

dc\_1529\_18

# MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Halmosi Róbert



Pécsi Tudományegyetem  
Klinikai Központ  
I. sz. Belgyógyászati Klinika

2018.

# Tartalomjegyzék

<b>1.</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>6</b>
2.1.	SZÍVELÉGTLENSÉG .....	6
2.2.	A KOSZORÚÉRBETEGSÉG, MINT A SZÍVELÉGTLENSÉG RIZIKÓFAKTORA .....	6
2.2.1.	<i>A rezveratrol hatása a kardiovaszkuláris rendszerre .....</i>	<i>7</i>
2.3.	A HIPERTÓNIA, MINT A SZÍVELÉGTLENSÉG EGYIK LEGFONTOSABB PATHOGENETIKAI FAKTORA.....	8
2.4.	A HIPERTÓNIA KARDIO- ÉS CEREBROVASKULÁRIS KÖVETKEZMÉNYEI .....	9
2.5.	AZ OXIDATÍV STRESSZ JELENTŐSÉGE A KARDIOVASKULÁRIS RENDSZERBEN .....	10
2.5.1.	<i>Az oxidatív stressz szívizomzatra gyakorolt hatásai.....</i>	<i>11</i>
2.5.2.	<i>Az oxidatív stressz érrendszeri hatásai .....</i>	<i>13</i>
2.6.	A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ ENZIM JELENTŐSÉGE AZ OXIDATÍV SEJTKÁROSODÁS KIALAKULÁSÁBAN.....	13
2.7.	A JELÁTVITELI FAKTOROK SZEREPE AZ OXIDATÍV SEJTKÁROSODÁS FOLYAMATÁBAN ÉS A KARDIOVASKULÁRIS REMODELLINGBEN .....	15
2.8.	A MITOKONDRIMUM SZEREPE A REMODELLING ÉS A SZÍVELÉGTLENSÉG KIALAKULÁSÁBAN .....	16
<b>3.</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>18</b>
<b>4.</b>	<b>MÓDSZEREK .....</b>	<b>20</b>
4.1.	EX VIVO ÉS IN VIVO MIOKARDIÁLIS INFARKTUS MODELLEK .....	20
4.1.1.	<i>Langendorff szívperfúziós vizsgálatok (iszkémia-reperfúzió) .....</i>	<i>20</i>
4.1.2.	<i>In vivo miokardiális infarktus modell.....</i>	<i>21</i>
4.2.	KRÓNIKUS KÍSÉRLETES SZÍVELÉGTLENSÉG MODELLEK .....	21
4.2.1.	<i>Posztinfarktusos szívelégtelenség modell.....</i>	<i>21</i>
4.2.2.	<i>Hipertenzív szívelégtelenség modellek .....</i>	<i>22</i>
4.2.3.	<i>Toxikus szívelégtelenség modell.....</i>	<i>22</i>
4.2.4.	<i>Szövetminták kivétele, tartósítása .....</i>	<i>23</i>
4.3.	VÉRNYOMÁSMÉRÉS .....	23
4.4.	KISÁLLAT ECHOCARDIOGRAPHIA .....	23
4.5.	KISÁLLAT VASKULÁRIS ULTRAHANG VIZSGÁLATOK .....	24
4.6.	SZÍV NMR VIZSGÁLATOK .....	24
4.7.	IZOMETRIÁS ÉR-MIOGRÁFIA.....	25
4.8.	PLAZMA BNP KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA .....	25
4.9.	SZÖVETTAN .....	25
4.10.	ELEKTRONMIKROSKÓPIA .....	26
4.11.	AZ INFARKTUS MÉRETÉNEK MEGHATÁROZÁSA .....	27
4.12.	SZÉRUM NEKROENZIMEK AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA .....	27
4.13.	A MITOKONDRIÁLIS ENZIMAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA .....	27
4.14.	A LIPID PEROXIDÁCIÓ ÉS A FEHÉRJE OXIDÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA .....	27
4.15.	IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS KONFOKÁLIS LÉZER-SCANNING FLUORESZCENS MIKROSKÓPIA .....	28
4.16.	WESTERN-BLOT .....	28
4.17.	SEJTVIABILITÁSI VIZSGÁLATOK .....	29
4.18.	A REZVERATROL VIZSGÁLATA POSZTINFARKTUSOS, STABIL KORONÁRIA BETEGEK KÖRÉBEN. A HUMÁN KLINIKAI VIZSGÁLAT MÓDSZERTANA .....	30
4.18.1.	<i>Betegek és módszerek .....</i>	<i>30</i>
4.18.2.	<i>Laboratóriumi paraméterek .....</i>	<i>30</i>
4.18.3.	<i>Hemoreológiai paraméterek .....</i>	<i>30</i>
4.18.4.	<i>Flow-mediálta vazodilatáció .....</i>	<i>31</i>
4.18.5.	<i>Echocardiographia.....</i>	<i>31</i>

4.19.	STATISZTIKAI ELEMZÉS.....	31
<b>5.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>35</b>
6.1.	A DOKTORI MŰBEN TÁRGYALT MUNKÁBÓL SZÜLETETT KÖZLEMÉNYEK .....	35
6.2.	A JELÖLT TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEI, MELYEK A DOKTORI MŰ EREDMÉNYEIHEZ, TÉMÁJÁHOZ SZERVESEN NEM CSATLAKOZNAK.....	36
6.3.	A JELÖLT KÖZLEMÉNYEINEK TUDOMÁNYMETRIAI ADATAI .....	40
<b>7.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>42</b>

## 1. Rövidítések listája

4-HNE	4-hidroxinonenal
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
AIF	apoptózis-indukáló faktor
Akt-1	protein kináz B
ATP	adenozin trifoszfát
Bax	Bcl-2 asszociált X fehérje
Bcl-2	B-sejtes lymphoma 2 fehérje
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalm modulín-dependens protein kináz II
DOX	doxorubicin
DRP-1	dynamín-related protein-1
EF	ejekciós frakció
EKG	elektrokardiográfia
eNOS	endoteliális
ERK	extracelluláris szignál regulálta kináz
ET-1	endotelin-1
GPX	glutathion peroxidáz
GSK-3β	glikogén szintáz kináz-3β
GTP	guanozin trifoszfát
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén peroxid
HHD	hipertenzív szívbetegség
HFpEF	diasztolés szívelégtelenség (heart failure with preserved EF)
HFrEF	szisztolés szívelégtelenség (heart failure with reduced EF)
HSP	hősokk fehérjék
HtrA2	magas hőmérsékletigényű protein A 2
IR	iszkémia-reperfúzió
ISO	izoproterenol
JNK	c-Jun N-terminal kináz
L-2286	quinazolin származék PARP enzim gátló molekula
LDH	laktát dehidrogenáz
LVEDV	balkamrai végdiasztolés volumen
LVESV	balkamrai végszisztolés volumen
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
Mfn	mitofuzin
MKP-1	MAP kináz foszfátáz-1
MMP	mátrix metalloproteináz
MRA	mineralokortikoid receptor antagonistá gyógyszer
mtDNS	mitokondriális DNS
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid-adenin dinukleotid

NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor-kappa B
NO	nitrogén monoxid
NOXs	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát oxidázok
O <sub>2</sub> -	szuperoxid anion
OMM	mitokondriális külső membrán
OPA1	optikus atrófia fehérje-1
p38-MAPK	p38 mitogén aktiválta protein kináz
Pi	anorganikus foszfát
PAR	poli(ADP-ribóz) polimer
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz enzim
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim
PCr	kreatin foszfát
PI3K	foszfatidilinozitol-3 kináz
PKC	protein kináz C
ROS	reaktív oxigén szabad gyökök
SBP	szisztolés vérnyomás
SHR	spontán hipertenzív patkány
Sirt	sirtuin (hiszton deacetiláz)
SMAC/DIABLO	kaspázok második mitokondriális aktivátora
SOD	szuperoxid dizmutáz
TBARS	tiobarbitursav reaktív anyagok
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
TNF- $\alpha$	tumor nekrozis faktor $\alpha$
TUNEL	terminális dezoxinukleotid-transzferáz mediálta dUTP láncvég jelölés
WKY	Wistar-Kyoto patkány
XO	xanthin oxidáz

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Szívelégtelenség

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

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

A szívelégtelenségnek klinikailag is széles a spektruma, kezdve az aszimptomatikus balkamra hipertrófiától egészen a manifeszt betegsépig, a jobb szívfél elégtelenségtől a bal szívfél elégtelenségéig.

