

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2330.

BÁRÁNY TAMÁS

A vérkeringési rendszer normális és kóros működésének mechanizmusai
című program

Programvezető: Dr. Benyó Zoltán, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Horváth Eszter, egyetemi adjunktus

A parthanatos szerepe az endotél diszfunkció és a szívelégtelenség patomechanizmusában

Doktori értekezés

Dr. Bárány Tamás

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Horváth Eszter Mária, Ph.D., egyetemi adjunktus
Konzulens: Dr. Zima Endre, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Viktor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Verzár Zsófia, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Pénzes István, MTA doktora, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Bálint Hajnalka, Ph.D., főorvos

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	8
2.1 OXIDATÍV-NITRATÍV STRESSZ	8
2.2 A POLI (ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ ENZIMCSALÁD	10
2.2.1 <i>A poli (ADP-ribóz) polimeráz működése</i>	<i>10</i>
2.2.2 <i>Poli (ADP-ribóz) polimeráz a „Janus arcú” enzim.....</i>	<i>12</i>
2.3 PARTHANATOS ÉS AZ APOPTÓZIS INDUKÁLÓ FAKTOR	13
2.4 AZ ENDOTÉL DISZFUNKCIÓ ÉS A KARDIOVASZKULÁRIS KOCKÁZAT	15
2.4.1 <i>Endotél diszfunkció</i>	<i>15</i>
2.4.2 <i>Endotél diszfunkció diabétesz mellituszban</i>	<i>16</i>
2.4.3 <i>Endotél diszfunkció szívelégtelenségben.....</i>	<i>19</i>
2.4.4 <i>Szívelégtelenség terminológiája, diagnosztikája.....</i>	<i>20</i>
2.5 OXIDATÍV, NITRATÍV STRESSZ ÉS PARTHANATOS SZEREPE A KARDIOVASZKULÁRIS PATOFIZIOLÓGIÁBAN	22
2.5.1 <i>Miokardiális iszkémia-reperfúzió.....</i>	<i>22</i>
2.5.2 <i>Ingadozó vércukorszint okozta endotél diszfunkció szerepe</i>	<i>25</i>
2.5.3 <i>Krónikus szívelégtelenség</i>	<i>29</i>
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	35
3.1 ENDOTÉL KÁROSODÁS ÉS PARTHANATOS FELMÉRÉSE INGADOZÓ VÉRCUKORSZINTBEN.....	35
3.1.1 <i>Vércukor ingadozás és a vaszkuláris diszfunkció</i>	<i>35</i>
3.1.2 <i>Vércukor ingadozás és az oxidatív-nitratív stressz</i>	<i>35</i>
3.1.3 <i>Vércukor ingadozás és a PARP aktiváció</i>	<i>36</i>
3.2 SZÍVELÉGTELSÉGET JELLEMZŐ PARAMÉTEREK ÉS A PARTHANATOS MARKEREI 36	36
3.2.1 <i>Parthanatos a szívelégtelenségben.....</i>	<i>36</i>
3.2.2 <i>Szívelégtelenség és a parthanatos közötti korreláció.....</i>	<i>36</i>
4. MÓDSZEREK.....	37
4.1 VIZSGÁLATI PROTOKOLL	37

4.1.1	<i>Diabéteszes állatmodell</i>	37
4.1.2	<i>Krónikus szívelgtelen betegek vizsgálata</i>	39
4.2	VASZKULÁRIS FUNKCIÓ MÉRÉSE INGADOZÓ VÉRCUKORSZINTBEN.....	40
4.3	PARTHANATOS JELEI SZÖVETEKBEN	40
4.3.1	<i>Immunhisztokémia</i>	41
4.3.2	<i>Western blot analízis</i>	42
4.4	PARTHANATOS MARKEREI VÉRALKOTÓKBAN	42
4.4.1	<i>Biokémia</i>	42
4.4.2	<i>Immunológia</i>	43
4.4.2.1	<i>Immunhisztokémia</i>	43
4.4.2.2	<i>Áramlásos citometria</i>	44
4.5	STATISZTIKA.....	44
5.	EREDMÉNYEK	46
5.1	ENDOTÉL KÁROSODÁS MÉRTÉKÉNEK FELMÉRÉSE INGADOZÓ VÉRCUKORSZINTBEN.....	46
5.1.1	<i>Vércukorszint ingadozások experimentális állatmodellben</i>	46
5.1.2	<i>Endotél függő relaxáció és az ingadozó vércukorszint közötti összefüggés.</i> 48	
5.1.3	<i>Oxidatív-nitratív stressz jelei csontvelőben és endotélben</i>	50
5.1.4	<i>PARP aktiváció szövetekben és keringő leukocitákban</i>	51
5.2	SZÍVELÉGTLENSÉGET JELLEMZŐ PARAMÉTEREK ÉS A PAR THANATOS KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ	56
5.2.1	<i>Klinikai paraméterek a szívelgtelenség kontroll csoportos vizsgálatában.</i> 56	
5.2.2	<i>Parthanatos markerei a véralkotókban</i>	58
5.2.3	<i>Parthanatos és a szívelgtelenség paramétereinek közötti korreláció</i>	61
5.2.4	<i>Parthanatos vizsgálata anamnesztikus és klinikai markerek függvényében</i> 65	
5.2.5	<i>Oxidatív stressz meghatározói szívelgtelenségben</i>	65
6.	MEGBESZÉLÉS	67
6.1	VASZKULÁRIS DISZFUNKCIÓ INGADOZÓ VÉRCUKORSZINTBEN.....	67
6.2	OXIDATÍV-NITRATÍV STRESSZ ÉS PARP AKTIVÁCIÓ AZ INGADOZÓ VÉRCUKORSZINT FÜGGVÉNYÉBEN.....	72
6.3	PARTHANATOS MARKEREI SZÍVELÉGTLENSÉGBEN	75

6.4	OXIDATÍV STRESSZ MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐI A SZÍVELÉGTELENSÉG KLINIKUMÁBAN	78
6.5	PARTHANATOS MARKEREI, MINT DIAGNOSZTIKUS ÉS TERÁPIÁS CÉLPONTOK	80
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	82
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	83
	SUMMARY.....	84
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	85
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	107
10.1	DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	107
10.2	DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK	107
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	109

1. Rövidítések jegyzéke

ACE	Angiotenzin konvertáló enzim
ADP	Adenozin-difoszfát
AGE	Késői glikációs termékek
AIF	Apoptózis indukáló faktor
anti-KLH	Keyhole limpet hemocyanin antitest
AP-2	Activating protein 2
ARH3	PAR hidroláz
ARTD	Diftéria toxinra hasonlító ADP-ribóz transzferáz
ATP	Adenozin-5'-trifoszfát
AUC	Görbe alatti terület
BER	Bázis kivágó javítás
BH4	Tetrahydrobiopterin
B-MYB	Myb-related protein B
BNP	Agyi nátriuretikus peptid
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
cGMP	Ciklikus guanozin-monofoszfát
CHF	Krónikus szívelégtelenség
CRE	μmol „ <i>copper reducing equivalent</i> ”
CRP	C-reaktív protein
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DM	Diabétesz mellitusz
EF	Ejekciós frakció
ESC	Európai Kardiológiai Társaság
eNOS	Endoteliális nitrogén monoxid szintáz
E-szelektin	Endoteliális szelektin
Fe ²⁺	Ferro vas
Fe ³⁺	Ferri vas
GAPDH	Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz

H ₂ O ₂	Hidrogénperoxid
HbA1c	Hemoglobin A1c
HFmrEF	Közepes ejekciós frakciójú szívelégtelenség
HFpEF	Megtartott ejekciós frakciójú szívelégtelenség
HFrEF	Csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség
HIETE	Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ICAM	Intercelluláris adhéziós molekula
IFG	Emelkedett éhomi vércukor
IGT	Csökkent glukóz tolerancia
IL	Interleukin
IMT	Intima-media vastagság
iNOS	Indukálható nitrogén monoxid szintáz
IP	Prosztaciklin receptor
ISZB	Iszkémiás szívbetegség
LVEDD	Bal kamra végdiasztolés átmérő
LVESD	Bal kamra végszisztolés átmérő
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NCX	Na/Ca kicserélő transzpoter
NER	Nukleotid kivágó javítás
NFR	Nuclear Fast Red háttérfestés
NF-κβ	Nukleáris faktor-kappaβ
nNOS	Neuronális nitrogén monoxid szintáz
NO	Nitrogén monoxid
NO ⁻	Nitroxil anion
NO ₂	Nitrogén-dioxid
NOS	Nitrogén monoxid szintáz
NT	Nitrotirozin
NT-proBNP	N-terminalis prohormon agyi natriuretikus peptid
NYHA	New York Heart Association funkcionális osztályozás
O ₂ ⁻	Szuperoxid anion

Oct-1	Octamer 1 transzkripció faktor
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OSI	Oxidatív stressz index
PAR	Poli(ADP-ribóz)
PARG	Poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	Poli(ADP-ribóz) polimeráz
PCI	Perkután koronária intervenció
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostaciklin
PKC	Protein kináz C
PKG	Protein kináz G
PRX	Plazma peroxidáció
PVDF	Polivinildén fluorid
ROS	Reaktív oxigén gyökök
SD	Standard deviáció
SDS-PAGE	Nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis
SERCA	Szarkoplazmás retikulum kalcium ATP-áz
sGC	Szolubilis guanilat cikláz
SOD	Szuperoxid diszmutáz
SR	Szarkoplazmás reticulum
sST2	szolubilis „ <i>Suppression of Tumorigenicity</i> ” 2
STEMI	ST elevációs miokardiális infarktus
STZ	Streptozotocin
T2DM	2. típusú diabétesz mellitusz
TAC	Teljes antioxidáns kapacitás
TGFβ	Transzformáló növekedési faktor béta fehérje
TNF	Tumor nekrosis faktor
TTE	Transztorakális echokardiográfia
TXA ₂	Tromboxán A ₂
VC	Vércukor
VCAM	Vaszkuláris sejt adhézións molekula
YY1	Yin Yang 1 transzkripció faktor

Nemzetközi vizsgálatok rövidítései

ACCORD	<i>Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes</i>
ADVANCE	<i>Action in Diabetes and Vascular disease: PreterAx and Diamicron MR Controlled Evaluation</i>
DCCT	<i>Diabetes Complications and Control Trial</i>
DEVOTE	<i>Trial Comparing Cardiovascular Safety of Insulin Degludec Versus Insulin Glargine in Subjects With Type 2 Diabetes at High Risk of Cardiovascular Events</i>
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
EXACT-HF	<i>Xanthine Oxidase Inhibition for Hyperuricemic Heart Failure Patients</i>
HEART2D	<i>Hyperglycemia and Its Effect After Acute Myocardial Infarction on Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus</i>
STENO-2	<i>Intensified Multifactorial Intervention in Patients With Type 2 Diabetes and Microalbuminuria</i>
TIMI-37	<i>Thrombolysis in Myocardial Infarction csoport 37-s vizsgálata</i>
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VADT	<i>Veterans Affairs Diabetes Trial</i>

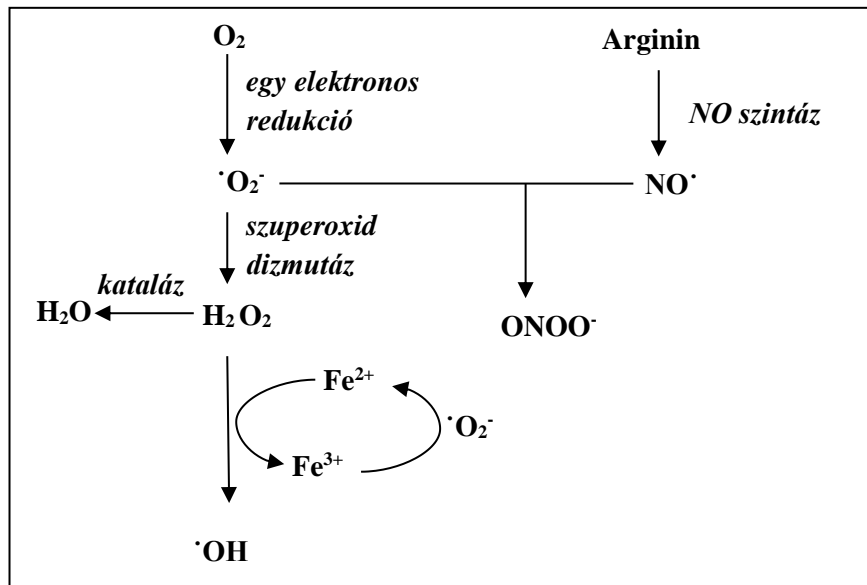
2. Bevezetés

2.1 Oxidatív-nitratív stressz

Az oxidatív-nitratív stressz a szabadgyökök és az antioxidáns kapacitás közötti egyensúly megbomlását jelenti. Szabadgyököknek azokat a vegyületeket nevezzük, amelyek a párosítatlan spinű elektron miatt kifejezett reaktivitással jellemezhetőek. A sejten belüli szabadgyökök enzimatis és nem enzimatis úton is keletkezhetnek. Az enzimatis folyamatok közé tartoznak a mitokondriális légzési lánc elemei, a NADPH-oxidáz és a xantin-oxidáz által katalizált reakciók, amelyek egy elektron transzfert is képesek katalizálni (1). A nem enzimatis folyamatokban a vas (Fe)-komplexek játszanak kiemelkedő szerepet, ugyanis képesek reagálni (donorként vagy akceptorként) szabad elektronokkal, amelyek hatására szabadgyökök keletkeznek. A keletkezett szabadgyökök más szabadgyökökkel és nem gyökökkel reagálhatnak, reakció sorozatokat indíthatnak el, amelyek során további szabadgyökök vagy reaktív instabil intermedierek (peroxid, peroxinitrit) képződhetnek. A biológiai rendszerekben főleg az oxigénből származó szabadgyökök játszanak jelentős szerepet és esetükben beszélhetünk oxidatív stresszről (2). A reaktív oxigén gyökök közé tartozik a szuperoxid-anion (O_2^-), ami a molekuláris O_2 -ből képződik és NO-al reagálva a rendkívül reaktív peroxinitritet tudja képezni. A szuperoxid anion eliminálásában a szuperoxid diszmutáz (SOD) vesz részt, amely során hidrogénperoxid (H_2O_2) képződik. Ez szintén intermediér vegyületnek tekinthető, mert egyrészt a kataláz és peroxidáz enzim működés során eliminálódhat, másrészt reakcióba léphet szabad ferro vas (Fe^{2+}) vegyülettel, ami ferri vassá (Fe^{3+}) oxidálódva hidroxil anion szabadgyök kialakulásához járulhat hozzá (1. ábra) (3).

Emellett az utóbbi időben kiemelkedő figyelmet kaptak a nitrogén származékok is. Ezen csoport képviselői közé tartozik a nitroxil anion (NO^-) és a korábban említett peroxinitrit ($ONOO^-$). A reaktív nitrogén származékok esetében az irodalom számos alkalommal együtt használja a nitrozatív és a nitratív stressz fogalmát, bár biokémiai szempontból két különböző reakcióról beszélünk. A nitráció során a molekulához nitrogén-dioxid (NO_2) kapcsolódik. Ez számos patofiziológiai folyamatban kimutatható, amikor a NO reakcióba lép a szuperoxiddal és peroxinitrit képződik, ami különböző fehérjék és zsírsavak tirozin nitrációját okozza. A nitrotirozin detektálása során a nitratív stressz mértékét lehet megbecsülni. A nitroziláció során a NO a fehérjék meghatározott

aminosav oldalláncaihoz kötődik. A -NO csoport cisztein aminosavhoz kötődését nitroziláció vagy S-nitroziláció néven szokták említeni. Erre a kémiai reakcióra utal a nitrozatív stressz megnevezés (4).



1. ábra: A szuperoxid-anion (O_2^-) a molekuláris O_2 -ből képződik és NO-al reagálva peroxinitritet képez. A szuperoxid anion eliminálásában a szuperoxid dizmutáz vesz részt, amely során hidrogénperoxid (H_2O_2) képződik, ami egyrészt a kataláz enzim működése során eliminálódhat, másrészt reakcióba léphet szabad ferro vas (Fe^{2+}) vegyülettel, ami ferri vassá (Fe^{3+}) oxidálódva hidroxil anion szabadgyökök kialakulásához járulhat hozzá (3).

Fiziológias körülmények között a keletkezett szabadgyökök eliminálásáért különböző antioxidáns rendszerek felelősek. A semlegesítés történhet enzimatis és nem enzimatis úton is. Olyan enzimek vesznek részt a folyamatokban, mint a korábban említett szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz, peroxidáz, glutation peroxidáz és tioredoxin. A nem enzimatis úton történő szabadgyök eliminációban az antioxidáns hatású molekulák játszanak jelentős szerepet, például a C-vitamin és az E-vitamin. A szabadgyökök túltermelődése esetén ezek az antioxidáns kapacitások telítődnek, az alacsony molekula súlyú antioxidánsok (endogén: glutation, urát, bilirubin; exogén: tokoferol, likopin, karotin) kifognak, sőt a keletkezett intermedier vegyületek további antioxidáns enzimek aktivitását csökkenthetik, például a peroxinitrit inaktíválja a mitokondriális dizmutázt (5). Az oxidatív-nitratív (nitrozatív) stressz kialakulásakor a

szabadgyökök további strukturális változásokat idéznek elő (pl.: lipidperoxidáció, DNS károsodás, fehérjék strukturális változása), amelyek különböző kórállapotok kialakulásában játszanak szerepet (3, 6).

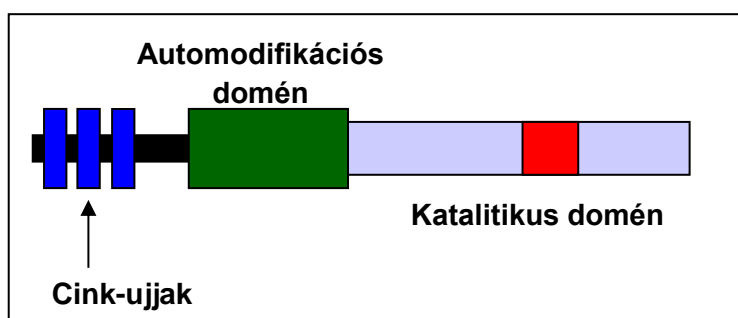
2.2 A poli (ADP-ribóz) polimeráz enzimes család

A poli-ADP-riboziláció a nukleáris fehérjék poszttranszlációs modifikációját jelenti, aminek a kutatása már évtizedes múltra tekint vissza. Kezdetben a felelős enzimet a működése alapján nevezték el, miszerint a poli (ADP-ribóz) polimeráz, rövidítve PARP nevet kapta. Az enzim család legelőször leírásra került tagja a PARP-1, és a legtöbb információval is erről az izoformáról rendelkezünk. Működése során a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, az utóbbiból ADP-ribóz polimereket szintetizál és azokat nukleáris fehérjékhez köti (poli-ADP-riboziláció). Az enzimes család a kutatások során folyamatosan bővült és jelenleg már 17 tagját ismerjük. A különböző enzimfehérjék egyre részletesebb megismerése során olyan új információkat ismertünk meg, ami miatt a korábbi, működésre utaló PARP elnevezés már nem volt megfelelő. Ezért jelenleg a nemzetközi irodalomban a strukturális hasonlóságra utaló új elnevezést használnak, miszerint diftéria toxinra hasonlító ADP-ribóz transzferázok (*ADP-Ribosyl-Transferases Diphtheria Toxin - Like - ARTD*). Szerkezeti hasonlóságukon túl az enzimes család tagjai különböző enzimaktivitással rendelkeznek: ARTD 1-6 tagok polimerázok, viszont az ARTD 7-17 enzimfehérjék polimereket nem szintetizálnak és mono-ADP transzferáz aktivitást mutatnak (7, 8). Ennek ellenére a PARP-1 elnevezés a nemzetközi irodalomban továbbra is használatos maradt az enzimes család legjelentősebb tagját illetően. A disszertáció további részeiben a PARP megnevezés a PARP-1, avagy az ARTD-1 enzimre utal.

