta (interleukin-1beta), TGF-beta (transzformáló növekedési faktor-beta), ICAM-1 (intercelluláris adhéziós molekula-1) és VCAM (vaszkuláris sejtadhéziós molekula) expressziót. Az öreg állatok szíveiben magasabb volt a szintje a gyulladással citokin TNF-alpha-nak, az iNOS-nak, a COX-2-nek, az infiltráló sejtek kitapadását elősegítő ICAM-1-nek és a VCAM-nek. Míg szignifikánsan csökkent az antiinflammatorikus TGF-beta expressziója is. Másik in vivo modellünkben a zsíros, gazdag („atherogen”) diéta által indukált zsírmáj volt. Diabéteszesben a máj és az izomzat

fontos szerepet játszanak az inzulin rezisztencia kialakulásában. A hepaticus inzulin rezisztencia fokozott glukoneogenezis révén vezet zsírmáj kialakulásához és a következményes lipidszint eltérésekhez. A zsírmáj kialakulásának másik gyakori oka az obesitas. Modellünkben a zsírmáj indukciója zsírban gazdag diétával történt, a szénhidrátanyagcsere paramétereit tekintetében eltéréseket nem detektáltunk. Az oxidatív stresszre vonatkozóan szintén génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. A zsírban gazdag diéta az iNOS expresszió egy nagyságrendnyi emelkedését váltotta ki, míg kisebb mértékű emelkedést detektáltunk a COX-2 és a TNF-alpha expressziójában. Antioxidáns kezelés az iNOS expressziót nem csökkentette, de mérsékelte a TNF-alpha és szignifikánsan csökkentette a COX-2 expressziót is. Ezek alapján felvázolható az a hipotézis, hogy a zsírokban gazdag diéta hatására a zsírmáj alakul ki, a májban drámaian fokozódik az iNOS expresszió, mely növeli az NO kínálatot, és szuperoxiddal reagálva jelentős mértékben növeli a peroxinitrit képződést. A peroxinitrit hatására PARP aktiváció alakul ki, és nő az NF-kappaB és AP-1 regulált gének expressziója, így a TNF-alpha és a COX-2 expresszió is. Antioxidáns kezelés nincs hatással az iNOS expresszióra, viszont a képződő reaktív oxidánsokat részben közömbösíteni képes, és részlegesen csökkenteni a következményes gyulladási mediátorok expressziójának emelkedését. Jelenleg vizsgálatokat végzünk a PARP aktiváció összehasonlítására ebben a modellben. In vitro modelleinkben a hiperglikémiát kombináltuk oxidáns kezeléssel, illetve inzulin rezisztenciát modelleztünk in vitro. H9c2 kardiomiocitákat tartósan hiperglikémiában (25mM glükóz) tartottunk, exogén oxidáns kezeléssel PARP aktivációt váltottunk ki. A peroxid kezelés dóziszfüggő PARP aktivációt váltott ki, amelyet Western bloton a PARP magasságában detektálható PAR szignál kvantifikálásával mértünk. Az oxidatív stressz dóziszfüggően sejtpusztulást indukál a kardiomiocitákon, mellyel szemben szignifikáns védőhatást fejt ki a PARP gátlás (PJ34) 3 órában, de hosszabb távon (16-24 óra) nem jár citoprotekcióval (8.ábra). A sejtek viabilitását MTT assay-vel mértük. A PARP aktiváció alacsonyabb dóziszú (500uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kezelés hatására is 10 percen belül detektálható volt, és maximális mértéket 1 órával a peroxid hozzáadása után ért el. In vitro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására izolált érgyűrűkön is DNS törések alakulnak ki, amit TUNEL festéssel detektáltunk. A lánctörések PARP aktivációhoz vezetnek, és ezáltal a mitokondriális apoptózis indukáló faktor (AIF) nukleáris transzlokációját váltják ki. A PARP gátló INO-1001 kezelés kis mértékben csökkentette a TUNEL pozitívítást, és szignifikánsan lecsökkentette a PARP aktivációt és AIF transzlokációt. (A TUNEL pozitívítás csökkenését magyarázhatja a kisebb mértékű AIF transzlokáció, illetve ezáltal kisebb mértékű caspase és DNase aktiváció, melynek következménye egyaránt pozitív festődést okoz a TUNEL reakciónál.) A PARP gátló kezelés szintén javította a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására kialakuló endotélfüggő relaxációs zavart. További modellünkben inzulin rezisztenciát váltottunk ki azzal, hogy a sejteket tartósan magas glükóz tartalmú médiumban tartottuk. A magas glükózban fenntartott L6 sejtekben az inzulin kiváltotta glükóz felvétel elmarad.

A projekt eredményeképpen számos prezentáció és publikáció történt. Mindezen felül, egyes elkezdett kísérleteket más források felhasználásával az idei év során folytatni tervezzük, és további közleményeket tervezünk írni.