A szisztolés szívelégtelenség kezelésében a béta-blokkolók és a neurohumoralis aktiváció gátlás (ACE-gátló, ill. MRA) bevezetése és elterjedése az elmúlt két évtizedben jelentősen javította a betegek életkilátását. Ennek ellenére a betegség prognózisa még mindig rossz, a szívelégtelenség halálozása magasabb, mint a leggyakoribb daganatos megbetegedéseké. A diasztolés szívelégtelenség kezelésében pedig még egyáltalán nem rendelkezünk a betegség lefolyását egyértelműen kedvezően befolyásoló gyógyszeres kezeléssel.

### 2.2. A koszorúérbetegség, mint a szívelégtelenség rizikófaktora

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

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

Ezért alapvetően fontos a szekunder prevenció, azaz egy újabb koronária történes kivédése. A szekunder prevenciónak az utóbbi két évtizedben széles körben elterjedt gyógyszerei közé tartozik a tct aggregáció gátlás, a sztatin és az ACE-gátló kezelés. A prevenció leghatékonyabb módja azonban mégis a primer prevenció, amely az első vaszkuláris esemény megakadályozását célozza meg. Ennek farmakológiai alapjai alapvetően megegyeznek a szekunder prevencióéval, azonban az életmódi faktoroknak itt talán még fontosabb szerepük van, mint a posztinfarktusos betegekben. A farmakológias és non-farmakológias preventív erőfeszítéseknek köszönhetően a koronáriabetegség morbiditása és mortalitása az európai országok túlnyomó részében nagymértékben csökkent az elmúlt 30 évben.

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

### **2.2.1. A rezveratrol hatása a kardiovaszkuláris rendszerre**

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

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

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

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

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

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

A tartósan fennálló magas vérnyomás változásokat hoz létre a balkamra struktúrájában, geometriájában, illetve funkciójában. Ezeket az elváltozásokat összefoglaló néven remodellingnek nevezzük. A szívizomzat tekintetében a remodelling következtében a balkamra falának megvastagodását látjuk. A balkamra hipertrófia kezdetben egy adaptív, kompenzatórikus mechanizmus, melynek hatására a nyomás- és (egyéb etiológiai tényezők esetén) a volumenterhelés által előidézett fokozott falfeszülés csökken és a szív teljesítménye megtartott marad (Laplace törvénye). Azonban egy határ felett ez az adaptív induló folyamat patológiássá válik az elégtelen vérellátás miatt. Egyfelől a vaszkulátúra nem követi a miokardium vastagodását, másfelől a koronária rezisztencia erek szintén érintettek, az intramiokardiális artériák és arteriolák falának megvastagodása mellett perivaszkuláris fibrózis is jelen van, melyek mindegyike csökkenti a perfúzió hatékonyságát. A patológiás remodelling már nem a szívizomsejtek hipertrófiájával, hanem sokkal inkább az intersticiális fibrózissal és a szívizomsejt halállal jellemezhető. Így végül a kompenzatórikusnak induló balkamrai remodelling rontja a szív funkcióját és szívelégtelenséget okozhat. Ráadásul a balkamra funkció romlása tovább rontja a többi szerv vérellátását is. Ezen pathofiziológiai háttér ismeretében nem meglepő, hogy a balkamra hipertrófia kialakulása a legfontosabb predisponáló tényezője a manifeszt szívelégtelenség kialakulásának hipertóniás betegekben.

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



## 2.4. A hipertónia kardio- és cerebrovaszkuláris következményei

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

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

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

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

A hipertónia tehát egy magas prevalenciájú betegség (az USA-ban mintegy 70 millió hipertóniás él), mely jelentős morbiditási és mortalitási tényező világszerte. Ugyanakkor a klinikai gyakorlatban alkalmazott sokféle antihipertenzív gyógyszer ellenére a betegek jelentős részénél nem sikerül elérni a célvérnyomásértéket. Ennek hátterében lévő legjelentősebb tényezők a gyógyszer mellékhatások, intolerancia és a következményes csökkent gyógyszereszedési adherencia állnak. Egy hemodinamikai hatásokkal nem rendelkező, azonban a hipertenzió kardiovaszkuláris szövődményeit kivédő gyógyszernek ezért klinikailag igen nagy jelentősége lenne, hiszen azon betegekben, akikben a célvérnyomásértékek nem érhetők el antihipertenzív kezeléssel, az érrendszeri rizikó, illetve a szervkárosodások esélye csökkenthető lenne.

## 2.5. Az oxidatív stressz jelentősége a kardiovaszkuláris rendszerben

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

Oxigén szabadgyökök (ROS) fiziológias körülmények között is termelődnek az aerob metabolizmus során a mitokondriumban. A ROS termelés egyéb forrásai a NADPH oxidázok (NOXs), a nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), a lipo- és ciklooxigenázok, a xantin oxidáz, a citokróm P450 enzimrendszer és a monoamino-oxidázok (MAO).

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

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

Mivel a szabad gyökös károsodások az összes szervet érinthetik, nem meglepő, hogy fontos patogenetikai tényezőként szerepelnek a legtöbb betegség kialakulásában. Az oxidatív stressz szerepét számos kórfolyamatban igazolták már, a kardiovaszkuláris betegségekben a rizikófaktoroktól (hipertónia, diabetes) kezdve a tünetmentes ateroszklerózison át egészen az akut kardiológiai kórképekig. Emellett számos neurológiai betegség (Alzheimer-kór, stroke, vaszkuláris demencia), illetve az öregedés folyamatában is jelentős szereppel bírnak. Szívelégtelenségben azonban csak nemrégiben vált egyértelművé az oxidatív stressz centrális kóroki szerepe.

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

Számos vizsgálatban igazolták a ROS fokozott képződését a károsodott szívizomban. Ennek kimutatására alkalmazott elektron spin rezonanciás (ESR) spektroszkópiás vizsgálatok direkt bizonyítékot nyújtottak az elégtelenül működő szívben a fokozott mennyiségű oxigén szabad gyök jelenlétére. Ugyanakkor az antioxidáns enzimek mennyisége érdemben nem változik szívelégtelenségben, sőt a GPx aktivitása még

fokozódik is, ezért egyértelműen a megnövekedett szabad gyök produkció felelős az oxidatív stressz kialakulásáért, nem pedig a csökkent antioxidáns védelem.