2.2.1 A poli (ADP-ribóz) polimeráz működése

A 116-kDa molekula súlyú, 1014 aminosavból felépülő PARP három fő doménból áll, aminek N-terminálisán DNS kötő cink ujjak találhatóak, míg a katalitikus domén a C-terminálison helyezkedik el. A kettő között egy önszabályozó domén található, ami az auto-poli-ADP-riboziláció akceptor helyeként szolgál (2. ábra) (9). A PARP enzim szerkezete nagymértékű hasonlóságot mutat a különböző fajok esetében,

továbbá a katalitikus domén egy 50 aminosavból álló blokkot tartalmaz, ami a gerincesek között 100%-s azonosságot mutat és a PARP „kézjegyének” tekintik. Ennek további jelentősége, hogy ez a szekvencia választja el a katalitikus domén donor és akceptor részét. Az akceptor oldalt a szintetizált poli-ADP-ribóz lánc ADP része foglalja el, miközben a donor részéhez a NAD^+ kerül (10, 11).



2. ábra: PARP szerkezetében 3 domén található. A cink ujjak segítik a DNS kötődést, a C terminálison található a katalitikus rész és a kettő között pedig az auto-poli-ADP-ribosziláció helye azonosítható. Az enzim 1014 aminosavból áll, amiből az 524-1014 közötti szekvencia a katalitikus domént jelenti (11).

A legtöbb vizsgálat a PARP DNS javító (*repair*) szerepét támasztotta alá. A DNS kötő régióinak köszönhetően képes a sérült egyszálú DNS szegmensekhez kötődni. Károsodott nukleotid esetén a bázis kivágó javításokban (*Base Excision Repair* – BER), több nukleotidot érintő károsodás esetén nukleotid kivágó (*Nucleotid Excision Repair* – NER) mechanizmusokban vesz részt (12, 13). A sérült DNS szakasz kötődése után a PARP enzimek homodimer formákat alkotnak és ezt követően a katalitikus domén a sejtmagban megtalálható NAD^+ -ot bontja, ADP-ribóz polimereket szintetizál és azokat nukleáris fehérjékhez köti. Ezek a polimerek különböző hosszúságú, elágazódó láncok, amelyek állhatnak néhány vagy akár 200 darab ADP-ribóz egységből is (9).

A poli-ADP ribóz polimerek legjelentősebb akceptorai közé a hisztonok tartoznak. A ribosziláció negatív töltést kölcsönöz, ezáltal fokozott elektrosztatikus taszítást alakít ki a DNS és a hisztonok között. Így nagymértékben képes befolyásolni a kromatin átrendeződését, a DNS szerkezete fellazul, és a javító enzimek számára hozzáférhetővé válik a sérült szakasz (14).

A poli-ADP-riboziláció másik legfontosabb akceptora maga a PARP. Az auto-poli-ADP-riboziláció hatására a PARP leválik a károsodott DNS-ről és az enzim további működése gátlódik (15).

Az enzim további célfehérjéi egyéb, különböző nukleáris proteinek is lehetnek: transzkripciós reguláló faktorok, szignál transzdukciós molekulák és DNS-dependens kinázok (pl. NF- κ B, AP-2, Oct-1, YY1, B-MYB, stb.) (16).

A PARP szabályozását számos tényező befolyásolja. Az ADP polimerek fehérjékről történő leválasztásában és lebontásában a poli (ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és PAR hidroláz (ARH3) enzimek kapnak szerepet (11). Az ADP polimerek mennyiségének csökkentésével a PARP automodifikációját tudják befolyásolni (17). Emellett a PARP auto-poli-ADP-ribozilációját gátolja az ATP is, ezért ATP-vel jól ellátott sejtekben az autoreguláció valószínűleg nem működik (18). A fent ismertetett auto-poli-ADP-riboziláción kívül kiemelendő egyrészt a nikotinamidnak, a NAD⁺ kisebbik hasítási termékének az enzim aktivitását gátló hatása, ami negatív visszacsatolással védhet a PARP túlzott aktivációja ellen (19). Továbbá a PARP protein kináz C-vel (PKC) történő foszforilálása is enzimgátlást eredményez (20). Másfelől a PARP fehérje mennyisége is változik bizonyos állapotokban, ami transzkripciós/ poszttranszkripciós szabályozásra utal (21). Ezenkívül érdemes megemlíteni az endogén faktorokat is, melyek szintén képesek befolyásolni a PARP enzim működését (hipoxantin, inozin, adenzin, ösztrogén, D-vitamin) (22-24).

2.2.2 Poli (ADP-ribóz) polimeráz a „Janus arcú” enzim

A DNS károsító hatások intenzitása nagymértékben befolyásolja a PARP működését, és ezáltal a sejtek sorsát. A genotoxikus ágensek intenzitásuktól függően több lehetséges utat alakíthatnak ki. Enyhe DNS károsodás esetén a PARP aktiválódik, segíti a DNS károsodás javítását és a sejtet a túlélés útjára lépteti. Egyéb körülmények között, fokozottabb DNS károsodás esetén, mikor apoptotikus folyamatok aktiválódnak, az aktív kaszpáz enzimek két fragmentumra hasítják a PARP-ot. A hasítási fragmentumok közül a N-terminális kisebb fragment DNS kötő képességét megtartva a PARP-ot transzdomináns módon gátolja, míg a nagyobbik fragment az enzim homoasszociációját akadályozza meg. Ezzel megelőzik a DNS fragmentációja során esetlegesen kialakuló PARP aktivációt, és biztosítják a megfelelő energiakészletet az apoptózis energia-függő

lépéseikhez. Így az apoptózisra jellemző úton eliminálódhatnak a sérült sejtek, nem károsítva a környező sejteket (25, 26).

Súlyosabb, kifejezett DNS károsodás esetén a PARP túlaktiválódik, ami a NAD⁺ és az ATP depléciójához vezet. Ennek a speciális sejthalálnak a legfőbb jellemzője az energia készlet kiürülése és a mitokondriális diszfunkció (7).

A fentiek alapján a PARP enzimet akár kétarcú enzimnek is tekinthetjük. Működése során akár „védőangyal”-ként is funkcionálhat, érzékelve a DNS károsodásokat, részt vesz a DNS *repair* mechanizmusában és a genom integritásának őrzésében. Túlaktivációja esetén viszont a sejt intracelluláris NAD⁺ és ATP készlete kimerül, így a sejt energiadeficit állapotba kerül, ami a sejt halálához vezethet.

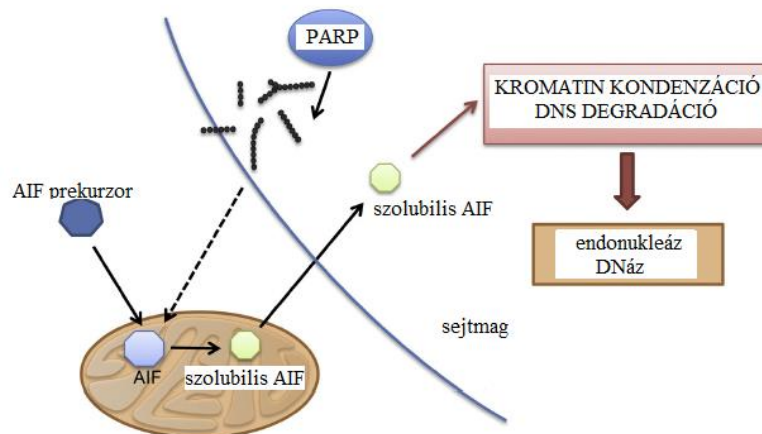
2.3 Parthanatos és az apoptózis indukáló faktor

A klasszikus felosztás szerint a sejtek vagy apoptózissal vagy nekrozissal pusztulnak el. Az apoptózis (programozott sejthalál) során részletesen tanulmányozott, szabályozott folyamatok vannak jelen, melyek alapján a sejt jellegzetes módon zsugorodik, tömörödik és végezetül az immunrendszer eltávolítja. A nekrozist hirtelen bekövetkező, szabálytalan formának tekintették, melyet a sejtmembrán leépülése jellemez. Az elmúlt évek kutatásai már nem állítják szembe ezt a két folyamatot. A modern felfogás szerint sejthalál programok széles skálája létezik, amelynek két végpontjának tekinthető a klasszikus apoptózis és a klasszikus nekrozis (27). A számos sejthalál forma felfedezése mellett, egyre több vizsgálat eredménye világított rá, hogy korábban csak egy sejthalálra jellemzőnek vélt enzim akár több sejthalál formában is aktív szereplő lehet. Ennek tipikus példája a PARP, aminek meghatározott szerepét már több sejthalálformában is leírták: autofágiában, nekroptózisban és parthanatos-ban (28).

A parthanatos néhány éve bevezetett sejthalál terminológia, ami egy olyan kaspáz független sejthalál formát jelöl, amiben a mitokondriális faktorok - kifejezetten az apoptózis indukáló faktor (AIF) - nukleáris transzlokációja jellemző. Az elnevezés egy szóösszetétel, ami a PAR mint a PARP enzim végterméke és a *thanatos*, a görög halál jelentésű szavakból ered. A PARP és az AIF kapcsolata még teljesen nem ismert, de a transzlokáció elősegítésében a PARP enzim végtermékét, a PAR-t feltételezik mint másodlagos hírvivő molekulát (29). Emellett szól, hogy az AIF szerkezete PAR kötő

motívumot tartalmaz, továbbá néhány vizsgálat a mitokondriumon belül igazolta a PAR és az AIF jelenlétét, annak ellenére, hogy a PAR szintézise elsősorban a sejtmagban történik (30).

Az AIF prekuzora a citoszolban termelődik, és innen kerül be a mitokondriumba. A parthanatos során a molekula szerkezete megváltozik, szolubilis formában transzlokálódik a sejtmagba, ahol hozzájárul a kromatin kondenzációhoz és a DNS fragmentációjához (3. ábra) (28, 31).



3. ábra: Az AIF prekuzora a citoszolban termelődik, ahonnan a mitokondriumba kerül. Innen transzlokálódik a sejtmagba az AIF szolubilis formája és hozzájárul a kromatin átrendeződéséhez. A transzlokáció elősegítésében a PARP enzim végtermékét, a PAR-t feltételezik mint másodlagos hírvivő molekulát, amit a szaggatott vonal jelez. Az AIF transzlokáció lépései Francesca Aredia és Anna Ivana Scovassi publikációjából adaptált, módosított ábráján láthatóak (28).

További vizsgálatok szükségesek a parthanatos klinikai jelentőségének igazolására, de a kardiovaszkuláris betegségek érintettsége mellett a neurodegeneratív elváltozásokban is sikerült egyre több bizonyítékot találni erre a sejthalál formára. In vivo experimentális vizsgálatokban Parkinson betegség, stroke és fokális cerebrális iszkémia jelenléte esetén mutatták ki a parthanatos-ra jellemző AIF transzlokációt (32, 33). Bár a PARP aktivációval foglalkozó vizsgálatok számához képest jelenleg kevés információval rendelkezünk az AIF szerepéről, további vizsgálatok biztosíthatják a parthanatos részletesebb megismerését.

2.4 Az endotél diszfunkció és a kardiovaszkuláris kockázat

A medicina folyamatos fejlődése ellenére a kardiovaszkuláris megbetegedések továbbra is a vezető morbiditási és mortalitási mutatók közé tartoznak (34). Bár a koszorúér betegség mortalitása az 1980-as évektől kezdve csökkent, az egyes országok között továbbra is markáns különbségek fedezhetőek fel, és számos rizikófaktor - kifejezetten az elhízás és a cukorbetegség jelenléte- egyre erőteljesebben befolyásolják a jóléti társadalom egészségügyi helyzetét (35, 36).

Míg a koszorúér betegség túlélési adatai javultak az elmúlt évtizedekben, addig a szívelégtelenség prevalenciája emelkedett. Ennek hátterében egyrészt közrejátszik a társadalom elöregedése. A fejlett országok felnőtt lakosságának kb. 1-2%-t jelentik a szívelégtelen páciensek, de arányuk az életkor előrehaladásával folyamatosan emelkedik, ami 70 év felett akár 10%-ot is jelenthet (37). Másrészt az akut miokardiális infarktus korszerű ellátása, a technológia fejlődése (PCI: *percutaneous coronary intervention*) is hozzájárul a hosszabb túléléshez és így az akut és krónikus szívelégtelenség prevalenciájának növekedéséhez (38).

2.4.1 Endotél diszfunkció

Az endotélium az érfal vérárammal közvetlenül érintkező, egyrétegű laphám szerkezetű, szelektíven permeábilis belső rétege, ami a vaszkuláris struktúra és tónus szabályozásában alapvető feladatot lát el. Legfontosabb endoteliális vazodilatátor a nitrogén monoxid (NO), amelyet az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (NOS) állít elő. A NOS-oknak három izoformája ismert: a neuronális NOS (nNOS, NOS1), az indukálható NOS (iNOS, NOS2) és az endoteliális NOS (eNOS, NOS3). Az eNOS és nNOS folyamatosan expresszálódik. Ezek az izoformák felelősek a sejtek kis mennyiségű, alapszintű NO termelésért. Ezzel ellentétben az iNOS működése transzkripciós szinten szabályozott, a gyulladással aktív sejtekben aktiválódik és nagy mennyiségű, lokális NO felszabadulásért felelős (39). Fiziológiai körülmények között termelődött NO a rövid féléletidejének köszönhetően a környező szövetekbe, a szomszédos simaizomsejtekbe diffundál és számos vaszkuláris protektív hatás kialakításában játszik szerepet: a simaizomsejtek relaxációját biztosítja, csökkenti a leukociták adhézióját és migrációját, a trombociták kitapadását és aggregációját, az adhéziós molekulák expresszióját (40). A szignál transzdukciós utak biztosításában

kulcsszerepet töltenek be a ciklikus nukleotidok. A NO az intracelluláris szolubilis guanilát-cikláz (sGC) aktiválásával a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) molekula koncentrációját emeli, ami a cGMP függő protein kináz enzimfehérjék aktiválásával közvetíti a NO legtöbb biológiai hatását. Az endotélsejtekben felszabaduló, másik fontos értágító mediátor a prosztaciklin (PGI_2), ami a prosztaciklin receptorhoz (IP) csatlakozó G_s fehérjén keresztül az adenilát cikláz aktiválásával a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) koncentrációját emeli. A prosztanoid vegyületek családjába tartozik a simaizom összehúzóást kiváltó prosztaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) és a trombocita aktivációért felelős tromboxán A_2 (TXA_2), melyek hatásait a G_q -fehérjéhez kapcsoltan a foszfolipáz $C\beta$ -aktiválása közvetíti (41).

Patológias körülmények között az endotélium strukturális illetve funkcionális változásokon megy keresztül és ateroszklerotikus elváltozások alakulhatnak ki, így az endotél elveszíti vaszkuláris protektív szerepét. Az érkárosodás korai fázisának tekinthető az endoteliális diszfunkció, ami elsősorban funkcionális változást jelent, melynek alapja a NO biológiai hozzáférhetőségének csökkenése. Ez egyrészt fakadhat a csökkent termelődésből az eNOS alacsonyabb aktivitásának köszönhetően, másrészt a reaktív oxigén gyökök (ROS) a NO megkötésével csökkenthetik annak biológiai hozzáférhetőségét. A NO elérhetőségének csökkenése mellett az endotélium további mediátorok (endotelin-1, tromboxán A_2 , prosztaglandin $F_{2\alpha}$) felszabadulásáért felelős, melyek a trombociták aktivációjával, a vazokonstriktívóval az érfal további károsodásában játszhatnak szerepet. Az endotél protektív kapacitásának csökkenésével és pro-aterotrombotikus folyamatok elindításával az endotél diszfunkció kiemelt szerepet játszik az érrelmeszesedés patofiziológiájában (42).

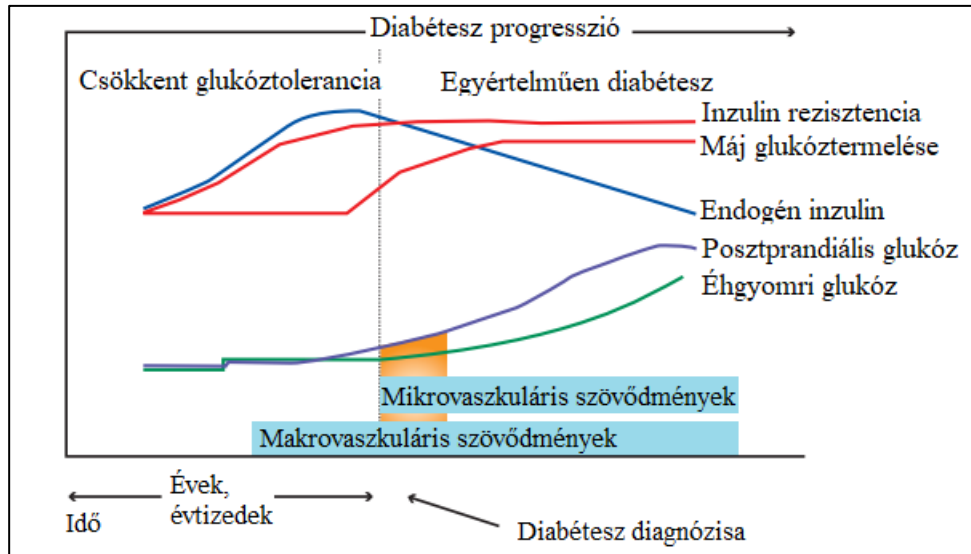
2.4.2 Endotél diszfunkció diabétesz mellituszban

Számos tanulmány bizonyította, hogy az endoteliális diszfunkció több szív- és érrendszeri rizikófaktor (pl.: cukorbetegség, életkor, dohányzás, magas vérnyomás betegség) jelenlétével összefüggést mutat (43). A cukorbetegségben tapasztalt endoteliális diszfunkció mechanizmusában a hiperglikémia, az inzulinrezisztencia és egyéb szisztémás gyulladási folyamatok játszanak szerepet, melyek háttérben az oxidatív stressz, a NO biológiai hozzáférhetősége és a glukóz metabolizmus útvonalainak változása állhat (44). A világban ismert cukorbeteggek több mint 95%-a 2-es típusú

cukorbetegséggel (T2DM) küzd, aminek jellemzője a hiperglikémia, az inzulinrezisztencia és a relatív inzulinhiány, továbbá jelentős rizikófaktora az elhízás és a mozgásszegény életmód. A diabétesz mellitusz 1-es típusát (T1DM) a béta sejtek pusztulásával járó abszolút inzulinhiány jellemzi. Nemzetközi, randomizált vizsgálatok során mind az 1-es típusú, mind a 2-es típusú diabétesz mellituszban szenvedő betegek esetében kimutatták, hogy a glikémiás kontroll javításával a vaszkuláris szövődmények kialakulásának rizikója csökkenthető (45).

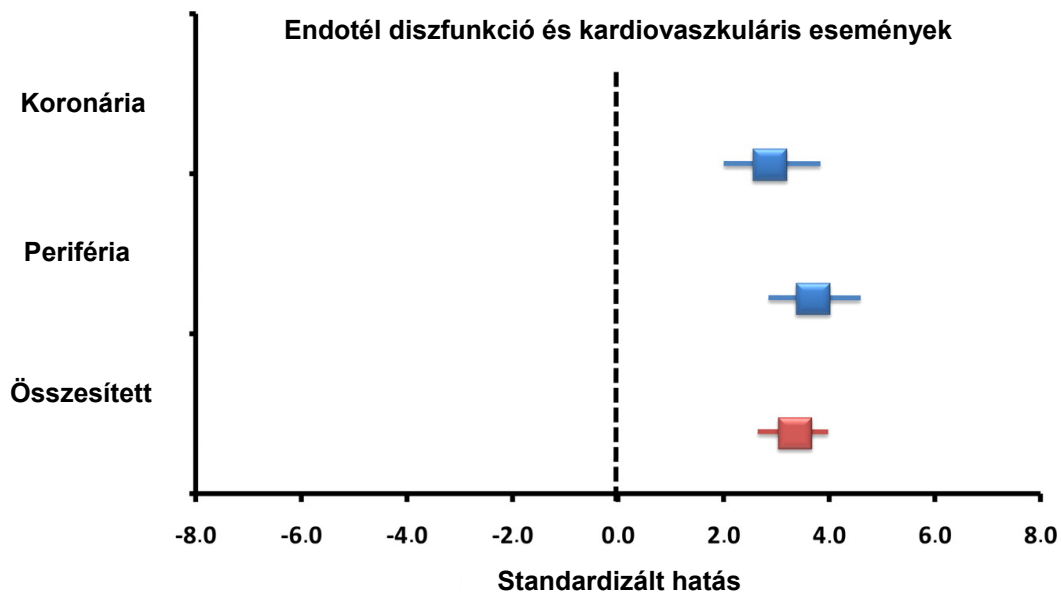
A T2DM patofiziológiájának mechanizmusában az emelkedett éhomi vércukor (IFG), a csökkent glukóz tolerancia (IGT), a cukorbetegség egy spektrumot alkot a „glikémiás kontinuum” koncepciója alapján, amiben a szív és érrendszerei betegségek mint egy következő állomás szerepelhetnek. A vaszkuláris szövődmények közül a nagy ereket érintő makrovaszkuláris szövődmények (koszorúér betegség, stroke, perifériás verőérbetegség) általában korábban jelentkeznek, a cukorbetegség diagnózisa előtt. A kis ereket érintő mikrovaszkuláris szövődmények mint a retinopátia, a nefropátia és a neuropátia többnyire később kerülnek diagnózisra. Ezen progresszív folyamat kezdeti fázisának tekinthető az endotél diszfunkció, ami a vaszkuláris gyulladáson keresztül később ateroszklerotikus plakká tud fejlődni (4. ábra) (46).