### 2.5.1. Az oxidatív stressz szívizomzatra gyakorolt hatásai

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

Fiziológias körülmények a mitokondriális légzési láncan szállított elektronok 98%-ából ATP termelődik a mitokondriumokban a mitokondriális légzési lánc enzimeit által és csupán 1-2%-a fordítódik ROS képződésére. Ezt a mennyiségű oxidánst azonban könnyedén semlegesítik az endogén scavenger mechanizmusok (pl. SOD). Ha azonban a mitokondrium légzési aktivitását blokkolják a Komplex I és Komplex III szintjén, akkor jelentősen megemelkedik a mitokondriumban keletkezett szuperoxid anionok mennyisége. A fenti jelenség szívelégtelenségben is észlelhető, mert ekkor jelentősen csökken a légzési lánc komplexeinek az aktivitása is. A mitokondriumok funkciójának károsodása (megfelelő mennyiségű NADPH jelenlétében) tehát felelős lehet az oxigén szabad gyök produkció megemelkedéséért szívelégtelenségben.

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

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

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

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

Az oxidatív stressz legfontosabb forrása a mitokondrium, mely azonban egyúttal célpontja is a szabad gyökös károsításnak. Mitokondriális szinten a károsodás elsősorban a membránt, a légzési lánc elemeit, a mitokondriális DNS-t (mtDNS), illetve a transzkripciós faktorokat érinti. A mitokondriumok saját örökítő anyaga, mely a légzési lánc komplexeinek genetikai állományát kódolja különösen sérülékeny, mivel nem rendelkezik komplex kromatin struktúrával, mely hatásos barriert képezne a ROS-al szemben. Emellett az mtDNS-nek a repair aktivitása is alacsony. A DNS sérülés következtében károsodik a mitokondriális fehérje expresszió, így a légzési lánc komplexeinek mennyisége is csökkenni fog, amely a mitokondrium funkcióvesztését, energiadepléciót idéz elő. Szívelégtelenségben is igazolták a mitokondrium károsodását és diszfunkcióját, melyet csökkent mtDNS mennyiség, a lipidek peroxidációja, a transzkriptumok mennyiségének csökkenése és sérült oxidatív kapacitás is jellemzett. A károsodott mitokondriumok aztán következményesen tovább fokozzák a ROS termelődést, melynek extramitokondriális következményei is vannak.

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

Az oxidatív stressz emellett a nukleáris DNS károsodását okozva aktiválja a poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) enzimet is, mely jelentős aktiváció esetén a magas energiájú foszfátok mennyiségének csökkentésével programozott, vagy nekrotikus sejthalált okoz. A PARP-1 aktiváció további szerteágazó hatásai külön fejezetben kerülnek részletezésre. A szabad gyököknek direkt hatásuk is van a kontraktilis funkcióra azáltal, hogy módosítják a kontrakcióban szerepet játszó fehérjéket, ezáltal csökkentve azok funkcióját. A ROS a kontraktilitást főként a szarkoplazmás retikulumban bekövetkezett változások révén befolyásolja. A NOX2 a rianodin receptorokhoz (RyR2) közel helyezkedik el, melyek szerepe a kalcium felszabadulás szabályozásában van. Stressz hatására fokozódik a kalcium felszabadulás a szarkoplazmás retikulumból, ezáltal kezdetben fokozódik a kontraktilitás, azonban hosszú távon a folyamat a kalcium raktárak kiürüléséhez, ezáltal a kontraktilitás romlásához, valamint a citoplazmatikus kalcium szint megemelkedésével fokozott aritmia hajlamhoz vezet. A szabad gyökök aktiválják továbbá a mátrix metalloproteinázokat (MMP), melyek fontos szerepet töltenek be a remodelling folyamatában, illetve végső soron a balkamrai dilatáció és a szisztolés funkciózavar kialakulásában is.

### 2.5.2. Az oxidatív stressz érrendszeri hatásai

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

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

Nem minden hipertóniás betegben igazolható ugyanakkor az oxidatív stressz megléte. Egy humán vizsgálat alapján például enyhe-közepes vérnyomásemelkedés esetén az oxidatív sejtkárosodást jelző paraméterek (pl. TBARS) még nem mutattak emelkedést. Azonban a hipertónia legtöbb kísérletes modellje, így az SHR esetében is egyértelmű a fokozott ROS termelődés, valamint emelkedett NOX aktivitás szerepe a kórkép kialakulásában. A szabad gyökök semlegesítése scavenger molekulák alkalmazásával azonban alapvetően nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket a hipertónia kezelésében. A ROS alapvetően befolyásolja a vaszkuláris funkciót az endotél károsításán keresztül. Az endoteliális eNOS NO-t, egy potens vazodilatátor anyagot termel, mely részt vesz a vérnyomás szabályozásában. Hipertóniában, az oxidatív stressz során termelődő  $O_2^{\cdot-}$  reakcióba lép az NO-val és igen reakcióképes peroxinitritet ( $ONOO^{\cdot-}$ ) képez. Ezáltal csökken az NO hozzáférhetősége, mely az értónus növekedéséhez vezet. Emellett a peroxinitrit károsítja a lipoproteineket nitrotirozin adduktok képzésével, ami tovább rontja az erek struktúráját és funkcióját.

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

### 2.6. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim jelentősége az oxidatív sejtkárosodás kialakulásában

A poli(ADP-ribóz) polimeráz aktivitással rendelkező enzimek a különféle noxák (pl. oxidatív sejtkárosodás) által kiváltott egyes láncú DNS törések hatására aktiválódnak. Az aktiváció hatására a  $NAD^+$  hasításával ADP-ribóz alegységeket képeznek, melyeket aztán polimer formájában a sérült DNS szakaszhoz kapcsolnak, ezzel segítve a DNS repair

folyamatát. A DNS-hez kapcsolt PAR lánc szignálként szolgál ugyanis egyes repair enzimek (DNS ligáz III és DNS polimeráz  $\beta$ ), illetve scaffold fehérjék számára. A repairt követően a PAR lánc lebontását a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP-ribozil hidroláz végzi.

A PARP enzimes családnak 17 tagja ismert jelenleg. Ezek közül a PARP-1 a legrégebb óta ismert és a legkiterjedtebben vizsgált enzim. A PARP-1 jelentős mennyiségben található meg a sejtmagban és a sejtek PAR-ilációs képességének mintegy 85-90 %-áért felelős. Nagy mennyiségének köszönhetően a PARP-1 oxidatív stressz hatására bekövetkező aktivációja programozott vagy nekrotikus sejthalált okoz azáltal, hogy jelentős mennyiségű  $\text{NAD}^+$ -ot használ fel működése során. Mivel a  $\text{NAD}^+$  központi szerepet játszik az anyagcsere folyamatokban, azon belül is az energiatermelés folyamatában, ezért hiányában jelentősen károsodik az ATP termelődés mértéke. A  $\text{NAD}^+$  pótlása ráadásul rendkívül energiaigényes folyamat, hiszen 1 Mól  $\text{NAD}^+$  pótlása nikotinamidból 4 Mól ATP-t igényel. A két folyamat eredőjeként a PARP aktiváció a magas energiájú foszfátok szintjét jelentősen csökkenti.

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

A PARP-1 aktiváció emellett direkt mitokondriális hatással is bír, jelentősen rontja a légzési lánc tagjainak aktivitását, növelve ezzel a mitokondriális szabad gyök produkciót. Az alacsony  $\text{NAD}^+$  szinten keresztül pedig gátolja a sirtuinok aktivitását is, mely szintén az energia metabolizmus károsodásához vezet. A PAR polimerek a mitokondriumba jutva az eddigi mechanizmusoktól eltérő módon is képesek apoptózist indukálni, mivel fokozzák a mitokondriális NADPH oxidáz és apoptózis indukáló faktor (AIF) kiszabadulását és nukleáris transzportját. A PARP aktiváció az NF- $\kappa$ B aktiválásával fokozza a gyulladásos faktorok termelődését, valamint a hipertrófia és a fibrózis kialakulásában szerepet játszó jelátviteli faktorok aktivitását (PKC  $\alpha/\beta$ , PKC  $\lambda/\zeta$ , MAPKs). Továbbá a szabadgyökök csökkenthetik a prosurvival jelátviteli faktorok aktivitását is. A ROS hatására aktiválódó redox szignalizációs útvonalak a sejtek diszfunkciója mellett végső soron fontos szerepet töltenek be a programozott sejthalál, az apoptózis kialakulásában is.

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

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

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

A szív remodellingje során - amely a károsító stresszfaktor krónikus fennállása esetén végül manifeszt szívelégtelenséghez vezet - szintén jelentős szerepet játszanak a jelátviteli faktorok. A remodelling kezdeti szakaszában a még fiziológiás adaptív folyamatok mediálása során a PI3K/Akt-1 upstream faktorok foszforilálása által gátlódik a glikogén szintáz kináz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), illetve aktiválódik az ERK1/2. Ebben a stádiumban elsősorban a kardiomiocita hipertrófia a domináns változás. A későbbi, már a szívelégtelenség irányába mutató ún. patológiás remodelling során inkább egyes protein kináz C (PKC) izoenzimek (elsősorban  $\alpha/\beta$  és  $\zeta/\lambda$ ), az ERK (Thr188), a calcineurin/CaMKII, valamint a G-protein-kötött receptorok és a G $\alpha$ q aktivitásának fokozódása jellemző. Ekkor már a szívmusclejt hipertrófia helyett a fokozatos sejtvesztés és a reaktív intersticiális kollagén felszaporodás a jellemző eltérés. Ebben a folyamatban a Thr188 pozícióban aktivált ERK1/2 mellett a MAP kináz család másik két tagja, a c-jun N-terminal kináz (JNKs) és a p38 MAPK is jelentős szereppel bír.

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

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

## 2.8. A mitokondrium szerepe a remodelling és a szívelégtelenség kialakulásában

A mitokondrium a sejt központi energiatermelő organeluma, mely a miokardiumban hatalmas mennyiségben található meg, a szívizomsejtek mintegy 25%-át foglalják el. A szervezetben termelődő ATP mintegy 95%-a itt képződik. Akut és krónikus stressz szituációk között, így szívelégtelenségben is csökken a magas energiájú foszfátok (ATP, CrP) és a  $\text{NAD}^+$  koncentrációja. Ennek hátterében a mitokondriális elektron transzport lánc oxidatív stressz általi károsodása áll. Ismert, hogy a légzési lánc funkciójának gátlása/károsodása a Komplex I szintjén jelentősen csökkenti az ATP szintézist a transzmembrán protongradiens összeomlása következtében. Az energiahány következtében másodlagosan csökken a metabolizmus egyik legalapvetőbb kofaktorának, a  $\text{NAD}^+$ -nak a koncentrációja is. A jól ismert redox szerep mellett a Komplex I a ROS termelés egyik kiemelt helyszíne is, elsősorban a fiziológias működés károsodásakor. Ilyenkor az elektronszivárgás következtében az oxigén redukálódik és szuperoxid anion keletkezik, tovább fokozva az oxidatív stresszt.

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

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

A mitokondriumok külső membránjának permeabilizációja (MOMP) az apoptózis intrinsic útjának aktivációját okozza. A permeabilizáció hatására az innen kijutó fehérjék (citokróom c, SMAC/DIABLO, HtrA2, Endonukleáz G, AIF) apoptózist indukálnak. Azonban remodelling során és szívelégtelenségben nem csak apoptotikus, hanem nekrotikus (illetve átmeneti nekroptotikus) sejthalál is észlelhető. Nekrozisban egy mitokondriális belső membránban elhelyezkedő nem szelektív pórus, az ún. „mitochondrial permeability transition pore” (mPTP) megnyílásának van jelentős kóros szerepe. Az mPTP megnyílásának triggere többek között a kalcium túltöltés, az oxidatív stressz, illetve alapvetően az energiahányos állapotok ( $\text{ATP}\downarrow$ ,  $\text{Pi}\uparrow$ ). Az mPTP nyílás hatására összeomlik a mitokondriális transzmembrán gradiens és megszűnik az ATP termelés, valamint degradáló enzimek (proteázok, lipázok) szabadulnak ki a mitokondriumból, melyek a kaszpázoktól független sejthalált okoznak.

Korábban a mitokondriumokat statikus sejtorganelumként tekintették. Újabban igazolódott, hogy annak érdekében, hogy adekvát módon lássák alapvető energetikai



funkciójukat, számos folyamat befolyásolja számukat, méretüket és elhelyezkedésüket. Ezen folyamatokat összefoglaló néven mitokondriális dinamikának nevezzük.

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

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

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

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

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

#### **Részletezett célkitűzések:**

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

c. A remodellingben és a sejttúlélésben szerepet játszó intracelluláris jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitásának nyomon követése.

d. Hőszokk fehérjék mennyiségi változásai

e. A sejt energetikai jellemzőit, valamint a mitokondrium funkcionális és struktúrális változásainak azonosítása.

6. Vizsgálni kívántuk továbbá a rezveratrol hatását posztinfarktusos szívelégtelenségben:

a. a szív struktúrális átépülésének és a következményes funkcionális változásoknak a jellemzésével,

b. az intersticiális fibrózis és az oxidatív stressz mértékének meghatározásával,

c. egyes jelátviteli faktorok és gyulladásos markerek szintjének a megméréseivel.

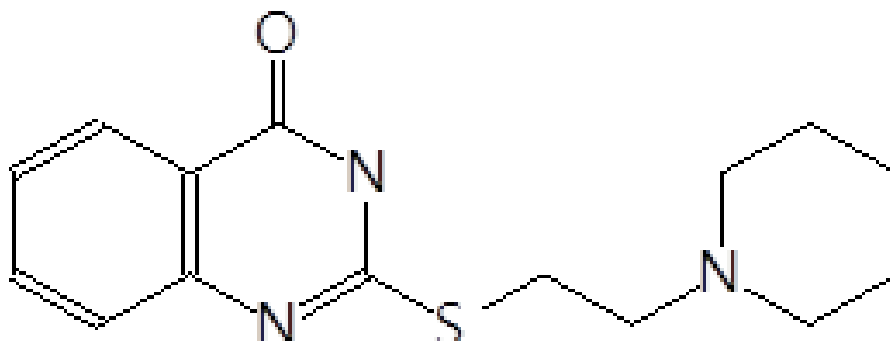
7. Emellett humán klinikai vizsgálatban kerestük a választ arra a kérdésre, hogy vajon a rezveratrol az evidenciákon alapuló terápiá mellett alkalmazva rendelkezik-e addicionális pozitív hatással posztinfarktusos stabil koronária betegekben a rutin labor és hemorheológiai paraméterekre, az endotél funkcióra, valamint a szisztolés és diasztolés balkamra funkcióra.