Az endotél funkció felmérése során különböző humorális vagy mechanikai ingereket használnak és az erek átmérőjének változásait figyelik. A koronarográfia során humorális stimulusok után a koszorúerek átmérőit vizsgálják, bár invazivitása és költsége miatt rutinszerűen nem használják az endotél diszfunkció meghatározására. Ennél szélesebb körben terjedtek el a nem invazív módszerek. Az áramlás mediálta dilatáció mérése során az artéria brachiális leszorítását követő megnövekedett áramlást vizsgálják Doppler ultrahang segítségével. Ennél a vizsgálatnál számos környezeti, egyéni faktor befolyásolja a méréseket, ezért kifejezetten fontos a vizsgálati modellek/ alanyok előkészítése a mérések előtt. A perifériás artériás tonometria módszere során ujj pletizmográfia segítségével mérik a pulzushullám amplitúdóját nyugalmi és indukált reaktív hiperémiás körülmények között. Ennek a metodikának az előnye, hogy a kontralaterális kar mint kontroll használható, továbbá a módszer betanítása után az intraobszerver variabilitás minimális (47, 48).



4. ábra: Az Európai Kardiológiai Társaság 2013-s ajánlása alapján a diabétesz mellitusz glikémiás kontinuum koncepciójában a mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulása a betegség progressiójához köthető. A szövődmények megjelenése egy progresszív folyamat, ami a korai endotél diszfunkciótól a vaszkuláris gyulladás markerein át az ateroszklerotikus plakk kialakulását jelenti. Az Európai Kardiológiai Társaság 2013-s ajánlásából adaptált, módosított ábráján a diabétesz mellitusz stádiumainak jellemzői láthatóak (46).

Az elmúlt évek vizsgálatai kimutatták, hogy az endotél diszfunkció az ateroszklerózis és a trombózis egyik legfőbb rizikófaktora és hozzájárulhat a kardiovaszkuláris események kialakulásához. Egy közel 2500 páciens magába foglaló metaanalízis során az endotél diszfunkció mellett a szív-érrendszeri események jelentősebb kockázata volt kimutatható (5. ábra) (49). Ugyanakkor az endotél diszfunkció mérésének helye nem feltétlenül jelenti a vaszkuláris szövődmények lokalizációját valamint a nem egyértelmű klinikai adatok miatt, egyelőre a mindennapi orvosi gyakorlatban az endotél diszfunkció klinikai jelentősége még vitatott. Jelenleg az endotél diszfunkcióra úgy tekinthetünk, mint egy teljes rizikóstatuszra vonatkozó, szenzitív markerre, amelynek klinikai, prediktív és prognosztikai szerepének megerősítéséhez további vizsgálatok szükségesek (50, 51).



5. ábra: Lermann és Zeiher multivariáns analizisében különböző tanulmányok, közel 2500 páciens eredményét vizsgálták. A vizsgálatok időtartamától és a bevont páciensek számától függetlenül vizsgálták az endotél diszfunkció és kardiovaszkuláris események kockázata közötti összefüggést. Az ábrán feltüntetett standardizált hatás a kockázati hányadosra, hazard ratio-ra utal. A koszorúerekben és a brachiális artériákban detektált endotél diszfunkció szoros összefüggést mutatott a szív- és érrendszeri események (kardiális mortalitás, miokardiális infarktus, revaszkularizáció) kialakulásával. Bár ellentmondásosnak tekinthető, hogy az endotél diszfunkció detektálásának helye nem jelenti feltétlenül a vaszkuláris szövődmény lokalizációját. Az endotél diszfunkció és a kardiovaszkuláris események közötti összefüggés Lerman és Zeiher publikációjából adaptált, módosított ábráján látható (49).

2.4.3 Endotél diszfunkció szívelégtelenségben

Az endotél diszfunkció szerepét számos betegségben próbálták tisztázni. Évtizedekkel ezelőtt már megfigyelték, hogy szívelégtelenség során az endotél diszfunkció kimutatható a koszorúereken és a periférián (52, 53). Sőt különböző terápiás lehetőségekkel mint például antioxidáns C-vitamin adásával, fizikai aktivitással és az angiotenzin konvertáló enzim gátló (ACE inhibitor) terápiával az endotél diszfunkció csökkenése volt látható krónikus szívelégtelen páciensekben (54-56). Fischer és munkacsoportja 67 krónikus szívelégtelen páciensben vizsgálta az endotél diszfunkció és a kardiális mortalitás közötti összefüggéseket. A Kaplan-Meier túlélési görbe eredménye

alapján a megtartott endotélium mediálta vazodilatáció mellett a páciensek klinikai kimenetele jobb volt a 46 hónapos utánkövetési periódus alatt (57).

A kimutatott endotél diszfunkció lokalizációja mellett szem előtt kell tartani, hogy egy teljes vaszkulaturát érintő, szisztémás jelenség nemcsak a vizsgált szervben okozhat patológiás eltéréseket. Ennek tipikus példája a szívelégtelenség összetett, több szervet érintő klinikai képe, amelyben számos, egyéb szervi elváltozásokban is közreműködik az endotél diszfunkció (58). A koszorúerek endotél rétegében detektálható patológiás eltérések csökkentik a koronária áramlást, a miokardiális perfúziót és a kardiális funkciót (59). Emellett régóta ismert a szívelégtelenségben tapasztalható perifériás vaszkuláris rezisztencia emelkedése, aminek a hátterében a szimpatikus tónus emelkedése, a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAA) rendszer aktiválódása mellett az endotél diszfunkció is közrejátszik. Továbbá az alacsony terhelhetőség kialakulásához a vázizomzat perfúziójának csökkenése is hozzájárulhat, amiben a perifériás endotél diszfunkciónak a szerepét is feltételezik (58, 60). A renovaszkuláris endotél diszfunkció szintén közreműködik a szívelégtelenség klinikai képéhez tartozó veseperfúzió csökkenésének kialakulásban (58). A vizsgálatok eredményei alapján a szívelégtelenség komplex patomechanizmusában az endotél diszfunkció kiemelkedő szereppel bírhat, és nem korlátozódik csupán a korábban leírt pro-aterotrombotikus szerepkörre. Viszont a további részletek feltérképezéshez és a molekuláris mechanizmusok megértéséhez elengedhetetlen a szívelégtelenség modernkori definíciójának megismerése az aktuális klinikai ajánlások tükrében.

2.4.4 Szívelégtelenség terminológiája, diagnosztikája

Az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) irányelvei alapján a szívelégtelenség egy típusos panaszokkal (pl.: légszomj, fáradtság) és tünetekkel jellemezhető klinikai szindróma, amelynek hátterében a szív strukturális és/vagy funkcionális rendellenessége áll, aminek a következménye a csökkent szív perctérfogat és/vagy az intrakardiális nyomások emelkedése. Bár a jelenlegi definíció kifejezett hangsúlyt fektet a panaszok jelenlétére, fontos megjegyezni, hogy a klinikai tünetek megjelenése előtt már fennállhatnak a strukturális és funkcionális abnormalitások. A diagnózis felállításában a képalkotó vizsgálatok, kifejezetten az echokardiográfia központi szerepet játszik. A bal kamra szisztolés funkciója alapján megkülönböztetünk normál ejekciós frakciójú

pácienseket (Heart Failure preserved Ejection Fraction - HFpEF) és csökkent ejekciós frakciójú (Heart Failure reduced Ejection Fraction - HFrEF) betegeket. Az új terminológia szerint a 40% és 50% közötti EF-jú pácienseket szürke zónának tekintjük és közepes EF-jú szívelégtelenségnek definiáljuk (Heart Failure middle reduced Ejection fraction - HFmrEF) (61).

Szívelégtelenség gyanúja esetén a klinikus számára segítséget jelent a B típusú (agyi) nátriuretikus peptid (BNP) meghatározása a kivizsgálási algoritmusban. A térfogat- vagy nyomás-túlterhelést követő kamrai falfeszülés hatására termelődik a kamrai izomzatban a pre-proBNP, ami 108 aminosav hosszúságú proBNP-vé hasad. A szívizomsejtben ez a prohormon 32 aminosavat tartalmazó BNP-re és 76 aminosavat bíró N terminális fragmentumra (NT-proBNP) válik szét (62, 63). A nátriuretikus peptidek elősegítik a diurézist, nátriurézist és a vazodilatációt. Továbbá alkalmasak a szívelégtelenség kizárására meghatározott cut off értékek alapján (BNP - 35 pg/mL, NT-proBNP - 125 pg/mL), de önmagukban nem elegendők a diagnózis felállítására. Számos kardiovaszkuláris és nem kardiovaszkuláris állapot befolyásolja a hormon szintjét (pl.: életkor, ritmuszavar, veseelégtelenség), ami korlátozhatja a peptidszintek értékelését (61).

Általánosságban a szívelégtelenség kialakulásában több tényező szerepelhet. Az ESC ajánlás 3 etiológiát különít el: 1., miokardium érintettséget (koszorúér betegség, toxikus károsodás, immun-mediált károsodás, infiltráció, metabolikus eltérések, genetikai abnormalitások) 2., abnormális nyomási viszonyokat (magas vérnyomás betegség, billentyű és miokardium defektusok, peri- és endokardiális patológia) 3., aritmiákat. A normál és csökkent EF-jú szívelégtelenek különböző epidemiológiai és etiológiai profillal rendelkeznek. A HFpEF páciensek általában idősebbek, gyakoribbak a nők körében és szélesebb komobiditási profillal rendelkeznek, kifejezetten a magasvérnyomás betegség, a cukorbetegség, a krónikus obstruktív tüdőbetegség gyakoribbak ezen betegeknél (64).

Érdemes megemlíteni, hogy az elmúlt néhány évben a klinikusok egyre nagyobb figyelmet fordítanak a szívelégtelenség és a cukorbetegség együttes fennállására. Bár évtizedekkel korábban leírásra került, hogy diabétesz mellituszban megfigyelhető kardiális diszfunkció, a diabéteszes kardiomiopátia hivatalos definícióját jelentő epidemiológiai, patofiziológiai, klinikai paraméterek meghatározása még várat magára

(65). Általánosságban azt a diabétesz mellituszban látható miokardiális diszfunkciót jelenti, amikor minden más kardiovaszkuláris betegség kizárható, ami magyarázhatná kialakulását. A T2DM korai stádiumaiban általában az enyhe szövődmények mellett HFpEF található, míg a HFrEF súlyosabb vaszkuláris komplikációk mellett alakulhat ki (65, 66). Randomizált vizsgálatok kimutatták, hogy azon páciensek esetében, akik mindkét betegséggel küzdenek, több volt a szívelégtelenség miatti kórházi felvétel és szignifikánsan nagyobb összmortalitás, illetve kardiovaszkuláris mortalitás volt látható. Ugyanakkor egy nagy betegszámú, randomizált vizsgálat során azt figyelték meg, hogy egy cukorbetegségben már kipróbált terápia (pl.: empaglifozin) mellett a szívelégtelenség miatti hospitalizáció csökkent (65). Jelenleg további kutatások tárgyát képezi, hogy a két betegségben külön-külön használatos, már beváltak tekintendő terápiás stratégiák milyen hatással rendelkeznek abban az esetben, ha a betegségek együttesen állnak fenn.

2.5 Oxidatív, nitratív stressz és parthanatos szerepe a kardiovaszkuláris patofiziológiában

Egyre több olyan vizsgálat eredményei kerülnek publikálásra, amelyekben az oxidatív-nitratív stressz markereit, a következményes PARP aktivációt és az AIF transzlokációt különböző betegségekben vizsgálják. Jelenleg már olyan mértékű bizonyítékokkal rendelkezünk, hogy az alapkutatás keretein túlmutatva a klinikum világában is fokozott figyelmet kaptak az oxidatív stressz markerei és meghatározó tényezőknek tekintik bizonyos patofiziológiai folyamatokban (3). A következő fejezetben három klinikai területen kívánom bemutatni az oxidatív stressz és a PARP aktiváció szerepét a jelenleg rendelkezésre álló eredmények tükrében, melyek kutatásaim célkitűzéseinek alapjait adták.

2.5.1 Miokardiális iszkémia-reperfúzió

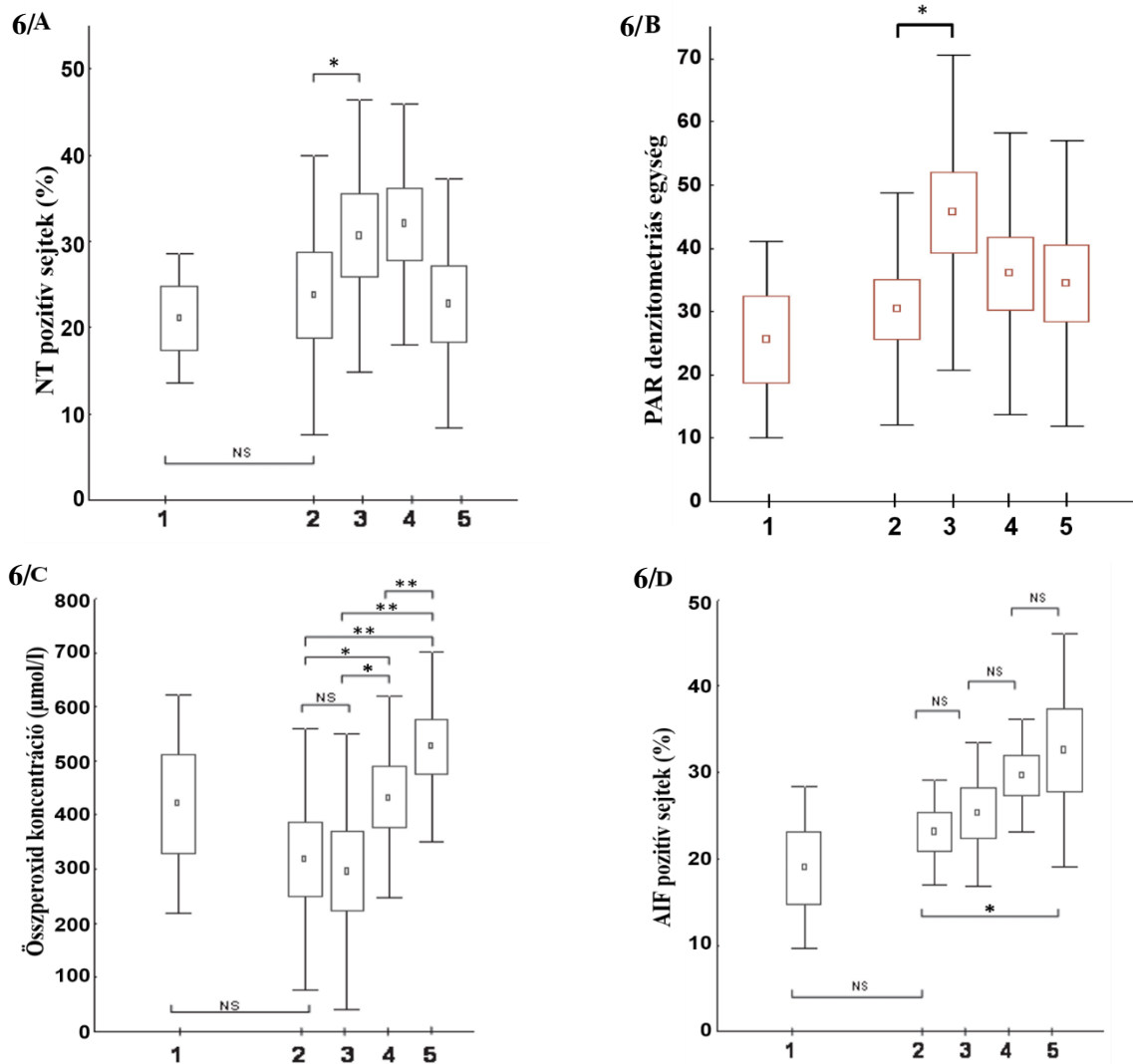
Évtizedek óta egyértelmű bizonyítékokkal rendelkezünk, hogy a miokardiális infarktus ellátásában a mihamarabbi revaszkularizáció megkérdőjelezhetetlen szereppel bír. Viszont az iszkémia patofiziológiája mellett a reperfúziós károsodás jelentősége sem hanyagolható el. A reperfúzió pillanatában a hirtelen meginduló O₂ ellátásnak köszönhetően olyan mértékű oxigén és nitrogén eredetű szabadgyök felszabadulás

mutatható ki, amely hozzájárulhat a revaszkularizációt követő miokardiális *stunning* (kábult szívizomzat), ritmuszavarok, mikrovaszkuláris spazmus, endoteliális diszfunkció kialakulásához, melyek együttesen adhatják a *no-reflow* jelenség hátterét (67).

Az iszkémia-reperfúzió kórélettanában a következményes PARP aktivációra számos vizsgálat eredménye bizonyítékul szolgál. Experimentális vizsgálatok perfúziós szívmodellen igazolták, hogy a reperfúzió alatt a PARP inhibitorok mellett javult a miokardium kontraktilitása és nem ürültek ki az ATP, NAD⁺ raktárak (68). Továbbá számos állatmodellben a PARP inhibitor terápia szignifikánsan csökkentette a miokardiális infarktus területét, a mortalitást és javította a kardiális funkciót (69, 70).

Az állatkísérletekkel szemben a humán miokardium közvetlenül korlátozottan vizsgálható, ezért egy olyan módszer kidolgozására volt szükség, ami lehetővé tette az experimentális bizonyítékok utáni humán vizsgálatok kivitelezését is. Ebben segített annak a vizsgálatnak az eredménye, amiben igazolták, hogy a miokardiumban uralkodó oxidatív-nitratív stressz nem korlátozódik csupán a szívizomzatra, hanem a keringő leukociták, áthaladva a reperfundált kardiális területen, hűen tükrözik az érintett terület sajátosságait (71). Ez a módszer tette lehetővé, hogy csupán egy vérvételen keresztül, in vivo, humán vizsgálatokban is felmérhessük az oxidatív stressz mértékét és a következményes PARP aktivációt.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatában az ST elevációs miokardiális infarktusos betegekben kutatta a parthanatos markereit. A revaszkularizáció (percutan coronary intervention - PCI) előtt, közvetlenül utána, majd 24 és 96 óra elteltével vért vettünk, és a véralkotókban az oxidatív-nitratív stressz mértékét, a lipidperoxidációt, a PARP aktivációt és az AIF transzlokációt vizsgáltuk. Közvetlenül az intervenció után látszott szignifikáns emelkedés a keringő mononukleáris leukocitákban tapasztalható nitrotirozin szintben és PARP aktivációban, míg az AIF transzlokáció és a plazma lipidperoxidáció az utolsó vérvételnél emelkedett markánsan (6. ábra) (72).