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1. Ex vivo és in vivo miokardiális infarktus modellek

#### 4.1.1. Langendorff szívperfúziós vizsgálatok (iszkémia-reperfúzió)

Langendorff szívperfúziós kísérleteinkhez 300-350 g súlyú hím Wistar patkányok szívét használtuk. Vizsgálatainkat az aktuális állatetikai előírásoknak megfelelően végeztük. Az állatokat leölésük előtt ketamin (200 mg/kg, ip) adásával altattuk és nátrium heparinnal (100 IU/állat i.p.) antikoaguláltuk. A szíveket Langendorff módszere szerint perfundáltuk 70 Hgmm-es konstans nyomáson, 37°C-on. A perfúziós oldat módosított foszfátmentes Krebs-Henseleit puffer volt, mely az alábbiakat tartalmazta: 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glükóz és 0.6 mM oktánsav. A perfúziós oldat a kezelt állatok esetében L-2286 kódjelű PARP-gátlót is tartalmazott (10, illetve 20 µM koncentrációban) (1. ábra). A perfuzátumot oxigenáltuk 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> tartamú gázelegy átbuborékolatásával, majd az oldat pH-ját 7.4-re állítottuk be. Egy 10 perc hosszúságú kimosási (recirkuláció nélküli) periódust követően a szíveket vagy normoxiás körülmények között perfundáltuk, vagy 30 perces globális iszkémiának vetettük alá az aortán keresztüli folyadékáramlás megszüntetésével. Az iszkémiát 15 perc hosszúságú reperfúzió követte. A kísérlet végén a szíveket gyorsfagyasztottuk.



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

#### 4.1.2. In vivo miokardiális infarktus modell

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

## 4.2. Krónikus kísérletes szívelégtelenség modellek

#### 4.2.1. Posztinfarktusos szívelégtelenség modell

350 g súlyú Sprague-Dawley (CFY törzs) hím patkányokat (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) használtunk kísérleteink során. Két alkalommal sc. adott 120 mg/kg/nap dózisú izoproterenol (ISO, Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) injekcióval miokardiális infarktust (MI) váltottunk ki. A kontroll állatoknak sc. fiziológiás sóoldatot (1 ml/kg) adtunk. Az ISO oldatot steril desztillált víz felhasználásával közvetlenül az injekció beadása előtt készítettük el. A túlélő állatokat véletlenszerűen három csoportra osztottuk és 12 hetes kezelésben részesültek. A kezelést az utolsó ISO injekció beadása után több, mint 24 órával indítottuk, hogy az esetleges infarktus méret csökkentő hatást elkerüljük. Csoportok: 1. ISO+L (n=8): 5 mg/kg/nap adagban egy vízoldékony PARP-gátlót, L-2286-ot adtunk, 2. ISO+E (n=8): 10 mg/kg/nap enalapril maleátot (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) alkalmaztunk, 3. ISO (n=8): fiziológiás sóoldat adása. A 4. csoport (Kontroll, n=8) egy kortárs kontroll csoport volt. Az L-2286 dózisát korábbi munkáink alapján határoztuk meg. Ezen eredmények szerint az L-2286 kódjelű molekula szignifikáns kardioprotektív hatással rendelkezik oxidatív sejtkárosodásokkal szemben már 10  $\mu$ M koncentráció esetén is. Az L-2286 alkalmazott napi dózisával (5 mg/kg/nap) a becsült szérum koncentráció átlagos biohasznosulást feltételezve 10  $\mu$ M körüli patkányban.

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

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

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

#### 4.2.2. Hipertenzív szívelégtelenség modellek

##### A. A kardiovaszkuláris remodelling vizsgálata (korai következmények)

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

##### B. Manifeszt szívelégtelenség kialakulása hipertenzív kardiopátiás állatokban

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

#### 4.2.3. Toxikus szívelégtelenség modell

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

héttel a DOX kezelés megkezdése előtt kezdődött. Az állatkísérleteket mind a PTE Munkahelyi Állatvédelmi Bizottságtól (MÁB), mind pedig az ÁNTSZ-től megkapott hivatalos engedélyek birtokában végeztük.

#### 4.2.4. Szövetminták kivétele, tartósítása

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

### 4.3. Vérnyomásmérés

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

### 4.4. Kisállat echocardiographia

A kísérlet kezdetekor minden állat ultrahang vizsgálaton esett át az esetlegesen előforduló abnormalitások kizárása végett. Az egereket, illetve patkányokat 1.5% izoflurán és 98.5% oxigén keverékével felületesen altattuk és 2D ultrahang vizsgálatot végeztünk. Az állatok mellkasát szőrtelenítettük, fűtött padra helyeztük őket a normotermia fenntartása érdekében és VisualSonics VEVO 770-es (VisualSonics, Toronto, Kanada) nagyfelbontású ultrahangos berendezéssel határoztuk meg a szív struktúrális és funkcionális tulajdonságait. Egerek vizsgálatára 37.5 MHz-es, patkányok vizsgálatára 25 MHz-es vizsgálófejet használtunk. Az állatok félig bal oldalfekvő helyzetben voltak a vizsgálat során. A balkamrai dimenziók és a szisztolés balkamra funkció a parasternalis rövid és hossz tengelyi metszetekből lettek meghatározva a papilláris izom szintjében. A balkamrai (LV) frakcionális roströvidülést (FS), ejekciós frakciót (EF), balkamrai végdiasztolés átmérőt ( $LVID_d$ ) és volument (LVEDV), balkamrai végszisztolés átmérőt ( $LVID_s$ ) és volument (LVESV), valamint a septum és hátsó fal vastagságát (PW) mértük meg a vizsgálatok döntő részében. FS (%) számítása:  $100 \times [(LVID_d - LVID_s)/LVID_d]$ , EF (%) számítása:  $100 \times [(LVEDV - LVESV)/LVEDV]$ .

Egyes vizsgálatokban további mérések történtek és egyéb paraméterek is meghatározásra kerültek. Relatív falvastagság (RWT) számítása:  $RWT = (PW \text{ vastagság} + \text{septális falvastagság}) / LVID_d$ . A csúcsi 4 üregű nézetből a következő paramétereket határoztuk meg: Korai (E) és késői (A) diasztoles sebesség, valamint az isovolumetriás relaxációs idő (IVRT) és isovolumetriás kontrakciós idő (IVCT) a mitrális billentyűn keresztüli beáramlási görbék vizsgálatával kerültek meghatározásra. A szívizomzat teljesítmény indexének meghatározására az alábbi képletet alkalmaztuk (MPI, vagy Tei index):  $MPI = (IVRT + IVCT) / LVET$ . A szöveti Doppler mérések során a mitrális annulus szeptális részén határoztuk meg az E' és A' hullámokat és ennek segítségével határoztuk meg az E/E' hányadost is. Az echocardiographiás vizsgálatokat, illetve a vizsgálatok kiértékelését egy kutató végezte, aki „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira.