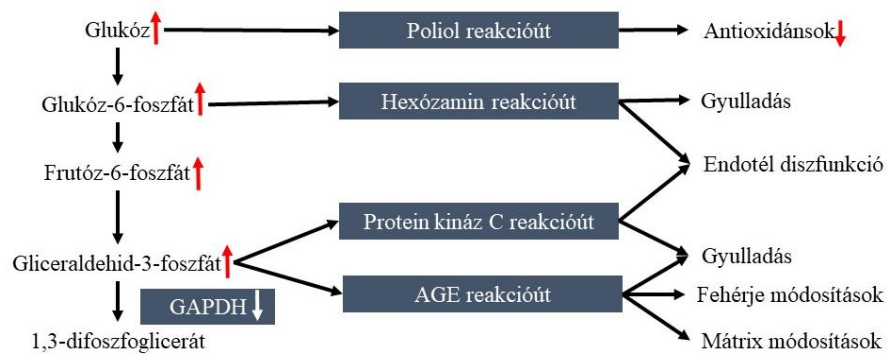


6. ábra: Munkacsoportunk ST elevációs miokardiális infarktus miatt végzett koronária intervención átesett páciensekben (n=15) vizsgálta a parthanatos markereit. A., Szignifikáns nitrotirozin immunhisztokémiai festődés közvetlenül a sikeres intervenció után volt látható. B., A PAR immunhisztokémiai pozitívítás jelentősen emelkedett közvetlenül a PCI után. C., A plazma összperoxid koncentrációjának emelkedése a legnagyobb mértékben az utolsó vérvételnél volt látható. D., Az AIF transzlokációja szintén az utolsó vérvételnél mutatott szignifikáns emelkedést. Az 1. sáv jelöli a negatív kontrollt, akik életkorban megegyező, stabil angina pectoris miatt végzett koronarográfián és intervención átesett páciensek voltak, a 2. sávban közvetlenül a koronarográfia előtti, a 3. sávban közvetlenül a beavatkozás utáni mérések láthatóak, a 24 óra utáni eredményeket a 4. sáv, a 96 óra utáni mintákat az 5. sáv prezentálja. Értékeket átlag (négyzettel jelölve) \pm standard error (dobozzal jelölve) \pm standard deviáció (szárral jelölve) formában ábrázoltuk * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, NS: nem szignifikáns (72).

2.5.2 *Ingadozó vércukorszint okozta endotél diszfunkció szerepe*

A diabétesz mellitusz makro- és mikrovaszkuláris szövődményeinek kialakulásában a csökkent glukóz tolerancia és az inzulin rezisztencia központi szerepet tölt be (65, 73). Az utóbbi évek kutatásainak eredményei alapján világossá vált, hogy az emelkedett vércukorszint hatására az endotélsejtek mitokondriumaiban reaktív szabadgyökök fokozott termelődése történik. Az intracelluláris glukóz koncentráció emelkedése az endotélsejtekben fokozza a glikolízist, amely másodlagosan fokozza a mitokondriumok aktivitását és a mitokondriumok túlműködését okozza, amelynek eredményeképpen szuperoxid szabadgyökök termelődnek (40). Ezek képesek reagálni az endotélsejtben bazálisan termelődő nitrogén monoxid szabadgyökkel, amely peroxinitrit (ONOO^-) képződéséhez vezet. A peroxinitrit több úton képes károsítani a sejteket. Egyrészt oxidálni tudja a tetrahidrobiopterint, amely a NOS enzim egyik esszenciális kofaktora, és ezáltal a NO szintézise csökken. Másrészt a peroxinitrit jelentős hatása, hogy a DNS egyszálú törését okozva következményes PARP aktivációt indukál, amely különböző sejtmagbéli molekulák ribozilálása során a sejt energiaraktárait (NAD^+ , ATP) csökkenti, és hozzájárul az AIF nukleáris transzlokációjához. A megfelelő kofaktorok hiányában a NOS nemcsak nem termel nitrogén monoxidot, de más káros reaktív gyököket, például szuperoxidot generálhat, ezáltal tovább fokozza az oxidatív stresszt mértékét („*uncoupled NOS*”). Ez azt jelenti, hogy egyrészt csökken a NO biológiai hozzáférhetősége, ami az endotél diszfunkció alapját jelenti, másrészt további mechanizmusok erősödnek fel, melyek az oxidatív stressz mértékét tovább emelhetik (74).

A PARP aktivációja az endotélsejtek gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) enzimének módosítását is eredményezi annak poli-(ADP)-ribozilációjával, melynek következtében aktivitása csökken. A GAPDH enzim gátlásának köszönhetően a glukóz metabolizmusa 4 biokémiai út felé tolódik el: 1. a poliol útvonal; 2. a megnövekedett késői glikációs termékek (*advanced glycation endproducts*, AGE) termelődése; 3. a PKC aktiválódása; 4. megnövekedett hexózamin útvonal. Ezen biokémiai útvonalakon keresztül fokozódik a sejtek oxidatív stressz érzékenysége, az oxidatív gyökök termelődése, továbbá endotél diszfunkció és egyéb vaszkuláris gyulladási mechanizmusok alakulnak ki (7. ábra) (75).



7. ábra: A GAPDH enzim poli-ADP-riboszilációja során az enzim aktivitása csökken és a glukóz metabolizmusa a fenti 4 reakcióútra terelődik, ami oxidatív markerek termelődéséhez, gyulladáshoz és endotél diszfunkcióhoz járul hozzá.

A diabétesz mellitusz szövődményeinek kialakulásában számos experimentális és humán vizsgálat megerősítette a hiperglikémia jelentőségét. A DCCT (*Diabetes Complications and Control Trial*) és a UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) vizsgálatoknak késői utánkövetési eredményeiből ismertük meg a metabolikus memória fogalmát, amelyet ma már szélesebb kontextusban vaszkuláris memóriaként is említhetünk. A vizsgálatok azt mutatták, hogy azon pácienseknél, akik korai, intenzív terápiában részesültek, kisebb volt a diabétesz szövődményeinek előfordulási gyakorisága. Az újabb kutatások szerint az oxidatív gyökök túltermelődése és az általuk okozott epigenetikus változások állhatnak a jelenség hátterében, melyek a késői diagnosztizálás után a beállított terápia ellenére kialakult vaszkuláris szövődmények megjelenését magyarázhatják (46, 76).

Bár a metabolikus memória biokémiai hátterének feltérképezése egyre több kutatás tárgyát képezi, a pontos mechanizmusról viszonylag keveset tudunk. Jelenleg a metabolikus memória mechanizmusában a tartósan magas vércukorszint szerepe vitathatatlan, de az utóbbi időkben egyre nagyobb figyelmet kapott az ingadozó (oszilláló) vércukorszint okozta mechanizmusok vizsgálata is, mint a vaszkuláris szövődmények kialakulásáért felelős faktorok egyike. Piconi és munkatársai humán umbilikális véna endotél sejteken hasonlították össze az ingadozó vércukor és a stabilan magas vércukor szint hatásait. Az ingadozó vércukorszint mellett markánsabb volt a

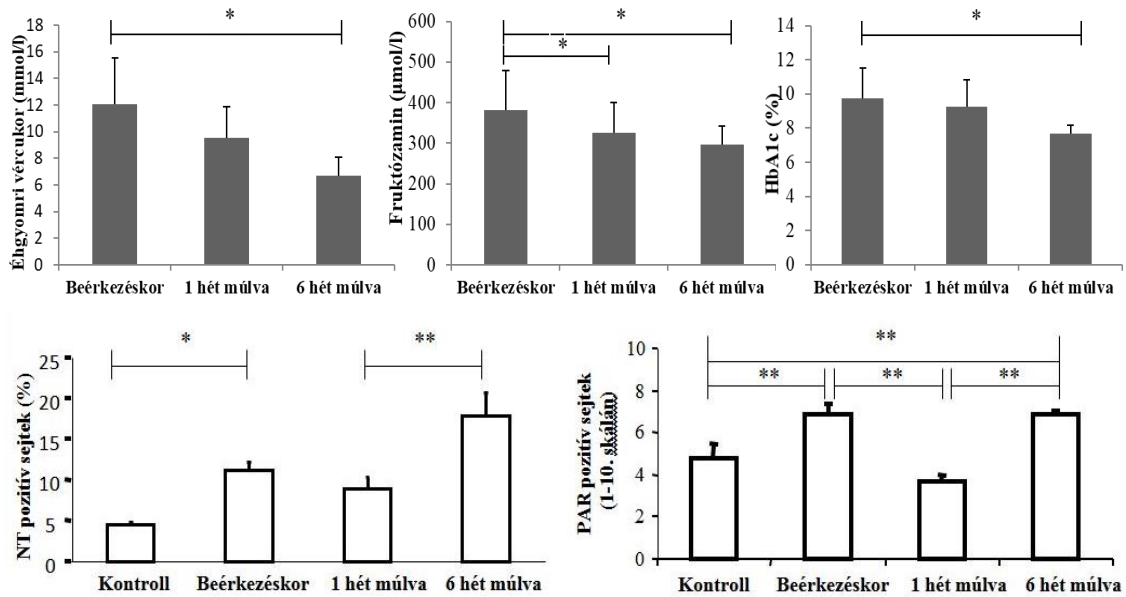
tirozin nitráció és az adhézións molekulák expressziója, viszont a PARP gátlók mellett mindkét esetben jelentősen csökkent a nitrotirozin és az adhézións molekulák expressziója (77). Humán endoteliális sejteken a tartósan magas vércukorszinttel szemben a glukóz oszcilláció mellett volt megfigyelhető az antioxidáns kapacitás jelentősebb károsodása (78). Zakaria és munkacsoportja szénhidrátban és zsírban gazdag étrend, illetve alacsony dózisu streptozotocin által kiváltott diabétesz állatmodelleken vizsgálták a kardiális szövödményeket. A diabéteszes mintákban emelkedett PARP aktiváción túl kimutatták, hogy a 4-aminobenzamid PARP inhibitor csökkentette a vaszkuláris gyulladást és az endoteliális destrukciót (79).

Humán vizsgálatokban is megfigyelték az ingadozó vércukorszint okozta károsító hatásokat. Ceriello és munkatársai 27 cukorbeteg páciensen és 22 egészséges önkéntesen vizsgálták az ingadozó vércukor hatásait, amit euinzulinémiás, hiperglikémiás *clamp* módszertannal biztosítottak. Ebben a módszerben az euinzulinaemia fenntartására az endogén inzulin szekréciót gátolták szomatosztatin adásával és emellett alakítottak ki hiperglikémiás profilokat. Mind az egészségesekben, mind a betegekben szignifikáns nitrotirozin emelkedést és jelentős endotél diszfunkciót találtak (80). Ezzel összhangban további klinikai vizsgálatok is azt támasztják alá, hogy a glikémiás variabilitás a klinikusok számára mai napig is terápiás kihívást jelent. Muggeo és munkatársai 2. típusú diabéteszes páciensek vizsgálati során azt találták, hogy a mortalitás sokkal inkább az éhomi vércukor variabilitásával van összefüggésben, mint azok abszolút értékével (81). Temelkova-Kurktschiev és munkacsoportja 582 kiválasztott, 40 és 70 év közötti páciens glukóz laborparamétereit (éhomi vércukor, terheléses vércukor értékek, HbA_{1c}, vércukor kiugrások) vizsgálták, hogy milyen összefüggésben állnak az intima-media vastagsággal (IMT). Bár a pácienseknél nem volt ismert a cukorbetegség, de fokozott rizikóstátusszal rendelkeztek (obezitás, családban előfordult 2. típusú diabétesz mellitusz). A kutatás eredményei alapján a vércukorszint kiugrási értékek mutatták a legerősebb kapcsolatot az IMT értékekkel (82, 83). Krinsley retrospektív tanulmányában 1999 és 2007 között több mint 3000, kritikus állapotban lévő páciens laborleleteiben vizsgálták a vércukor értékeket és a mortalitást. A vizsgált betegcsoportban az emelkedett glikémiás variabilitás a mortalitás független prediktora volt, míg a kisebb tartományban mozgó vércukor paraméterekkel rendelkező páciensek túlélési esélyei jobbak voltak (84). Emellett érdemes megjegyezni, hogy a hipoglikémiás periódusok kialakulása is összefüggésben

állhat a kardiovaszkuláris eseményekkel (85). Egy új vizsgálatsorozat (*DEVOTE*) eredményei azt mutatták, hogy az egymás után következő napok éhomi vércukorszintje közötti variabilitás mértéke szignifikáns kapcsolatot mutatott a súlyos hipoglikémiákkal, a szív-érrendszeri szövődmények megjelenését 1,2-szeresére és a halálozási kockázatot 1,4-szeresére növelte (86).

Ezen eredmények alapján érthető, hogy az ingadozó vércukorszint szerepéről további vizsgálatok szükségesek, amely során az oxidatív-nitratív stressz kialakulását, a következményes PARP aktivációt és az endotél diszfunkciót tanulmányozzák. A nemzetközi vizsgálatok eredményei mellett munkacsoportunk korábbi vizsgálatai is alátámasztották az ingadozó vércukorszint jelentőségét. A volt Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem (HIETE) Szabolcs utcai kórházának diabetológiai osztályán kezelt 2. típusú cukorbetegeket vizsgáltunk. A szénhidrát háztartás labor paraméterei (HbA1c, fruktózamin) mellett az oxidatív-nitratív stressz mértékét és a PARP aktivitását mértük keringő leukocitákban. Hipotézisünk az volt, hogy a beállított terápia mellett az oxidatív paraméterek is csökkennek. A kórházi elbocsájtáskor, hipotézisünknek megfelelően a rendezett cukorháztartás paraméterei mellett csökkent nitrotirozin festődést és PARP aktivációt tapasztaltunk. Viszont a 6 hetes kontrollnál a továbbra is rendezett labor paraméterek mellett a kórházi felvételkor kimutatott oxidatív markerekhez hasonló, emelkedett PARP aktivációt mutattunk ki (8. ábra).

A klinika paraméterek (labor, státusz, gyógyszerelés) nem adtak magyarázatot erre az eltérésre, viszont a páciensek részletesebb kikérdezésekor szinte mindegyik bevallotta, hogy a kórházban előírt diétát nehezen tudták tartani, sőt a kontroll az év végére esett (karácsony, szilveszter), ami még inkább megnehezítette a diéta betartását. Ennek megfelelően azt feltételeztük, hogy az időnkénti diéta megszegése a hagyományos kontroll labor paraméterekkel (HbA1c, fruktózamin) nem volt detektálható, de elegendő volt ahhoz, hogy olyan vércukorszint ingadozásokat produkáljon a pácienseknél, ami hozzájárulhatott az oxidatív stressz és a következményes PARP aktiváció kialakulásához. A feltételezésünk igazolására a klinikai vizsgálatot nem tudtuk folytatni a diabetológiai osztály bezárása miatt. Egyrészt ennek köszönhetően ezek az eredmények nem kerültek publikálásra, de hozzájárultak a disszertációm témáját képző vércukor ingadozások experimentális vizsgálatának elindításához.



8. ábra: A páciensek cukorháztartását jellemző paramétereinek (éhomi vércukor, fruktózamin, HbA1c) vizsgálata során a kórházi felvételkor mért értékek és a 6 hetes kontroll között szignifikáns javulás volt kimutatható, ami az adekvát terápia beállítására utalt. Ennek ellenére a mononukleáris leukocitákon végzett immunhisztokémiai vizsgálat során a nitrotirozin festődés és a PARP aktivitás jelentős emelkedést mutattak a 6 hetes kontrollnál, ami nem követte a klinikai paraméterek javulását. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk. (*:p<0,05, **:p<0,01)

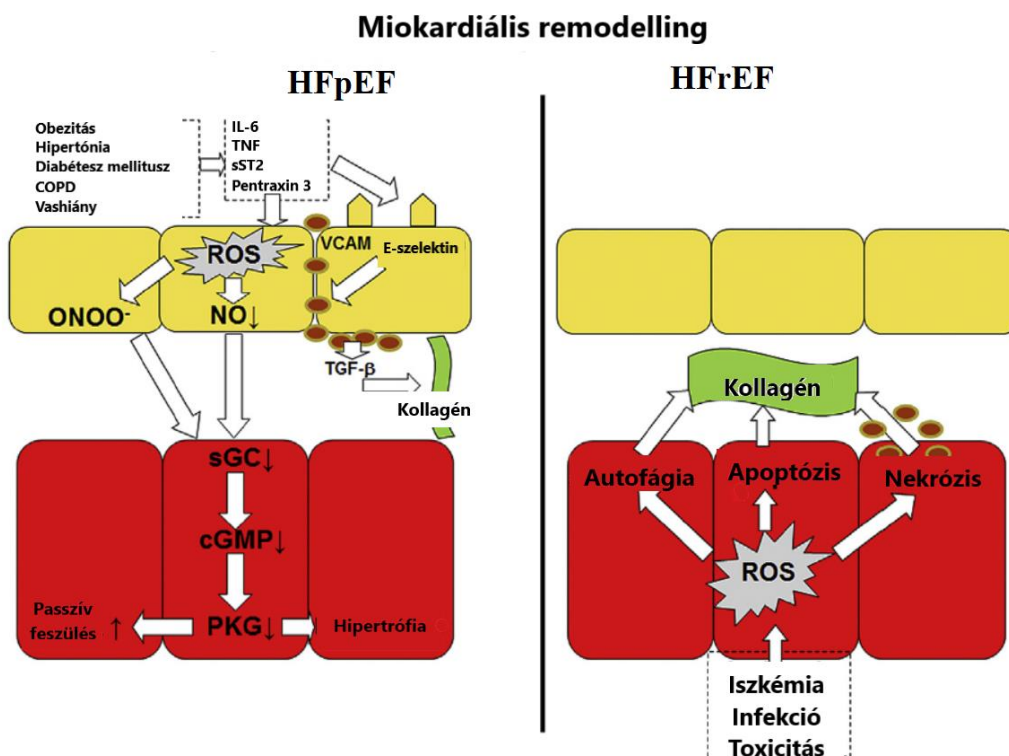
2.5.3 Krónikus szívelégtelenség

A szívelégtelenségben tapasztalt ROS felszabadulása a mitokondriumhoz, a NADPH oxidázhoz, a xantin oxidázhoz, a szétkapcsolt (*uncoupled*) NOS-hoz és a P450 enzimsaládhoz köthető (87). A ROS termelődésén túl nem lehet figyelmen kívül hagyni a mitokondrium és a citoszol ioncsatornáinak átalakulását, ami szívelégtelenség patomechanizmusának egyik legfontosabb sejtbiológiai jellemzőjének is tekinthetjük. Szívelégtelenségben az excitáció-kontrakció kapcsolást biztosító Ca^{++} -ion háztartás szignifikánsan megváltozik. Fiziológiás körülmények között az akciós potenciál alatt az L-típusú csatornák megnyílásával a Ca^{++} beáramlik, majd a rianodin receptorok megnyílásával további, nagymennyiségű Ca^{++} felszabadulás detektálható, ami a troponin C-vel komplexet alkotva a miocita kontrakcióját váltja ki (88). A relaxációért a Ca^{++} -nak

a szarkoplazmás retikulumba (SR) történő visszavételért felelős szarko-endoplazmatikus reticulum Ca^{++} -pumpa (SERCA), valamint a plazmamembránban található plazmamembrán Ca^{++} -pumpa és a Na/Ca kicserélő transzporter (NCX) működése felelős. Szívelégtelenségben a SERCA diszfunkciója mellett kimutatható az SR rianodin receptorának fokozott nyitvatartása, ami együttesen a szarkoplazma Ca^{++} kinetikáját, kontrakció utáni visszavételét rontja, ami végezetül a diasztolé alatti relaxáció károsodását eredményezi. A SR csökkent Ca^{++} visszavételének kompenzálására a szarkolemma NCX fokozott expressziója és aktivációja alakul ki (3). A szívelégtelenségre jellemző, felborult Ca^{++} homeosztázisban több beavatkozási célpont is meghatározásra került, ami jelenleg a klinikumban alkalmazott kezeléseken túl számos további kutatás tárgyát is képezi a terápiás lehetőségek kibővítése céljából (89).

A szívelégtelenség kialakulásában az oxidatív stressz jelentősége vitathatatlan, de a megtartott és a csökkent EF szívelégtelenség esetén két különböző mechanizmus dominál. A normál EF-jú szívelégtelenség kialakulásában a társbetegségek jelenléte kiemelt jelentőségű, például a túlsúly, a magasvérnyomás betegség, a diabétesz mellitusz, a krónikus obstruktív tüdőbetegség, az anémia, a veseelégtelenség (90). Ezen krónikus betegségek a proinflammatorikus citokinek (pl.: tumor nekrozis faktor (TNF), interleukin-6 (IL-6), szolubilis „*Suppression of Tumorigenicity*” 2 (sST2), pentraxin 3) fokozott termelődésével egy szisztémás, gyulladással állapotot tudnak kialakítani (91). Az általános gyulladással állapot hatással van a koszorúerek mikrovaszkuláris endotél sejtjeire és további gyulladással kaskádrendszereket indít el, amely során a további gyulladással citokinek termelődése mellett adhéziós molekulák expressziója is fokozódik (vaszkuláris sejt adhéziós molekula (VCAM), endoteliális szelektin (E-szelektin)). Az endotél felszínén megjelenő adhéziós molekulák elősegítik a keringő leukociták szubendoteliális migrációját. Továbbá a gyulladással citokinek hatására az endoteliális reaktív oxigén gyökök termelődése fokozódik, a NO biológiai hozzáférhetősége csökken, és a peroxinitrit koncentrációja emelkedik (92). Az endoteliális oxidatív-nitratív stressz hatására a miokardiumban a szolubilis guanilát cikláz (sGC) aktivitása csökken, ami végeredményben a protein kináz G (PKG) aktivitás csökkenéséhez vezet. A PKG csökkent aktivitása hozzájárul a szívizomsejtek passzív feszülésének emelkedéséhez, aminek háttérében a szarkomer elasztikus tulajdonságáért felelős fehérje, titin hipofoszforilációját feltételezik (93). Továbbá a PKG miokardiális hipertrófiát gátló

funkciója is károsodik (94). Emellett a monociták szubendoteliális migrációja további szöveti változásokat generálnak a felszabaduló transzformáló növekedési faktorok (TGF β) hatására. A fokozott fibroblaszt proliferáció és a miofibroblasztok transzformációja az intersticiális kollagén termelődését emelik. Ezen részletezett patofiziológiai folyamatok együttesen magyarázzák HFpEF szívizomzat szövettani elváltozásait, amelyek végeredményben diasztolés diszfunkciót eredményeznek (9. ábra) (95, 96).



9. ábra: A normál EF-jú és a csökkent EF-jú szívelégtelenség patomechanizmusában a ROS túltermelésének kiinduló pontjai különbözőek. HFpEF esetén az endoteliális ROS termelés, HFrEF klinikum esetén közvetlenül a miokardiumban kialakult oxidatív stressz játszik központi szerepet. A miokardiális remodelling háttérében lévő oxidatív stressz okozta változások Walter J. Paulus és Carsten Tschöpe publikációjából adaptált, módosított ábráján láthatóak (95).

Hipertenzív egérmódelben az echokardiográfiával detektált diasztolés diszfunkcióban fokozott kardiális oxidáció, csökkent NO és a tetrahydrobiopterin (BH4) oxidációja mellett szétkapcsolt NOS aktivitás volt kimutatható (97). Hipertenzív

experimentális vizsgálatban a késői Na⁺-csatornát blokkoló gyógyszer, a ranolazin terápia hatására a szívultrahangos és hemodinamikai paraméterek, az oxidatív státusz mérései, a szívizomsejtek funkcionális analízise, a miofilamentumok Ca⁺⁺-érzékenységének eredményei a diasztolés diszfunkció javulását mutatták (98). Diétával indukált diabéteszes állatmodellben a diasztolés diszfunkciót kardio-MRI-vel vizsgálták, amiben az antioxidáns terápia alkalmazásával szignifikáns javulást tudtak elérni (99).

Ellentétben a diasztolés szívelégtelenséggel, a csökkent EF-jú szívelégtelenségben nem az endoteliális oxidatív stressz játszik központi szerepet, hanem közvetlenül a szívizomsejtben figyelhető meg a fokozott ROS termelődés, aminek hátterében iszkémia, toxikus vagy infekciós okok állhatnak (9. ábra). A miociták fokozott ROS termelődése eleinte sejtdiszfunkciót, majd később a sejthalál különböző formáit triggerelheti, ami végezetül a szívizomzat fibrotikus átalakulását eredményezi (95, 96).

Számos experimentális és klinikai tanulmány igazolta már, hogy a szívelégtelenség hátterében az oxidatív stressz jelentős szereppel bír (100). A dilatatív kardiomiopátiával kezelt betegekben a lipid peroxidáció markáns emelkedését mutatták ki és pozitív korrelációt találtak a tünetek súlyosságával. Továbbá fordított összefüggést írtak le a lipidperoxidáció mértéke és a kardiális funkció (EF, terhelhetőségi kapacitás) között. A ROS túltermelődés biomarkerének plazma szintje szintén szorosan korrelált a bal kamra végdiasztolés és végszisztolés átmérőivel, továbbá hasonló összefüggést találtak a szívelégtelenség tüneteivel is (101). A szívelégtelenségben kialakult oxidatív gyökök egyik forrása a xantin oxidáz. Több vizsgálat igazolta, hogy a szívelégtelenségben egyes gyulladáshoz kapcsolódó markerek (E-szelektin, ICAM, TNF, interleukin-6) mérhető emelkedése mellett szignifikáns hiperurikémia is detektálható (102). Xantin oxidáz gátló, allopurinol terápiával számos vizsgálatot is végeztek, melyek kezdetben kecsegtető eredményekkel szolgáltak. 300 mg allopurinol terápiával 11 NYHA II-III funkcionális stádiumban lévő páciens esetében javította az endotél diszfunkciót és csökkentette az oxidatív stressz mértékét (103). Ellenben a 2015-ben megjelent EXACT-HF vizsgálat eredményeiben nem volt kimutatható a szívelégtelen páciensek szignifikáns javulása allopurinol terápia mellett (104).

A PARP szívelégtelenségben betöltött szerepét több állatmodellben sikerült kimutatni. Streptozotocin indukálta diabéteszes állatmodellben a miokardiális kontraktilitás csökkenése szignifikáns összefüggést mutatott az endotél és a

szívizomsejtben detektálható poli-(ADP)-ribóziláció mértékével (105). Aorta szűkítés, endotoxin, doxorubicin indukálta szívelégtelen állatmodellekben látható volt a fokozott PARP aktivitás és az AIF transzlokációja, valamint különböző PARP inhibitor terápia mellett a patológiás kardiális elváltozások mérséklődését is megfigyelték (106-109). Weidong Quin és munkatársai diabéteszes kardiomiopátiában vizsgálták a PARP szerepét. H9C2 kardiomiocita sejt kultúrán végzett vizsgálatok eredményei alapján hiperglikémia stimulációra fokozott oxidatív stressz és DNS károsodás volt látható a PARP fokozott expressziója és aktivációja mellett. Viszont PARP inhibitor előkezelés esetén szignifikánsan csökkent a gyulladáshoz kapcsolódó markerek (TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1, iNOS) expressziója. Továbbá a streptozotocin indukálta diabéteszes modellben a PARP-1 $-/-$ knock-out egerek esetén a kardiális funkció javulása volt megfigyelhető (110).

Viszonylag kevesebb humán vizsgálat áll rendelkezésünkre, de közöttük is kiemelendő Molnár és munkatársainak vizsgálata, amelyben szívtranszplantáció során a recipiensektől nyert humán mintákon kutatták a PARP aktiváció és a szívelégtelenség kapcsolatát. A szívtranszplantáció során nyert minták szövettani vizsgálata során szignifikánsan nagyobb aktiváció volt megfigyelhető a szívelégtelen csoportban, bár szignifikáns AIF transzlokációt nem tudtak kimutatni (111). Soriano munkacsoportja 25 szeptikus sokk miatt kezelt páciensben vizsgálta a PARP aktivitás és a kardiális diszfunkció közötti összefüggést. A PARP aktivitására jellemző PAR immunhisztokémiai festődése pozitív korrelációt mutatott a troponin értékekkel, míg a PAR festődés denzitometriás mérése és a bal kamra stroke volumen index között a korrelációs együttható r^2 értéke 0,33 volt ($p=0,0509$) (112). Pillai és munkacsoportja 14 szívelégtelen páciens mintáit dolgozta fel, melyből 7 iszkémiás kardiomiopátia, 5 dilatatív kardiomiopátia és 2 restriktív kardiomiopátia volt, kontrollnak pedig nem szívelégtelen páciensek szívsebészeti műtétei során nyert mintákat használtak fel. Western blot analízis során a szívelégtelen mintákban szignifikáns PARP aktivációt mutattak ki (113). A munkacsoport további vizsgálataiban a pro-apoptotikus p53 deacetilációjáért felelős Sir2 α aktivitását is vizsgálták. A szívelégtelen páciensekben a PARP aktivációja összefüggést mutatott az alacsonyabb Sir2 α aktivitással, ezáltal biztosítva az apoptózisban központi szerepet játszó p53 fokozott működését (114).

Az experimentális kutatások bőséges eredményei meggyőzőek lehetnek, de a jelenleg rendelkezésre álló kevés humán vizsgálat egyelőre nem elegendő, hogy teljes

képet kapjunk a PARP aktivációval és az AIF transzlokációval jellemezhető parthanatos jelenségről. Végül ez indította el újabb vizsgálatunkat, ami a szívelégtelen páciensek mintáiban tanulmányozta a parthanatos markereit.

3. Célkitűzések

A parthanatos fogalma néhány éve került bevezetésre, ennek ellenére a PARP enzim vizsgálata évtizedes múltra tekint vissza. Számos betegség patomechizmusában bizonyítást nyert, hogy az oxidatív-nitratív stressz okozta PARP aktiváció központi szerepet játszik. Kutatásaink célja volt a szabadgyökök által kiváltott PARP aktiváció jelenlétének vizsgálata kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Összefüggéseket kerestünk az egyes szövetekben megfigyelhető parthanatos jelenléte és az állatkísérletes modellben az ingadozó vércukorszint kiváltotta endotél diszfunkció, illetve a humán krónikus szívelégtelenség között.

3.1 Endotél károsodás és parthanatos felmérése ingadozó vércukorszintben

A korábbi fejezetekben részletesen ismertetésre került, hogy diabétesz mellituszban a magas vércukor szint hogyan járul hozzá a mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásához. Kutatásunk célja az volt, hogy a mai klinikai gyakorlatban kevésbé ellenőrzött vércukor ingadozások milyen mértékű szerepet játszanak az endotél diszfunkció kialakulásában, és ennek háttérében kimutatható-e az oxidatív-nitratív stressz okozta PARP aktiváció.

3.1.1 *Vércukor ingadozás és a vaszkuláris diszfunkció*

Célkitűzésünk első kérdése az volt, hogy az ingadozó vércukor szintek befolyásolják-e az endotél függő relaxációt és ez milyen mértékű endotél diszfunkciót jelent.

3.1.2 *Vércukor ingadozás és az oxidatív-nitratív stressz*

A különböző vércukorszint profilok esetén vizsgáltuk a lokális és szisztémás oxidatív-nitratív stressz változásait, és arra kerestük a választ, hogy az ingadozó vércukor mellett milyen szignifikáns különbségek fedezhetőek fel a folyamatosan magas vércukorszinttel szemben.

3.1.3 *Vércukor ingadozás és a PARP aktiváció*

Kutatásunk központjában a PARP aktiváció vizsgálata állt, amely során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy kimutatható-e az ingadozó vércukor szint mellett fokozott aktivitás.

3.2 Szívelégtelenséget jellemző paraméterek és a parthanatos markerei

A parthanatos szívelégtelenségben végzett korábbi vizsgálatai többségében experimentális modelleken történtek. Emellett egyre bővülő irodalom támasztja alá, hogy a szívelégtelenség patomechizmusában a reaktív szabad gyökök szerepe kiemelkedő. Ezért vizsgálatunk elsődleges kérdése az volt, hogy kimutatható-e humán véralkotókban a ROS által okozott PARP aktiváció és ez milyen összefüggést mutat a szívelégtelenség klinikai paramétereivel.

3.2.1 *Parthanatos a szívelégtelenségben*

Vizsgálatunk célja az volt, hogy kimutassuk humán, szívelégtelen véralkotókban az oxidatív-nitratív stressz, a következményes PARP aktiváció és az AIF transzlokáció jelenlétét, melyek a parthanatos celluláris jellemzőit jelentik.

3.2.2 *Szívelégtelenség és a parthanatos közötti korreláció*

Vizsgáltuk, hogy a szívelégtelenség paramétereit és a klinikai jellemzők mutatnak-e összefüggést a parthanatos markereivel.

4. Módszerek

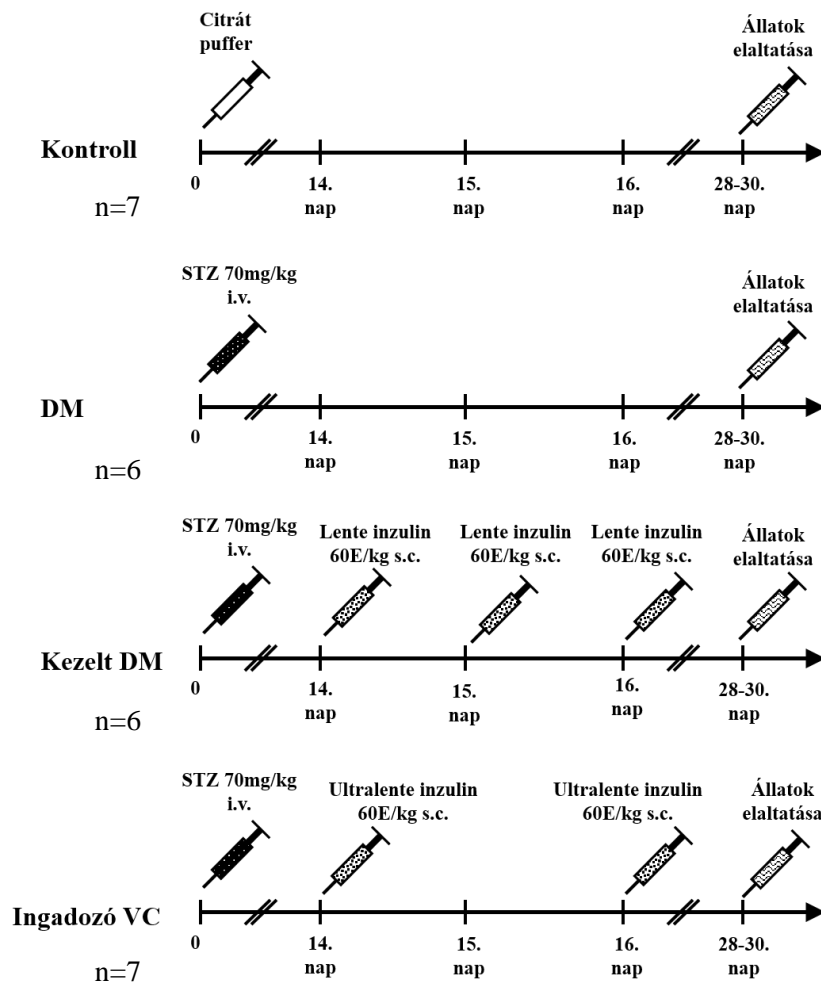
4.1 Vizsgálati protokoll

4.1.1 *Diabéteszes állatmodell*

Tizenkilenc, azonos életkorú, 380-480 g testsúlyú hím Wistar patkányban (Toxicoop, Budapest, Magyarország) streptozotocin kezeléssel (iv. 70 mg/kg STZ, citrát puffer, Sigma-Aldrich, Németország) inzulin hiányos állapotot hoztunk létre. A streptozotocin szelektíven citotoxikus a pancreas béta sejtjeire, aminek következményeként egyszeri magas dózissal (200 mg/kg) alakítható ki teljes inzulin hiányos állapot, ami az 1. típusú diabétesz mellitus modellnek felelhet meg (115). Vizsgálatunk során alacsonyabb dózissal dolgoztunk, ami az inzulin termelést teljes mértékben nem ronsolta és ezen állatmodellekre jellemző diabetogén táplálást nem végeztünk. Modellünk olyan inzulinhiányos állapotnak tekinthető, ami teljes inzulin dependenciát nem alakított ki és minimális saját inzulin termelést meghagyott. A teljes toxikus adagnál alacsonyabb streptozotocin kezelés elegendő volt ahhoz, hogy olyan inzulin hiányos állapot alakuljon ki, amiben az inzulin terápia adagolásával különböző vércukor profilokat tudjunk kialakítani. A 14. naptól a diabéteszes állatok egyik csoportjának (n=6) vércukorszintjét 24 óránkénti lente inzulin (s.c. 60 U/kg, Sanofi Aventis, Párizs, Franciaország) adásával normalizáltuk (kezelt DM csoport). A cukorbeteg állatok másik csoportjában (n=7) ingadozó vércukorszintet hoztunk létre 48 óránkénti ultralente inzulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánia) injektálásával (s.c. 60 U/kg) (Ingadozó VC csoport). A kísérlet tervezésekor nem volt ismert olyan tanulmány, mely felvetette volna annak lehetőségét, hogy a két inzulinkészítmény befolyásolhatja a vizsgált paramétereket, célunk kizárólag a vércukorszint manipulálása volt. 6 cukorbeteg állatot nem kezeltünk (DM csoport). Hét állat csak a streptozotocin oldószerét kapta (kontroll csoport) (10. ábra).

Az állatmodell kialakításánál óránkénti vércukor ellenőrzést végeztünk. A vércukor mérési időpontokat úgy ütemeztük, hogy a várható maximális és minimális értékek is regisztrálásra kerüljenek. Ezt követően került beállításra a 6 óránkénti vérvétel gyakorisága és időpontja. Tíz napos inzulinkezelést követően minden csoportban 48 órán keresztül ellenőriztük a vércukor szintet a farokvégből vett vérvétel során, az első vérvételt közvetlenül az inzulin beadása előtt végeztük és 6 óránként ismételtük (Accu-

Check). 2 hét inzulin terápia után az állatokat intraperitoneális tiopentállal elaltattuk. A vena cava inferior-ból vért vettünk, melyből fél órán belül gradiens centrifugálással mononukleáris leukocitákat izoláltunk, melyeket áramlásos citometriával vizsgáltunk tovább. A mellkasi aortát kiperaráltuk és a kötőszövettől megtisztítottuk, majd 2-3 mm-es érgyűrűket vágunk *ex vivo* érfunkciós vizsgálatok elvégzéséhez. Továbbá az érgyűrűk egy részét formalinban fixáltuk és immunhisztokémiai festéshez paraffinos metszeteket készítettünk Ezt követően csontvelői hemopoetikus sejteket izoláltunk, melyekből metanollal fixált keneteket készítettünk.



10. ábra: Experimentális protokoll

Kontroll csoportot, kezeletlen cukorbeteg (DM), kezelt cukorbeteg (kezelt DM) és ingadozó vércukor (Ingadozó VC) csoportot hoztunk létre. Streptozotocin adásával hoztunk létre cukorbetegséget, az adekvát kezelést lente inzulin terápiával biztosítottuk, az ingadozó vércukor profilt ultralente terápiával alakítottuk ki.

A vizsgálatokat a “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” U.S. National Institutes of Health kiadványának megfelelően (NIH Publication 85-23 revised 1985), a Helyi Állatvédelmi Bizottság engedélyével végeztük.

4.1.2 Krónikus szívelégtelen betegek vizsgálata

A vizsgálatban a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinika gondozása alatt álló szívelégtelen páciensek és normál szisztolés szívfunkcióval rendelkező alanyok vettek részt. A szívelégtelen betegek (n=20) a vizsgálat során stabil kardiopulmonális állapotban voltak (NYHA: II-III), kivizsgálásuk és kezelésük megfelelt az aktuális Európai Kardiológiai Társaság ajánlásának. A kardiális funkció vizsgálata transztorakális echokardiográfiával (TTE) történt, az ajánlásnak megfelelően az ejekciós frakciót módosított Simpson módszerrel (endokardiális határvonal identifikálásával) határozták meg. A krónikus szívelégtelen (HF) csoportba 40% alatti EF esetén választottuk be a pácienseket. Három hónapon belüli echokardiográfia eredményét abban az esetben fogadtuk el, amennyiben a beteg klinikai állapotában változás nem történt. Ellenkező esetben a szívultrahang vizsgálatot megismételtük. A szívelégtelen pácienseket betegségük etiológiája alapján iszkémiás (n=9) és nem iszkémiás (n=11) csoportra osztottuk. Minden esetben a korábban végzett koronarográfia eredménye elérhető volt.