#### 4.5. Kisállat vaszkuláris ultrahang vizsgálatok

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

#### 4.6. Szív NMR vizsgálatok

Az NMR spektromokat egy Varian <sup>UNITY</sup>INOVA 400 WB berendezéssel vettük fel. A perfundált patkányszívekről <sup>31</sup>P spektrumokat (161.90 MHz) 37°C-on egy Z•SPEC® 20 mm „broadband” mintavételi fejjel nyertünk (Nalorac Co., Martinez, CA, USA) WALTZ-16 proton lecsatolást alkalmazva az adatgyűjtés ideje alatt ( $\gamma B_2 = 1,2$  kHz). A mágneses mező homogenitását a <sup>1</sup>H jel rendszeres ellenőrzése segítségével állítottuk be ( $w_{1/2} = 10-15$  Hz). A <sup>31</sup>P spektrumokat 3 perces időközönként vettük fel a következő paramétereket alkalmazva: 120 tranziens/FID, 1.25 s várakozási idő, 45 fokos kitérítési szögű impulzus, 10 kHz spektrális ablak, 0.25 s adatgyűjtési idő. Ezen kísérleti körülmények között az impulzusok közötti késés nagyobb a vizsgált metabolitok T1 értékének ötszörösénél, és a különféle molekulák relatív koncentrációi arányosak a jel alatti terület nagyságával. A foszfátot tartalmazó molekulák (kreatin foszfát, ATP, anorganikus foszfát) mennyiségét a szívperfúziók foszforspektrumaiban az adott molekulát reprezentáló görbe alatti terület nagyságából számítottuk ki. A perfúzió kezdetén az így kiszámított mennyiségeket 100%-nak vettük, és a perfúzió alatt a molekulák mennyiségét a perfúzió kezdetén mért értékekhez viszonyítva százalékosan adtuk meg (az anorganikus foszfátnál önkényes mértékegységet választottunk).



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

#### 4.7. Izometriás ér-miográfia

Standard protokollt alkalmazva vizsgáltuk csoportonként 4 állat carotis artériáját. Ketamin-xilazin anesztézia alatt a carotis artériákat eltávolítottuk és azonnal jéghideg (4°C), oxigenizált (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) fiziológiás Krebs oldatba helyeztük (mMol mértékegységben: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 11.1 glükóz és 1.6 CaCl<sub>2</sub>), majd 5 mm-es gyűrűkre vágtuk. Minden egyes gyűrűt két rozsdamentes acélrót közé helyeztünk (átmérő: 0.0394 mm) 5 ml mennyiségű szövetfürdőben az ér-miográfban (Small Vessel Myograph, DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia). Normalizációs eljárást végeztünk, hogy elérjük az 1.0 g (13.34 mN) bazális tónust, majd az artéria darabokat 60 percig hagytuk stabilizálódni a mérések előtt. Az adatok összegyűjtéséhez és megjelenítéséhez Myodaq 2.01 M610+ szoftvert használtunk. A szövetfürdőt folyamatosan 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> keverékével oxigenizáltuk és a hőmérsékletet 36.8 °C-on tartottuk (pH 7.4). A kumulatív válaszgörbéket acetil kolin (ACh) (10<sup>-9</sup> M – 10<sup>-5</sup> M) és nitroprusszid-Na (SNP) (10<sup>-9</sup> M – 10<sup>-5</sup> M) emelkedő dózisainak jelenlétében állítottuk fel. Az endotéliumot intaktnak tekintettük azon gyűrűknél, amelyek acetil-kolin jelenlétére 30%-nál jobban relaxálódtak. A kísérlet végén 60 mM KCl hozzáadásával győződünk meg a carotis artériák épségéről. Minden mérést különböző patkányokból vett artéria gyűrűkön végeztünk.

#### 4.8. Plazma BNP koncentráció meghatározása

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

#### 4.9. Szövettan

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

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

Az agyi minták vizsgálatához ketamin/xilazin anaesthesiát követően thoracotomia történt. Ennek során az aortagyököt kanuláltuk és a jobb artéria femorálist bemetszettük, hogy az effluens távozhasson. Az állatokat fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, hogy a vért eltávolítsuk az érrendszerből, majd pufferezt PFA-t használtunk. Decapitációt követően az agyat eltávolítottuk, majd 4°C-on egy éjszakán át posztfixáltuk PFA-ban. Paraffinba ágyazást követően koronális metszeteket készítettünk a bregma pozíciójához viszonyított (-4.3) – (-3.8) pozíciók között (Paxinos&Watson). A metszeteket PAS vagy krezil ibolya festéssel festettük meg. A hippocampalis piramis sejtek számolását a CA1-CA2 határ és a CA1-entorhinális kéreg átmenet között végeztük el krezil ibolya festett metszeteken. TUNEL tesztet (R&D Systems, 4810-30-K) a beágyazott agyi mintákon végeztük el a gyártó előírása szerint. A sejszámolást több vizsgáló végezte el, mindegyikük „vak” volt a vizsgálat egyéb adataira.

#### **4.10. Elektronmikroszkópia**

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

A szívizomzat vizsgálatához ketamin/xilazin anaesthesiát követő mellkas megnyitás során a szívretrográd módon perfundáltuk az aorta gyökön keresztül jéghideg PBS-el a vér alakos elemeinek eltávolítása céljából. Ezt követően módosított Kranovsky fixálóoldatot alkalmaztunk a perfúzió során (2% PFA, 2,5 % glutáraldehid, 0,1 M Na-kakodilát puffer, pH 7.4 kiegészítve 3 mM CaCl<sub>2</sub>-al). 1 mm vastag szeleteket metsztünk a bal kamra szabad falából. Foszfát pufferral történő mosást követően a mintákat 1% osmium tetroxid használatával fixáltuk (0.1 M PBS-ben 35 percig). A mintákat pufferral történt többszöri mosást követően felszálló alkoholsorban dehidráltuk. Dehidráltást követően a beágyazáshoz Durcupan gyantát (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Magyarország) használtunk, a metszeteket Leica ultramikrotómmal metsztük. 1 µm vastagságú félvékony és ultravékony metszeteket (70 nm) készítettünk, melyeket collodion-bevont (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA)

rézrácsra vettük fel. Uranil acetátos (1%) oldattal növeltük a kontrasztot. A mintákat Jeol 1200EX-II típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az interfibrilláris mitokondriumok mérését és a krisztadenzitás meghatározását ImageJ szoftver segítségével végeztük el.

#### **4.11. Az infarktus méretének meghatározása**

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

#### **4.12. Szérum nekroenzimek aktivitásának meghatározása**

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

#### **4.13. A mitokondriális enzimaktivitás meghatározása**

A NADH:citokróm c oxidoreduktáz aktivitását a korábbiakban leírt módszer szerint mértük. Az enzimaktivitást a citokróm c redukció ütemének meghatározásával mértük 550 nm-en. Az inkubációs médium jellemzői: 50 mmol/l nátrium-foszfát, 1 mmol/l Na-azid, 1.5 mM NADH és 50–75  $\mu\text{g}$  mitokondriális fehérje/ml, pH 7.5. A reakciót 40  $\mu\text{l}$  citokróm c hozzáadásával indítottuk el.

#### **4.14. A lipid peroxidáció és a fehérje oxidáció meghatározása**

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

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

#### 4.15. Immunhisztokémia és konfokális lézer-scanning fluoreszcens mikroszkópia

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

Az immunhisztokémiai festést nitrotirozin (NT) és 4-hidroxinonenal (4-HNE) elleni antitestekkel végeztük. Primer antitestnek anti-nitrotirozint (Millipor #06-284, nyúl poliklonális, 1:100), 4-HNE-t (Immunológia és Biotechnológia Intézet, Pécs, Magyarország 1:200), poli(ADP-ribóz)-polimert (PAR) (Abcam ab14459, egér monoklonális, 1:500), 8-oxoguanine/8-OxG (Abcam ab64548, 1:500) és gliális fibrilláris savas proteint (GFAP) (1 Degree Bio #Z0334, nyúl poliklonális, 1:500) használtunk. A primer immunreakciót biotinilált szekunder antitesttel tettük láthatóvá avidin-biotin-peroxidáz erősítő rendszer segítségével (PK-6200 Universal Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Kromogénnek 3,3'-diaminobenzidin-t (DAB) használtunk. Az immunreakciót fénymikroszkóp alatt követtük, és a felesleges DAB óvatos lemosásával állítottuk meg. Az agyi metszeteken Cresyl-viola és PAS (perjódsav-Schiff-reagens), míg a verőér metszeteken Masson's-trikróm festést alkalmaztunk.