Kontroll csoportnak normál szisztolés funkciójú önkénteseket választottunk (n=15). A kontroll csoport életkorban, test-tömeg index és a szív és érrendszeri rizikóstatusz (dohányzás, cukorbetegség, magasvérnyomás, iszkémiás szívbetegség) alapján megegyezett a szívelégtelen csoporttal. Kizárási kritériumok közé tartozott az inzulinnal kezelt cukorbetegség, a 3 hónapon belüli akut koronária szindróma, az agyi érkatasztrófa, vagy műtét. Szintén kizáró tényezőnek tekintettük az akut, krónikus gyulladós betegséget és a tumoros megbetegedést. A vizsgálatot a szükséges etikai engedéllyel (Semmelweis Egyetem - 7268-0/2011-EKU) és megfelelő írásbeli, szóbeli tájékoztatást követő írásbeli beleegyezés („tájékozott beleegyezés”) után végeztük.

A beválasztást követően minden páciensnél egy kérdőívet töltöttünk ki, amelyben felmértük demográfiai (életkor, nem, szociális helyzet) és általános egészségügyi státuszát (anamnézis, jelen panaszok, gyógyszeres terápia). Heti szinten legalább napi 1 cigaretta elszívása esetén a páciens dohányszórnak tekintettük. A testsúly és testmagasság méréseket rendszeresen ellenőrzött, kalibrált mérlegen végeztük, ami alapján számoltuk

ki a testtömeg indexet (BMI). A transztorakális echokardiográfia során meghatározásra kerültek a bal kamra végdiasztolés (LVEDD), végszisztolés átmérői (LVESD) és az ejekciós frakció.

4.2 Vaszkuláris funkció mérése ingadozó vércukorszintben

Az állatkísérlet során kipreparált mellkasi aortát 37°C-ra előmelegített 5% CO₂ és 95% O₂ keverékével buborékolgatott Krebs oldatos szervkádba helyeztük, aminek az összetétele NaCl 130mM, NaHCO₃ 14,9 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 1,6 mM, MgSO₄ 1,17 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, EDTA 0,026 mM, glukóz 11 mM volt. A mellkasi aortát megtisztítottuk a periadventiciális zsírszövettől és 2-3 mm-s érgyűrűket vágunk le. Az érgyűrűket izometriás erőmérőre (Hottinger Baldwin Messtechnik, Germany) helyeztük és az előfeszítést 1 g-nak megfelelő erővel végeztük. Egy órás ekvilibráció során 20 percenként cseréltük a szervkádakban a Krebs oldatot. A funkcionális integritás tesztelésére K⁺-ban gazdag Krebs oldatot használtunk mint depolarizáló oldatot. Növekvő fenilefrin koncentráció mellett mértük az érgyűrűk kontrakciós kapacitását (10^{-8} – 3×10^{-5} mol/l-es koncentrációtartományban). Ezután az érgyűrűk kontrakcióját 10^{-6} mol/l fenilefrinnel váltottuk ki, majd acetilkolin (1×10^{-8} – 3×10^{-5} mol/l) növekvő koncentráció által indukált relaxációs görbét vettünk fel. Növekvő dózisú nátrium nitroprussidot (1×10^{-8} – 1×10^{-5} mol/l) használtunk a simaizom NO iránti érzékenység ellenőrzésére. Minden csoportban 8-10 érgyűrűn megismételtük a fenti méréseket. A fenilefrin által kiváltott kontrakciós választ a K⁺ indukálta összehúzódáshoz viszonyított %-os értékben fejeztük ki. A relaxációt a fenilefrin által kiváltott előfeszítéshez képest vizsgáltuk.

4.3 Parthanatos jelei szövetekben

Szövetteni vizsgálatokat végeztünk a parthanatos jeleinek kimutatására. Az állatok feldolgozása során a kipreparált mellkasi aorta egyenes leszálló szakaszát vizsgáltuk. Minden állat esetében 4 db 2-3 mm hosszúságú érszakaszt izoláltunk. Ezek közül két ringen végeztük a miográfiás vizsgálatokat, a harmadik ring fixálásra került a további immunhisztokémiai elemzések céljából, a negyediket pedig fagyasztást követően a Western blothoz használtuk fel. A csontvelőből keneteket készítettünk.

4.3.1 *Immunhisztokémia*

A kipreparált mellkasi aortából paraffinos metszeteket készítettünk. A tirozin nitráció kimutatására nitrotirozin elleni poliklonális antitestet (nyúl, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; 1:80, 4°C, egy éjszakán keresztül) használtunk. A lipid peroxidáció mértékét a 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) elleni poliklonális antitesttel (nyúl, Calbiochem; 1:200, 4°C, egy éjszakán keresztül) határoztuk meg. A PARP aktivitás vizsgálatára az enzimreakció végtermékét, a PAR-t festettük meg (monoklonális egér antitest, Tulip Biolabs; 1:100, 4°C, egy éjszakán keresztül). 15 perces mikrohullámfőzéssel végeztük az antigén feltárását (0.1 mol/l citrát puffer, pH 3, főzés mikrohullámsütőben 15 percig). 15 %-os kecske/ló szérumos inkubáció során blokkoltuk az aspecifikus kötődéseket (egy órán át, szobahőmérsékleten). Ezt követően biotinizált egér elleni ló vagy nyúl elleni kecske másodlagos antitesteket (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 30 perc, szobahőmérséklet) adtunk a kenetekhez. Az immunreakciót tormaperoxidáz-konjugált avidin (30 perc, szobahőmérséklet) és nikkeldiaminobenzidin használatával (6 perc, szobahőmérséklet) tettük láthatóvá. A háttérfestést Nuclear Fast Red (NFR) kittel biztosítottuk.

A csontvelő keneteket metanolban fixáltuk, majd rehidrációt követően, a fentiek szerint NT és PAR elleni immunhisztokémiai festést végeztünk.

A kiértékelés fénymikroszkóppal történt nem ismerve a minta csoportját (Zeiss-Imager A1 fénymikroszkóp, 20x/0.45 és 40x/0.75 objektív, AxioCam MRc5 kamera; AxioVision – Rel. 4.8 software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). A HNE és az NT festődés mértékének meghatározására a szöveteken 1-10 skálát használtunk. Keneteken az NT pozitív sejtek arányának megállapításához legalább 300 sejt kiértékelését végeztük. PAR festés esetén szintén vakon vizsgáltuk a mintákat egy szemikvantitatív módszerrel:

- 1 pont: nincs festődés,
- 2 pont: gyenge citoplazma festődés,
- 3 pont: erős citoplazma festődés,
- 4 pont: citoplazma festődés mellett néhány pozitív sejtmag,
- 5 pont: közel a sejtmagok 50%-a pozitívan festődik,
- 6 pont: közel a sejtmagok 75%-a pozitívan festődik,
- 7 pont: általános sejtmag festődés néhány negatív sejt mellett,

- 8 pont: minden sejtmag pozitív,
- 9 pont: erős festődés minden sejtmagban,
- 10 pont: nagyon erős festődés minden sejtmagban.

4.3.2 *Western blot analízis*

Az állatok aortáit Teflon homogenizátorban készítettük elő. A fehérje lízis puffer oldat 20 mmol/l TRIS–HCl (pH 7,5), 1 mmol/l EGTA és 1 µl/ml proteáz inhibitor tartalmazott (Sigma). 4°C-n, 10 percig, 700 g mellett centrifugáltuk a homogenizátumokat. A felülúszó frakciót leszedtük, és ezt használtuk Western blot analízisre. A gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) protokollja szerint 10-15% nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) alapján szeparáltuk a fehérjéket. Ezt követően a szeparált fehérjéket polivinildén fluorid (PVDF) membránra blottoltuk (2 órán át, 200 V feszültségen, Xcell II blott Invitrogen). A fehérje transzfer után a PVDF membránokat szobahőmérsékleten, egy órán keresztül blokkoló pufferben (TRIS puffer, zsírszegény tej) inkubáltuk, majd kimostuk (TBS/0,05%, Tween 20). A megjelölés céljára PAR elleni primer, monoklonális antitestekkel végeztük az inkubációt (Calbiochem, San Diego, CA, USA, 1:2000, 4°C, egy éjszakán keresztül). Majd tormaperoxidázzal konjugált egér elleni szekunder elleni antitestet adtunk hozzá (1:2000, egy óra, szobahőmérséklet). Az enzimreakciót kemilumineszcens reagens segítségével vizualizáltuk (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). A denzitometriás értékeléshez ImageJ software-t (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) használtunk.

4.4 Parthanatos markerei véralkotókban

Az állatkísérlet esetében az elaltatáskor, a humán vizsgálat során a bevásztáskor, éhgyomor mellett vettünk vért. A vérvételt követően azonnal izoláltuk a leukocitákat és keneteket készítettünk. A festéseket minimum 20 eset megléte esetén végeztük, hogy a festési protokolltól történő minimális eltérések lehetőségét is csökkenteni tudjuk.

4.4.1 *Biokémia*

A humán vizsgálat során az általános labor paraméterek (vérkép, glukóz, máj funkció, vesefunkció, ionok) mellett meghatározásra kerültek a C-reaktív protein (CRP)

és az N-terminális B-típusú nátriuretikus peptid (NT-proBNP). A CRP és NT-proBNP értékét immunkémiai módszerrel határozták meg a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinika laborjában (Cobas Integra 400 Plus és Cobas E411; Roche, Basel, Svájc).

A páciensek EDTA-s plazma mintáiból a totál peroxid szint (plazma peroxidáció: PRX) meghatározására Oxystat vizsgálatot (Biomedica, Bécs, Ausztria) végeztünk. 12 krónikus szívelégtelen és 11 kontroll minta volt elérhető a PRX vizsgálatra. A mérések során a gyártó cég instrukcióit követtük. Továbbá meghatároztuk a teljes antioxidáns kapacitást (TAC- OxiSelect™ TAC kit, Cell Biolabs, San Diego), az eredményeket CRE ($\mu\text{mol copper reducing equivalent}$) egységben fejeztük ki. TAC vizsgálat esetén 19 szívelégtelent és 15 kontrollt tudtunk megvizsgálni. A kialakuló színreakciókat spektrofotométerrel értékeltük (BioTek, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Az oxidatív stressz indexet (OSI) a totál peroxid és a TAC arányából számítottuk ki.

4.4.2 Immunológia

4.4.2.1 Immunhisztokémia

A humán vizsgálat során grádiens centrifugálással (Histopaque-1077, Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, USA) izoláltuk a keringő mononukleáris leukocitákat. A leukocita keneteket metanolban fixáltuk. Technikai negatív kontrollnak primer antitest nélküli festéseket végeztünk, pozitív kontrollnak egy órán keresztül, szobahőmérsékleten hagyott, indukált vérmintákat használtunk. A korábban taglalt immunhisztokémiai fejezetben leírtakhoz hasonlóan a lipidperoxidáció kimutatására HNE elleni poliklonális antitestet (nyúl, Abcam, Cambridge, UK; 1:200, 4°C, egy éjszakán keresztül), a nitrotirozin kimutatására NT elleni poliklonális antitestet (nyúl, Millipore, Temecula, CA, USA; 1:80, egy éjszakán keresztül), PAR festésére monoklonális antitestet (egér, Tulip, West Point, PA, USA; 1:500, egy éjszakán keresztül, 4°C) és az AIF jelölésére poliklonális antitestet (nyúl, Millipore; 1:100, 4 °C, egy éjszakán keresztül) használtunk. AIF transzlokáció vizsgálatára 13 kontroll és 11 szívelégtelen minta volt elérhető. Másodlagos jelölésre biotinizált egér és nyúl antitesteket tettünk a kenetekre (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A HNE vizualizálására a barna festődésű diaminobenzidin (DAB) komplexet, míg a NT, a PAR és az AIF kimutatására a fekete festődésű nikkel tartalmú DAB-ot adtunk az avidin-tormaperoxidáz mellé. A HNE esetében kék hematoxylin, míg a NT, a PAR és AIF esetén

Nuclear Fast Red adta a háttérret.

A keneteket fénymikroszkóp (Zeiss-Imager A1 fénymikroszkóp, 20x/0,45 és 40x/0,75 objectív, AxioCam MRc5 kamera) és AxioVision – Rel. 4,8 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) segítségével lefényképeztük. A HNE és NT esetében a pozitívan festődött sejtek területének %-os arányát adtuk meg, a PAR és AIF értékelésénél a pozitívan festődött sejtmagok %-át vizsgáltuk. PAR esetében ez a pozitívan festődő területek %-s meghatározását jelenti (HNE és NT kiértékeléséhez hasonlóan), viszont az AIF esetében a pozitívan festődő sejtek %-s arányát definiáltuk. Minden esetben kenetenként legalább 300 sejtet értékeltünk (MBFImageJ, NIH, Bethesda, MA, USA).

4.4.2.2 Áramlásos citometria

A fenti fejezetben leírtakhoz hasonlóan a leukocitákat grádiens centrifugálással izoláltuk (Histopaque-1083, Sigma, Saint Louis, MO, USA). Fixációt és permeabilizációt (Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) követően PAR elleni monoklonális, primer antitesteket (egér, 1:100, 30 min, 4°C; Tulip Biolabs, West Point, PA, USA) használtunk. A primer antitest izotípus kontrollja tisztított IgG3 κ anti-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) antitest volt. Másodlagos jelölésre fluoreszcens (FITC konjugált) egér elleni poliklonális antitestet (1:500, 30 min, 4°C; Beckton Dickinson) használtunk. Az áramlásos citometriai méréseket FACS Calibur rendszeren (Becton Dickinson) végeztük. A sejtek fluoreszcens festődését a limfocitákra jellemző előre irányuló fényszórás (*forward scatter, FSC*) és oldalirányú fényszórás (*side scatter, SSC*) jelei alapján meghatározott R1 tartományon belül vizsgáltuk.

4.5 Statisztika

Normál eloszlás esetén átlag, szórás vagy standard error értékeket, illetve nem normál eloszlású változók ábrázolásakor medián és kvartiliseket használtunk. A statisztikai modellek használata előtt logaritmizáltuk a nem normál eloszlást mutató paramétereket (CRP, pro-BNP, HNE, NT, PAR, AIF). Több kísérleti csoport összehasonlítására egy illetve két-utas ismétléses ANOVA-t (érfunkciós vizsgálatok), valamint Tukey és Bonferroni-féle post hoc tesztet végeztünk. A vizsgálati alanyok

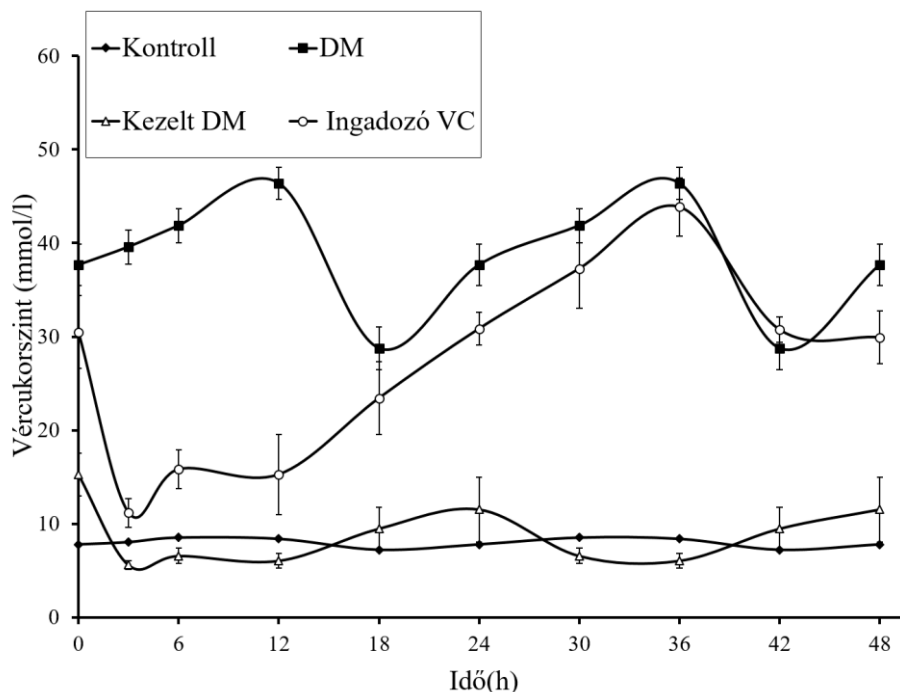
jellemzőit 2 mintás Student-féle t-próba segítségével hasonlítottuk össze. A kategorikus változók (nem, dohányzás, diabétesz mellitusz, magasvérnyomás betegség, koronária betegség) eloszlását Khi-négyzet próbával értékeltük. A klinikai paraméterek és a parthanatos jelei közötti összefüggést Pearson-féle korrelációval és lineáris regressziós modell használatával jellemeztük, továbbá a szívelégtelenség csoporton belül több változós regressziós módszert is alkalmaztunk. A szignifikancia határát minden esetben $p < 0,05$ szerint határoztuk meg (SPSS 22.0, Graphpad Prism 6.01 és StatMate szoftverek).

5. Eredmények

5.1 Endotél károsodás mértékének felmérése ingadozó vércukorszintben

5.1.1 Vércukorszint ingadozások experimentális állatmodellben

Az experimentális vizsgálat során 4 csoportot hoztunk létre, melyekben különböző vércukor profilt tudtunk kialakítani. Tekintettel az ad libitum etetésre és meghagyott saját inzulin termelésre, szignifikáns csoportszintű posztprandiális jellegű vércukor kiugrásokat nem tapasztaltunk. A kontroll csoport vércukor szintje minimális cirkadián ritmust mutatott $7,2\pm 0,8$ mmol/l és $8,5\pm 0,3$ mmol/l között. A terápiában nem részesülő cukorbeteg állatmodell vércukor szintje markánsan fluktuált $28,8\pm 5,6$ mmol/l és $46,4\pm 4,2$ mmol/l között. A kezelt DM állatmodell vércukor profiljában, hasonlóan a kontroll csoporthoz, csekély változásokat mértünk $5,6\pm 1,1$ mmol/l és $11,5\pm 8,4$ mmol/l között. Bár ez a fluktuáció az inzulin adagolásának volt köszönhető, és nem követte az egészséges modellben tapasztalt cirkadián ritmust. Az ingadozó vércukorszintű modellben $11,3\pm 1,5$ és $43,4\pm 3,1$ mmol/l közötti értékeket tapasztaltunk (11. ábra).

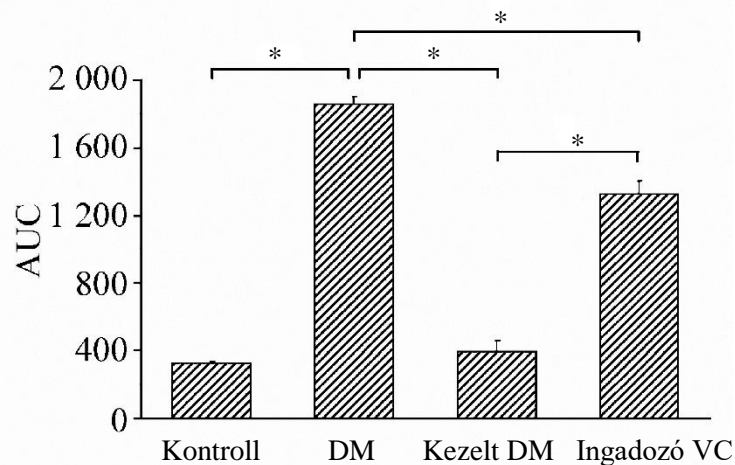


11. ábra: Vércukor profilok ábrázolása

10 nap inzulin terápia után 48 órán keresztül monitoroztuk a vércukorszintet 6 óránkénti mintavétellel. 4 csoport került kialakításra: a kontroll csoport, a magas

vércukorértékeket mutató, kezeletlen cukorbeteg csoport (DM), az alacsony vércukor szinttel jellemezhető, adekvát kezelésben részesülő csoport (kezelt DM), és az ingadozó vércukor profilt mutató modell (ingadozó VC). Értékeket átlag±standard error formában ábrázoltuk.