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

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

#### 4.16. Western-blot

A szív, illetve nagyér mintákat 50 mM, jéghideg pH 8.0 Tris-pufferben homogenizáltuk (ami tartalmazott 1:100 proteáz és 1:100 foszfatáz gátló koktélt és 50 mM nátriumvanadátot (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország), a fehérjéket 2x mintapufferbe vettük fel, majd 7-12 %-os SDS-poliakrilamid gélen szétválasztottuk. A fehérjéket méret alapján elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, 2 óra blokkolás után (3%-os nem zsíros tejjel Tris-pufferelt sóoldatban) a membránokat 4 °C-on egy éjszakán át a következő antigéneket felismerő antitestekkel reagáltattuk: foszfo-specifikus AKT-1/fehérje kináz B-alfa<sup>Ser473</sup> (AF887, 1:1000), anti-aktin (A2228, 1:10000), foszfo-specifikus ERK1<sup>Thr202/Tyr204</sup>/ERK2<sup>Thr185/Tyr187</sup> (AF1018, 1:1000), foszforilált p38 MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> (AF869, 1:1000), foszfo-specifikus JNK<sup>Thr183/Tyr185</sup> (AF1205, 1:1000), anti-

MKP-1 (sc-370), foszfo-specifikus protein kináz C (PKC) ( $\alpha$ )  $\beta$ II Ser<sup>660</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C  $\alpha$ / $\beta$ II (PKC  $\alpha$ / $\beta$ II) Thr<sup>638/641</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ) Thr<sup>505</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ) Thr<sup>643</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz  $\xi$ / $\lambda$  (PKC  $\xi$ / $\lambda$ ) Thr<sup>410/403</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C  $\epsilon$  (PKC  $\epsilon$ ) Ser<sup>729</sup> (1:10000), és nemfoszforilált PKC  $\epsilon$  (1:15000), anti-poli(ADP-ribóz) (anti-PAR) (Abcam ab14459, 1:5000), foszfo-Foxo1A<sup>Ser256</sup> (forkhead transzkripció faktor, FKHR<sup>Ser256</sup>, 1:1000), Hősokk fehérje (Hsp) 72, (1:20,000), Hsp90 (1:1000), COX-2 (1:1000) és iNOS (1:1000). Minden antitestet az R&D Systems, Biomedica Kft-től (Magyarország) vásároltunk, kivéve az anti-aktint (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország), az anti-MKP-1-et, Hsp90-et (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA.), a Hsp72-t (Calbiochem, Merck Kft, Budapest, Magyarország), a DRP1-et, OPA1-et (mindkettő Cell Signaling Technology, 1:1000) és az anti-PAR-t (Alexis Biotechnology, London, Egyesült Királyság). A membránokat 6x5 percig mostuk Tris-puffer oldatban (pH 7.5), ami tartalmazott 0.1% Tween 20 detergenst (TBST), mielőtt hozzáadtuk a kecske-anti-nyúl torma peroxidáz konjugált szekunder antitestet (1:30000 hígítás, Bio-Rad, Budapest, Magyarország). Az antigén-antitest komplexeket kemilumineszcenciával tettük láthatóvá. Az eredményeket NIH ImageJ szoftver használatával számszerűsítettük.

#### 4.17. Sejtviabilitási vizsgálatok

H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteket (European Collection of Cell Cultures - ECACC) 10 % borjú szérumot (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartalmazó DMEM-ben tartottuk. A médium emellett 4 mM glutamint, 100 IU/ml penicillint és 100 ug/ml streptomycint is tartalmazott. A doxorubicin (DOX) és a PARP-gátló L-2286 sejtviabilitásra gyakorolt hatását egy diazo festék (3-[4,5-dimetilthiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) segítségével, illetve a laktát dehidrogenáz (LDH) kiáramlásával határoztuk meg. Az MTT teszt a mitokondriális légzést – sejt életképességének egy jellemzőjét – határozza meg. Az LDH kiáramlása pedig a sejtmembrán integritását jelzi. H9c2 sejteket 96-lyukú plate-en tartottuk párasított 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> légkörben 37°C-on. A sejteket 4 órán keresztül 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezeltük 1-10  $\mu$ M L-2286 jelenlétében és MTT teszttel jellemeztük a sejtek életképességét.

Egy másik vizsgálatban a H9c2 sejteket DOX különböző koncentrációival (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu$ M) kezeltük 24 órán keresztül, majd az L-2286 előkezelés hatását (30 perc, 1-10  $\mu$ M) határoztuk meg az MTT teszt segítségével 1  $\mu$ M DOX jelenlétében. A médium eltávolítása után MTT-t adtunk (0.1 mg/ml) a sejtekhez. 1 órás inkubációt követően a reakciót dimetil szulfoxid tartalmú oldattal állítottuk le. A kék kristályokat egy éjszakán keresztül oldottuk fel, az abszorbanciát 570-nm hullámhosszon spektrofotométerrel mértük meg. A sejtviabilitást a kontrollhoz viszonyított abszorbanciával határoztuk meg.

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

spektrofotométerrel mértük meg. Az LDH release-t a kontrollhoz viszonyított abszorbanciával határoztuk meg.

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

### **4.18.1. Betegek és módszerek**

Vizsgálatunk során 40 ismert posztinfarktusos beteget randomizáltunk két csoportba (42-80 év, átlagéletkor  $66.3 \pm 8.9$  év, 26 férfi, 14 nő). Mindegyik beteg anamnézisében lezajlott miokardiális infarktus (legalább 6 hónappal a randomizálás előtt), valamint coronarographiával igazolt, revaszkularizációra nem alkalmas háromérbetegség szerepelt. A bevételi kritériumok fontos eleme volt, hogy a betegek a nemzetközi irányelveknek megfelelő szekunder prevenciós gyógyszeres kezelésben részesüljenek. A vizsgálat során 20 beteg napi 10 mg rezveratrol (Admarc Med Diagnostics & Nutraceuticals, Fót, Magyarország), 20 beteg pedig placebo kezelésben részesült 3 hónapon keresztül. A betegek gyógyszeres kezelése a vizsgálati periódus alatt nem változott. A vizsgálat előtt és a harmadik hónap végén fizikális vizsgálat, vérnyomásmérés, vérvétel, EKG, echocardiographia és flow-mediálta vazodilatáció mérése történt.

### **4.18.2. Laboratóriumi paraméterek**

A kubitális punkcióval nyert vérmintákból meghatároztuk a vérképet (fehérvérsejtszám, hemoglobin), a C-reaktív protein, a TNF- $\alpha$  és a vércukor szintjét, valamint a lipidprofil (összkoleszterin, triglicerid, HDL és LDL-koleszterin szint).