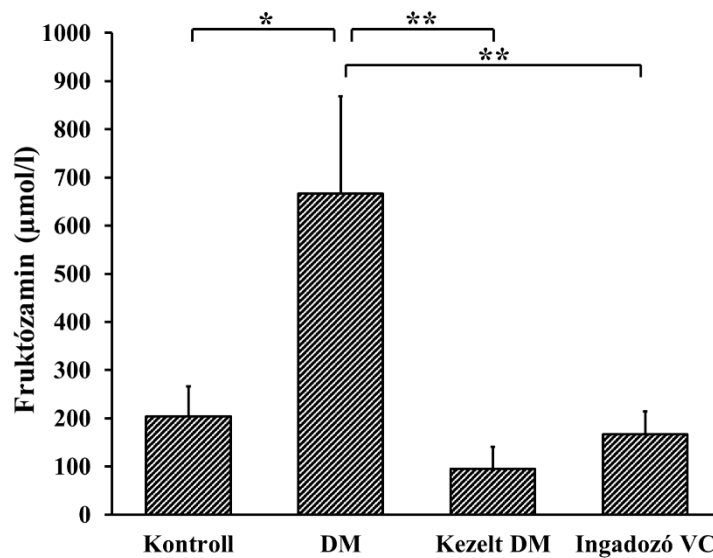
A kezeletlen cukorbeteg csoport vércukorszint görbe alatti területe (AUC) szignifikánsan nagyobb volt a másik három csoportnál. (1856±44 vs. kontroll: 382±8, kezelt DM: 399±62, ingadozó vércukorszint: 1323±73, $p<0,001$) Továbbá az ingadozó vércukorszint modellben az AUC mértéke szignifikánsan emelkedettebb volt, mint a kezelésben részesülő cukorbeteg modellben ($p<0,001$). A kezelt DM és a kontroll csoport között jelentős különbséget nem találtunk (12. ábra).



12. ábra: Vércukorszint görbe alatti területének (AUC) összehasonlítása a 4 experimentális csoportban

A kezeletlen cukorbeteg csoportban volt látható a legnagyobb AUC érték összehasonlítva a többi csoporttal szemben. A kezelt DM és az ingadozó VC modell között szintén szignifikáns különbséget találtunk. Az ábra jól tükrözi, hogy az ingadozó VC modell szignifikánsan emelkedett volt a kezelt DM csoporthoz képest, de a kezeletlen DM értékéhez képest jelentősen alacsonyabb volt. Értékeket átlag±standard error formában ábrázoltuk. * $p<0,001$

A kezeletlen cukorbeteg csoportban mért fruktózamint szignifikánsan nagyobbak találtuk, mint a kontroll csoportban ($709 \pm 162 \mu\text{mol/l}$ vs. $204 \pm 63 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$). A kezelt cukorbeteg csoportban és az ingadozó vércukorszint modellben pedig alacsonyabb fruktózamin szinteket mértünk a kezeletlen cukorbeteg értékekhez képest. ($709 \pm 162 \mu\text{mol/l}$ vs. $95 \pm 45 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$ és $166 \pm 49 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$). A fruktózamin és az AUC közötti Pearson koefficiens $0,72$ volt, $p < 0,001$. A kezelt DM és a kontroll csoport között szignifikancia nem volt látható (13. ábra).



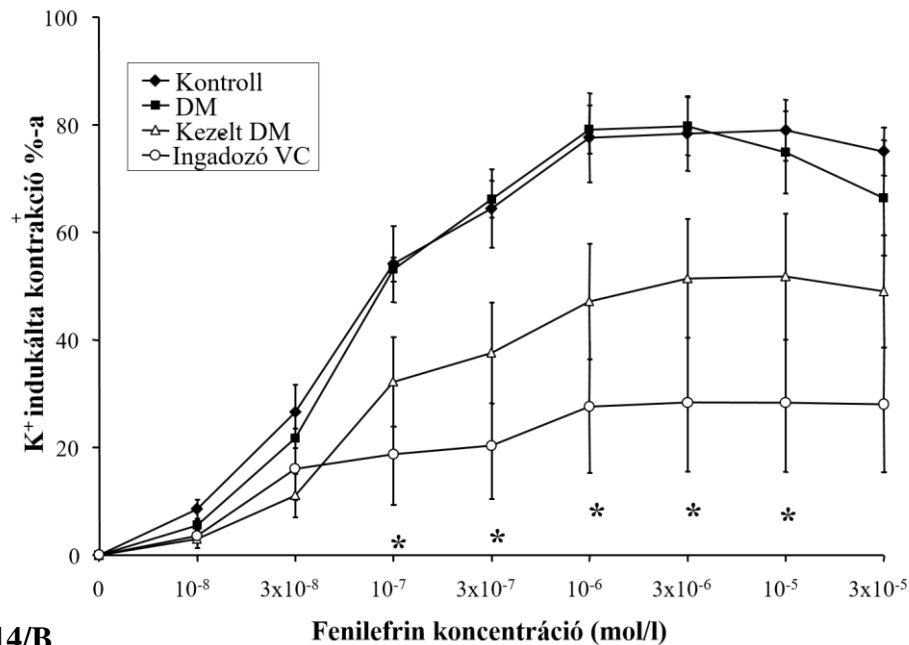
13. ábra: Experimentális vizsgálatban mért fruktózamin szintek

A kezeletlen cukorbeteg csoportban volt látható a legnagyobb érték és az inzulin terápia szignifikánsan csökkentette a kialakított vércukorprofiltól függetlenül. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

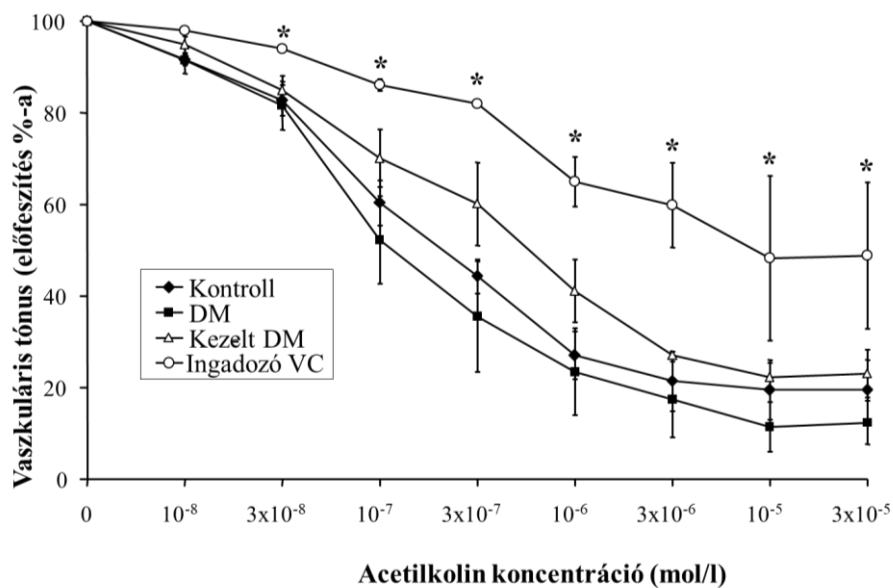
5.1.2 Endotél függő relaxáció és az ingadozó vércukorszint közötti összefüggés

Az ingadozó vércukorszint esetében jelentős csökkenést találtunk mind a fenilefrin által kiváltott kontrakcióban, mind az endotél függő relaxációban. A NO donorként szolgáló nitroprusszid adásával a relaxáció megtartott volt. Ezáltal a relaxáció károsodása az endotél diszfunkció okozta NO csökkent termelésével magyarázható és nem a vaszkuláris simaizom NO-ra adott csökkent relaxációs képességével (14. ábra).

14/A



14/B

**14/A ábra: Fenilefrin által kiváltott vaszkuláris kontrakciók**

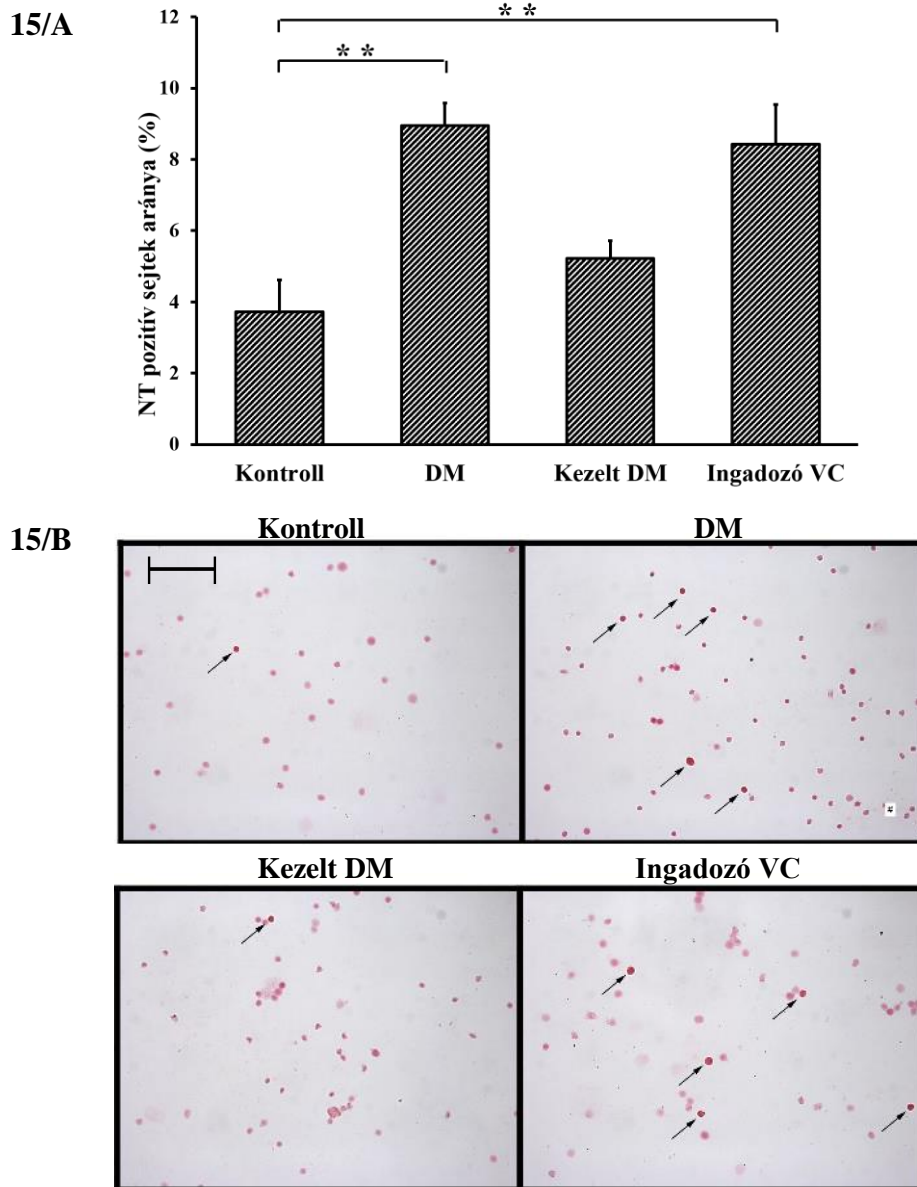
A kontroll és az ingadozó vércukor szintű patkányok mintái között szignifikáns különbséget találtunk. Értékeket átlag±standard error formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$ ingadozó VC vs. kontroll

14/B ábra: Acetilkinin által kiváltott endotél függő relaxáció

Szignifikáns csökkenést mutattak az ingadozó VC mintái a kontrollhoz képest. Értékeket átlag±standard error formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$ ingadozó VC vs. kontroll

5.1.3 Oxidatív-nitratív stressz jelei csontvelőben és endotélben

A csontvelő immunhisztokémiai analízise során a kezeletlen cukorbeteg és az ingadozó vércukor modellben találtunk kifejezetten NT pozitív sejteket a kontroll csoporthoz képest ($8,9\pm 0,6\%$ és $8,4\pm 0,6\%$ vs. $3,7\pm 0,9\%$, $p<0,01$) (15. ábra).



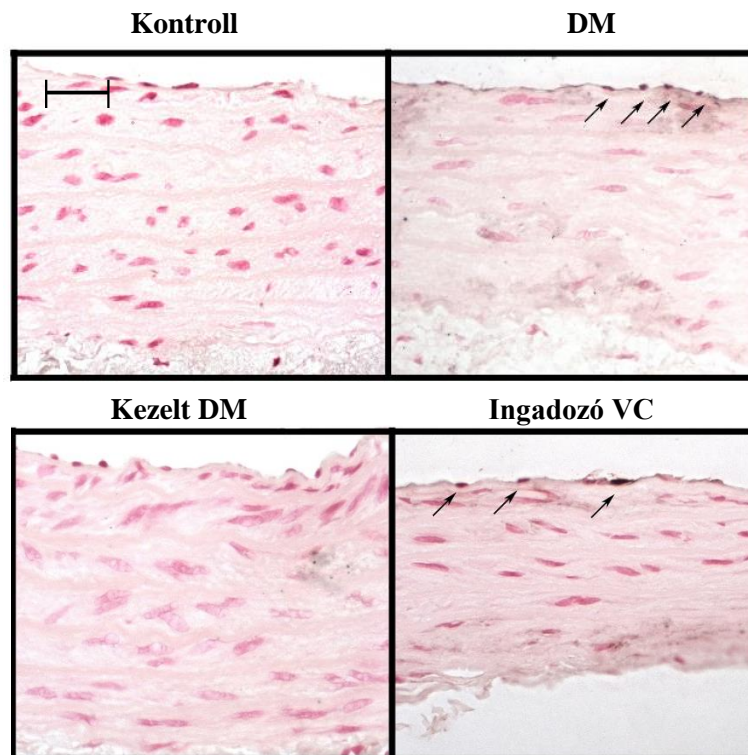
15/A ábra: Csontvelő nitrotirozin festésének eredménye

NT pozitív sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt a DM és az ingadozó vércukor csoportban. Értékeket átlag±standard error formában ábráztuk. $**p<0,01$ vs. kontroll csoport.

15/B ábra Csontvelő NT festés reprezentatív bemutatása

A fekete sejtek mutatják a pozitív festődést, Nuclear Fast Red adja a piros háttérfestést. A Kontroll festés mikroszkópos képén feltüntetett hossz mértékegység $50\ \mu\text{m}$. Nyilak NT pozitív sejtekre mutatnak rá.

Az endotél festése alapján az ingadozó vércukor szintű állatok mintáit markáns lipidperoxidáció jellemezte, de a szignifikancia határát nem érte el (kontroll: $3,4 \pm 0,3$, cukorbeteg: $5,1 \pm 1,3$, kezelt cukorbeteg: $4,3 \pm 1,2$, ingadozó vércukor: $5,5 \pm 1,3$). A NT festődése szintén kifejezett volt az ingadozó vércukor csoportban, bár szignifikáns eltérést nem mutatott (16. ábra).



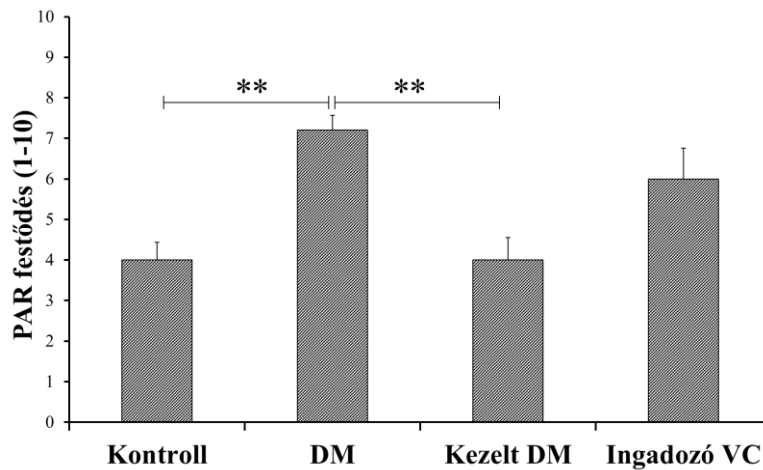
16. ábra: Endotél NT festés reprezentatív bemutatása

A DM és az ingadozó VC csoportban volt látható a jelentősebb fekete festődésű NT pozitivitás, de a szignifikancia határát nem érte el. Hosszmértékegység $50 \mu\text{m}$, nyilak az NT pozitív sejtekre mutatnak rá.

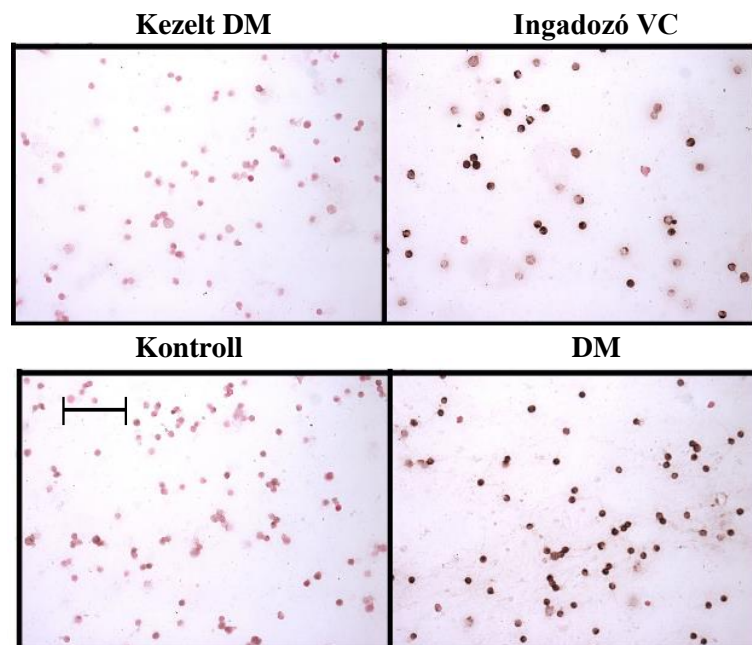
5.1.4 PARP aktiváció szövetekben és keringő leukocitákban

A csontvelő PAR festése során a legjelentősebb aktivációt a DM csoportban tapasztaltuk. A kezelt DM állatmodellben a PAR pozitivitás szignifikánsan csökkent a kezeletlen DM csoporthoz képest. Ugyanakkor az ingadozó VC mintái között a DM csoporthoz hasonló PAR pozitivitást találtunk, de a kontrollhoz képest a szignifikancia határát nem érte el (17. ábra).

17/A



17/B



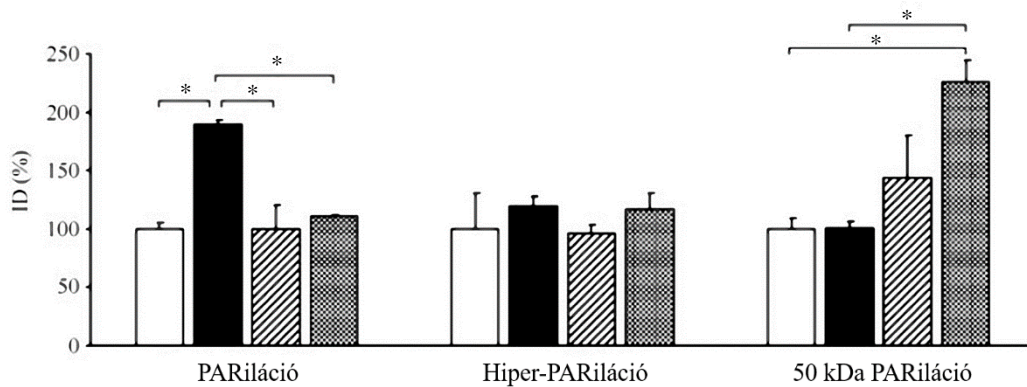
17/A ábra: Csontvelő PAR festődése

A legjelentősebb PARP aktivitást a kezeletlen DM csoportban találtunk. Az inzulin terápia szignifikánsan csökkentette a PARP aktivitást a kezelt DM mintáiban. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk. ** $p < 0,01$

17/B ábra: Csontvelő PAR festés reprezentatív bemutatása

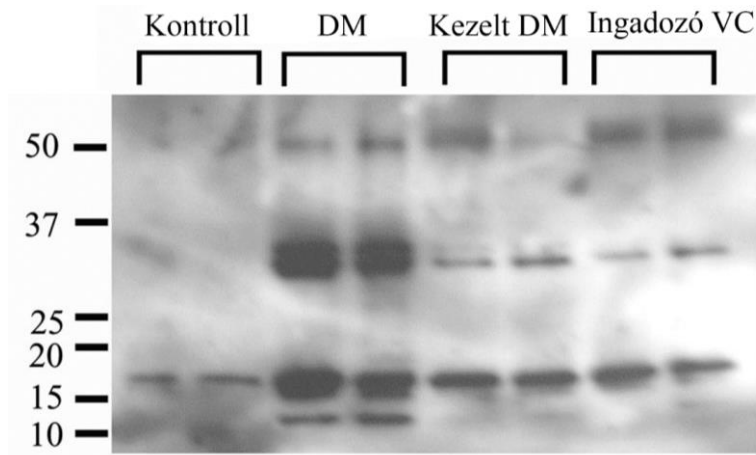
Markáns fekete festődés a DM és az ingadozó VC csoportban látható, bár az utóbbiban a szignifikancia határát nem érte el. A Kontroll festés mikroszkópos képén feltüntetett hossz mértékegység 50 μm .