### **4.18.3. Hemoreológiai paraméterek**

A vizsgálatainkhoz szükséges vérmintákat könyökvénából vettük, a hemoreológiai paraméterek közül a hematokritot, plazma fibrinogén-koncentrációt, plazma és teljes vér viszkozitást, vörösvértest (RBC) deformabilitást, aggregációt és a vérlemezke aggregációt tanulmányoztuk. A hematokritot mikrohematokrit centrifuga (Hemofuge, Heraeus Instr., Németország), a plazma fibrinogén koncentrációt a Clauss módszer segítségével határoztuk meg. A plazma- és teljesvér-viszkozitást Hevimet 40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Magyarország) mértük. A vérviszkozitás értékeit 90 1/s nyírási sebességnél adtuk meg. A vörösvértest-aggregáció mérése Myrenne MA-1 aggregométerrel történt (Myrenne GmbH, Németország) történt Schmid-Schönbein fénytranszmissziós módszerét alkalmazva. A módszer a vörösvértest-szuszpenzió fényáteresztő képességének változásán alapul, az aggregáció mértékét az aggregációs indexekkel jellemezzük (AI). A vörösvérsejt filterabilitást, amely a sejt deformabilitására utaló paraméter, Carat FT-1 filtrométerben mértük (Carat Kft, Magyarország) a St George's technikát alkalmazva. A készülékben a vörösvértest-szuszpenzió 5  $\mu\text{m}$

pórusátmérőjű Nucleopore membránon áramlik keresztül. Kísérleteinkben az átáramlást biztosító filtrációs nyomást 4 vízcm nagyságúra állítottuk be. Trombocita aggregometriás méréseinket Carat TX-4 típusú trombocita aggregométerrel végeztük (Carat Kft, Magyarország).

#### **4.18.4. Flow-mediálta vazodilatáció**

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

#### **4.18.5. Echocardiographia**

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

### **4.19. Statisztikai elemzés**

A csoportok adatainak normál eloszlását Shapiro-Wilk, a variancia homogenitást Levenetest segítségével ellenőriztük. Csoportok közötti eltéréseket egy-utas ANOVA használatával vizsgáltuk, melyet Bonferroni post-hoc összehasonlítás követett. Önkontrollos vizsgálatok során páros mintás t-próbát használtunk. Kiindulási állapotban a törzsek adatai független mintás t-próbával lettek összevetve. Minden más összehasonlítás törzs x kezelés két-utas ANOVA segítségével történt. A faktorok közti interakció esetén a kezelés által okozott különbség szignifikanciáját független mintás t-próbával ellenőriztük vissza adott kontrollhoz viszonyítva. A mitokondriumok vizsgálata során egy-utas ANOVA-t használtunk Welch korrekcióval, melyet Dunnet post hoc teszt követett, hogy a statisztikai különbségeket tisztázzuk az SHR-C csoporttal való összehasonlítás során. Mivel a mitokondriumok területi és hossz tengelyi mérései során nyert adatok nem mutattak normál eloszlást, ezért ezen eredményeket Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk páros összehasonlítás során. A rezveratrollal végzett humán klinikai vizsgálat esetében a kezelés következtében létrejövő változásokat páros mintás t-próbával határoztuk meg. A csoportok közötti különbséget pedig Pearson-féle khi-négyzet próbával jellemtük. Az analízisek az IBM SPSS programnak az aktuálisan elérhető legfrissebb verziójával történtek. Minden adat átlag  $\pm$  S.E.M. ábrázolva. Az összehasonlításokat  $p < 0.05$  határ alatt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A PARP-1 enzim gátló L-2286 molekula sejt kultúrákban, izolált szervperfúziós és in vivo szívinfarktus modellekben egyaránt hatékonyan mérsékelte az oxidatív sejt károsodás (doxorubicin, illetve IR) fokát és csökkentette a nekrozis mértékét már alacsony, 1-10  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban is.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### 6.1. A doktori műben tárgyalt munkából született közlemények

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

Impakt faktor: 4.098

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

Impakt faktor: 4.859

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

Impakt faktor: 2.29

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

Impakt faktor: 5.801

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

Impakt faktor: 2.287

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

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

Impakt faktor: 3.234

8. MAGYAR K, DERES L, EROS K, BRUSZT K, SERESS L, HAMAR J, HIDEG K, BALOGH A, GALLYAS F JR, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. A quinazoline-derivative compound with PARP inhibitory effect suppresses hypertension-induced

vascular alterations in spontaneously hypertensive rats. BBA-Molecular Basis of Disease. 2014; 1842(7): 935-944.

Impakt faktor: 4.882

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

Impakt faktor: 6.189

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

Impakt faktor: 2.806

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

Impakt faktor: 4.593

## **6.2. A jelölt további közleményei, melyek a doktori mű eredményeihez, témájához szervesen nem csatlakoznak**

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

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

Impakt faktor: 0.91

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

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

Impakt faktor: 0.395

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

Impakt faktor: 0.297

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

Impakt faktor: 0.989

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

Impakt faktor: 5.297

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

Impakt faktor: 4.552

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

Impakt faktor: 1.553

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

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

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

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

Impakt faktor: 1.58

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

Impakt faktor: 1.602

15. MÁRTON ZS, HALMOSI R, HORVÁTH B, ALEXY T, KÉSMÁRKY G, VÉKÁSI J, BATTYÁNY I, HIDEK K, TÓTH K. Kísérleti stádiumban lévő és a klinikai gyakorlatban használt kardiovaszkuláris gyógyszerek antioxidáns hatásának vizsgálata.

Card Hung. 2002; 32: 63-69.

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

Impakt faktor: 5.063

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

Impakt faktor: 2.993

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

Impakt faktor: 1.313

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

Impakt faktor: 1.765

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

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

Impakt faktor: 1.461

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

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

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

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

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

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

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

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

Impakt faktor: 0.291

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

Impakt faktor: 2.806

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

Impakt faktor: 1.815

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

Impakt faktor: 5.099

Eredeti közlemények összesített impakt faktora: 80.82.

### 6.3. A jelölt közleményeinek tudománymetriai adatai

Halmosi Róbert tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása

MTA V. Orvostudományi Osztály (2018.07.03.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	43	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	28	549	716
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	12	1	3
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	2	3	3
rövid közlemény	---	1	3	3
<b>II. Könyv</b>	1	---	---	---
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv</b>	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
<b>b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	1	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	3	---	1	1
<b>Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)</b>		1	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)</b>	---	47	557	726
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	48	---	557	726
<b>V. További tudományos művek</b>	4	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	4	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
<b>VI. Idézett absztraktok<sup>5</sup></b>	0	---	0	0



<b>Idézettség száma<sup>1</sup></b>	---	---	557	726
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	15	---	---	---
<b>g index<sup>6</sup></b>	28	---	---	---

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

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

Köszönetet mondok munkatársaimnak, korábbi és jelenlegi PhD hallgatóimnak, akik mellettem álltak és állnak a tudományos, gyógyító és oktató munkában, akik nélkül a kutatómunkám töredéke sem tudott volna megvalósulni: Dr. Habon Tamásnak, Dr. Czopf Lászlónak, Dr. Szabados Eszternek, Dr. Márton Zsoltnak, Dr. Pálfi Anitának, Dr. Bartha Évának, Dr. Magyar Klárának, Dr. Deres Lászlónak, Dr. Erős Krisztiánnak, Dr. Riba Ádámnak, Dr. Gál Rolandnak, Rónaky Anikónak és Völgyiné Dózsa Tímeának.

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