Az aorta fal western blot analízise során a legkifejezettebb fehérje PARiláció a kezeletlen cukorbeteg állatokban volt látható és az inzulin kezelés módjától függetlenül szignifikánsan alacsonyabb PARilációt tapasztaltunk mind a kezelt DM csoportban, mind az ingadozó VC csoportban. A hiperpariláció a PARP túlaktivációjára utal, ami során hosszú ADP ribóz polimerek szintetizálódnak, és a Western blott vizsgálat során a nagy molekulású sávban válnak láthatóvá. A hiperPARiláció szintjében mindegyik csoportban hasonló értékeket kaptunk, de egy 50 kDa poliADPribozilált sávban az ingadozó VC csoport jelentősen erősebb aktivitást mutatott (19. ábra, 20. ábra).



19. ábra: Aorta fal Western blott analízisének denzitometriás kiértékelése

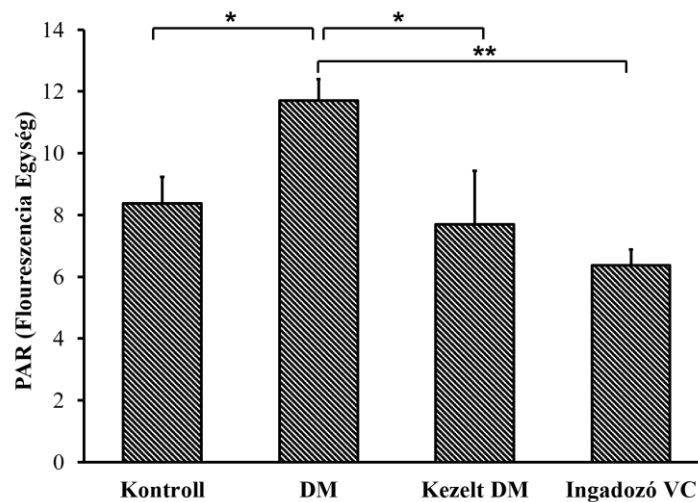
Kifejezett PARP aktivitás a kezeletlen DM csoportban volt látható. Annak ellenére, hogy a hiperPARiláció szintjében nem volt látható jelentős különbség, az 50 kDa sávban az ingadozó VC csoport mutatott jelentősebb aktivitást a kezeletlen cukorbeteg mintáihoz képest. 113 kDa alatti sávban látható a hipopariláció, ami néhány tagú PAR jelenlétére utal, ezáltal a PARP csökkent aktivitását jelenti. ID: relatív denzitás, amiben 100 %-nak a kontroll csoportot tekintettük, fehér oszlop: kontroll csoport, fekete oszlop: DM, vonalás oszlop: kezelt DM, szürke oszlop: ingadozó VC, Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$



20. ábra: Aorta fal Western blot reprezentatív mintái

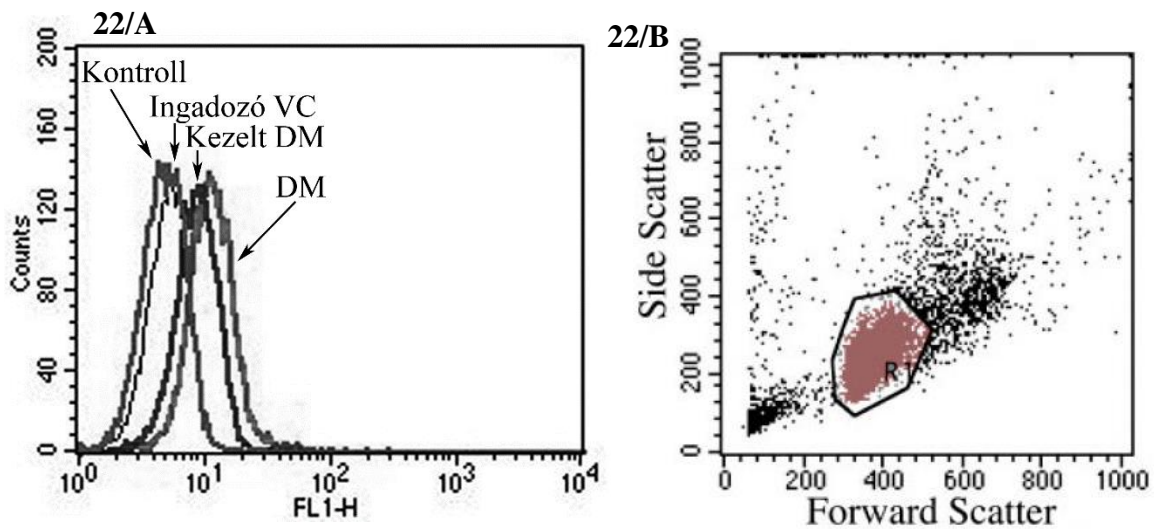
Az ingadozó VC csoport fokozott PARilációja figyelhető meg az 50 kDa fehérjék magasságában.

Az áramlásos citometria mérései alapján a kezeltlen cukorbetegek keringő leukocitáiban volt a legkifejezettebb PARP aktivitás. Az inzulin terápia viszont csökkentette a PARP aktivitását függetlenül a terápia módjától, vagyis hogy jól kezelt DM-et vagy ingadozó vércukorszintet alakított-e ki (21. ábra, 22. ábra).



21. ábra: Keringő leukociták áramlásos citometria mérései

R1 (limfocita) sejtek átlag fluorezensz intenzitása azt mutatja, hogy a DM csoportban szignifikáns PAR jelzés volt látható, ami a kezelt DM és ingadozó vércukor csoport mintáiban jelentősen csökkent. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



22/A ábra: PAR jelzésű leukociták reprezentatív ábrázolása

FL1-H mutatja a fluoreszencia intenzitását, „Counts” pedig a jelzést mutató sejtek számát jelenti.

22/B ábra: Áramlásos citometria kapuzási képe

A limfocitákra jellemző előre irányuló fényszórás (forward scatter, FSC) és oldalirányú fényszórás (side scatter, SSC) jelei alapján határoztuk meg a R1 régiót.

5.2 Szívelégtelenséget jellemző paraméterek és a parthanatos közötti korreláció

5.2.1 Klinikai paraméterek a szívelégtelenség kontroll csoportos vizsgálatában

20 krónikus szívelégtelen (HF) páciens mellé életkorban és test/tömeg indexben megfelelő 15 kontroll alanyt választottunk be a vizsgálatunkba. A csoportok nemi megoszlása hasonló volt. Magasvérnyomás betegség, iszkémiás szívbetegség, cukorbetegség (2-es típusú diabétesz mellitusz) és dohányzási szokások tekintetében szignifikáns különbséget nem találtunk a két csoport között. Az aspecifikus gyulladási marker (CRP) vizsgálatában sem volt szignifikáns különbség. A pro-BNP szignifikánsan magasabb volt a szívelégtelenség csoportban. Habár a kontroll csoport medián pro-BNP értékét kissé magasabbnak találtuk az Európai Kardiológiai Társaság által kijelölt kizárási cut-off értéknél (125 pg/ml), ezen betegek a szívelégtelenség további diagnosztikus jellemzőivel már nem rendelkeztek. Ennek megfelelően a kissé emelkedett pro-BNP érték háttérében extrakardiális etiológiát valószínűsítettünk (1. táblázat). A szívelégtelen

csoporton belül egyedül a koronária betegség (ISZB) jelenléte alapján találtunk szignifikáns különbséget a bal kamrai végdiasztolés diaméterek (HF ISZB nélkül: $68,6 \pm 10,6$ mm vs. HF ISZB mellett: $54,2 \pm 3,5$ mm, $p < 0,05$) és a bal kamrai végszisztolés átmérők között (HF ISZB nélkül: $59,5 \pm 9,9$ mm vs. HF ISZB mellett: $45,4 \pm 3,8$ mm, $p < 0,05$).

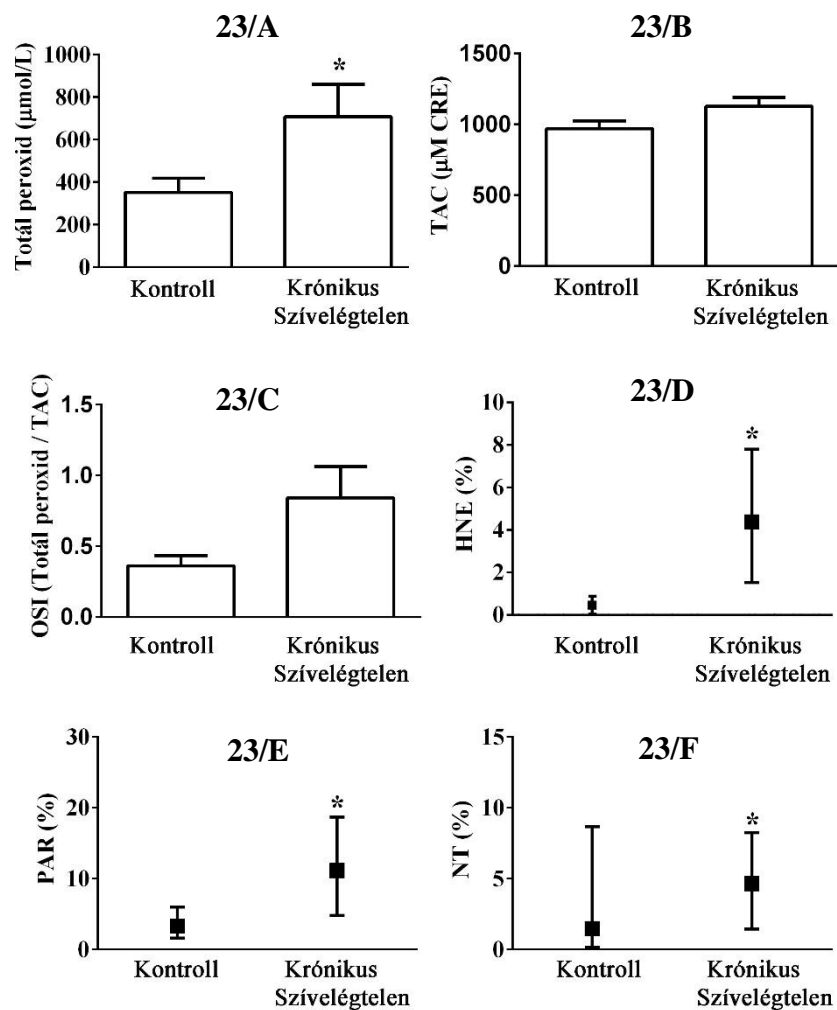
1. táblázat: Klinikai paraméterek összehasonlítása

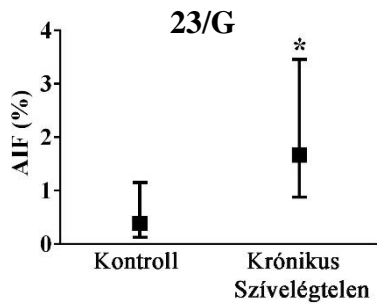
Az alanyok bevonása során a krónikus szívelégtelen csoport mellé az anamnézis figyelembe vételével került beválasztásra az életkorban, testsúlyban megegyező kontroll csoport. A szívelégtelenségre jellemző utrahangos és labor paraméterekben szignifikáns különbség volt látható. Az értékeket átlag \pm standard deviáció (SD) és medián \pm kvartilis terjedelemben ábrázoltuk. A táblázat szürke zónái jelzik a szignifikanciát.

	Kontroll	Krónikus Szívelégtelenség (HF)	Sign.
Alanyok (n)	15	20	
Nem: férfi/nő (n)	13/2	16/4	n.s.
Életkor (év), átl.\pmSD	63,3 \pm 9,4	68,9 \pm 8,0	n.s.
Testtömeg index (kg/m²), átl.\pmSD	28,9 \pm 3,3	27,9 \pm 4,9	n.s.
EF (%), átl.\pmSD	60,0 \pm 5,3	24,9 \pm 5,9	p<0,01
LVEDD (mm), átl.\pmSD	48,2 \pm 4,6	63,0 \pm 11,1	p<0,01
LVESD (mm), átl.\pmSD	31,4 \pm 5,1	54,0 \pm 10,6	p<0,01
Pro-BNP (pg/mL), medián [kvartilis]	148,4[47,9; 178,0]	2338,5[1475,6; 4597,5]	p<0,01
CRP (mg/L), medián [kvartilis]	5,0[1,3; 6,1]	2,6[1,5; 4,9]	n.s.
Dohányzás (n)	1	3	n.s.
Diabétesz mellitusz (n)	2	4	n.s.
Magasvérnyomás betegség (n)	13	19	n.s.
ISZB (n)	3	9	n.s.

5.2.2 Parthanatos markerei a véralkotókban

A szívelégtelen csoportban a PRX szignifikánsan nagyobb értéket mutatott a kontroll csoporthoz képest. A TAC kiértékelése és az OSI kalkulációja során a HF csoportban magasabb értékeket mértünk, de a szignifikancia határát nem érték el (TAC $p=0,066$, OSI $p=0,059$). A plazma peroxidáció eredményeihez hasonlóan a fehérvérsejtek HNE festése során a celluláris oxidatív stressz mértékét a szívelégtelenség csoportban találtuk szignifikánsan nagyobbak. Továbbá a NT festődése is jelentősen ($p<0,05$) markánsabb volt a HF páciensek között. A PARP működését jelző PAR festése során szintén a szívelégtelen csoportban mértünk jelentős enzim aktivitást. Ezenfelül a HF csoportban az AIF pozitív sejtek száma is jelentősen nagyobb volt (23. ábra, 24. ábra).





23. ábra: Parthanatos jelei a véralkotóban

23/A ábra: Plazma totál peroxid szignifikánsan magasabb volt a krónikus szívelégtelen csoportban. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$

23/B ábra: A TAC szintjében nem volt jelentős különbség a 2 csoport között. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk.

23/C ábra: A totál peroxid és a TAC hányadosából kalkulálható az oxidatív stressz index, ami szintén nem mutatott különbséget a vizsgált csoportok között. Értékeket átlag+standard error formában ábrázoltuk.

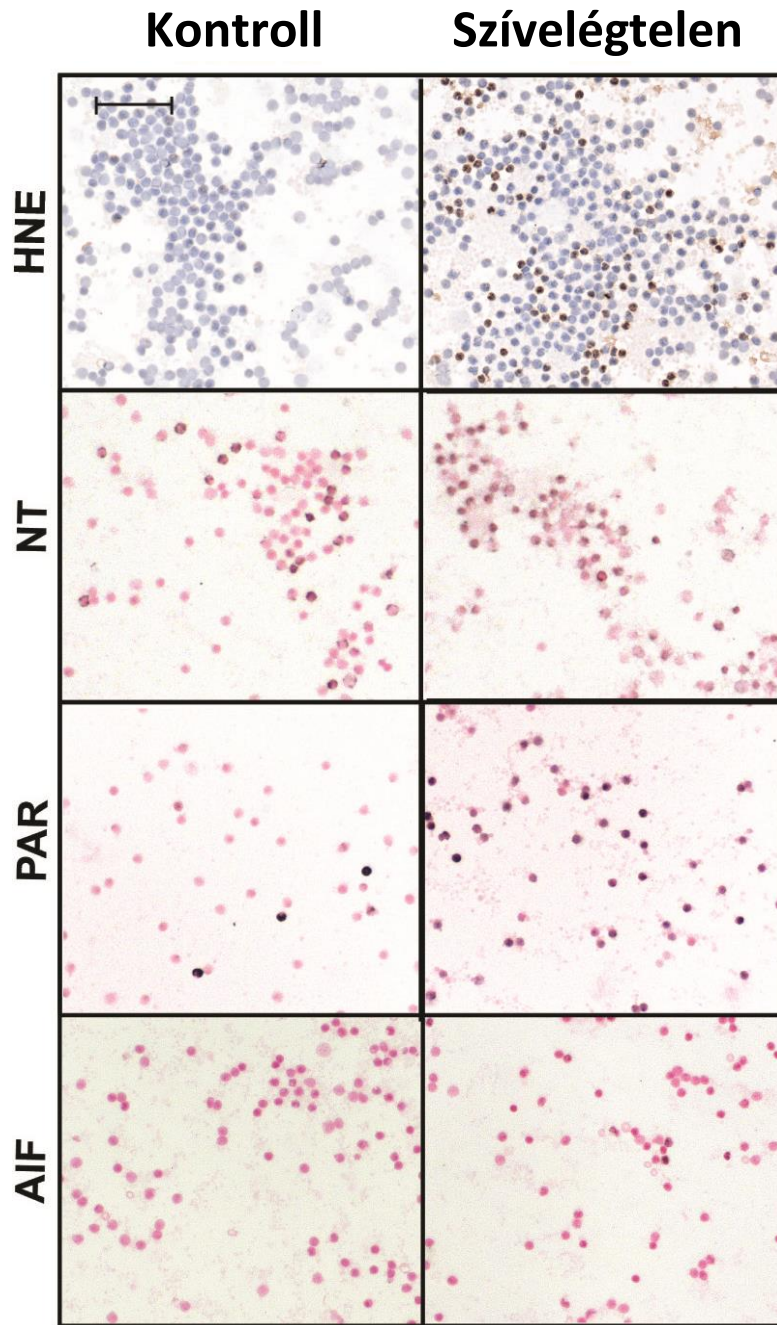
23/D ábra: HNE % aránya a teljes celluláris területhez viszonyított pozitívan festődő területek arányát fejezi ki. A celluláris oxidáció szignifikánsan magasabb volt a szívelégtelen csoportban. Értékeket medián, interkvartilis terjedelem formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$

23/E ábra: PAR festődés elemzése során szintén a teljes celluláris területhez viszonyított pozitívan festődő területek arányát tüntettük fel. A szívelégtelen csoportban szignifikáns PARP aktivációt tudtunk kimutatni. Értékeket medián, interkvartilis terjedelem formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$

23/F ábra: A nitratív stressz mértékét ugyanúgy a teljes celluláris területhez viszonyított pozitívan festődő terület %-s arányában határoztuk meg. A HF csoportban jelentős nitratív festődés volt látható. Értékeket medián, interkvartilis terjedelem formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$

23/G ábra: AIF % a pozitívan festődő sejtmagok számának arányát jelenti az összes sejtmaghoz képest. A kiértékelés során a krónikus szívelégtelen csoportban szignifikáns AIF transzlokációt mutattunk ki. Értékeket medián, interkvartilis terjedelem formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$

24. ábra



24. ábra: HNE, NT, PAR és AIF immuncitokémiai festések reprezentatív mikroszkópos képei

A specifikus festődést HNE esetében barna, míg a többi festés esetében fekete DAB biztosította. HNE festés esetén a kék színű hematoxilint, míg a NT, PAR és AIF festésnél a piros Nuclear Fast Red háttérfestést használtunk. A felvételeket 40x0,75 objektív mellett beállított fénymikroszkóppal készítettük, a feltüntetett hossz mérték 50 μm -t mutat.

5.2.3 Parthanatos és a szívelégtelenség paramétereinek közötti korreláció

A szívelégtelenség paramétereinek (pro-BNP, EF) és a parthanatos jellemzői (oxidatív-nitratív stressz, PARP aktiváció, AIF transzlokáció) közötti korrelációt megvizsgáltuk mind a teljes vizsgálati csoportban, mind a szívelégtelenség csoportban.

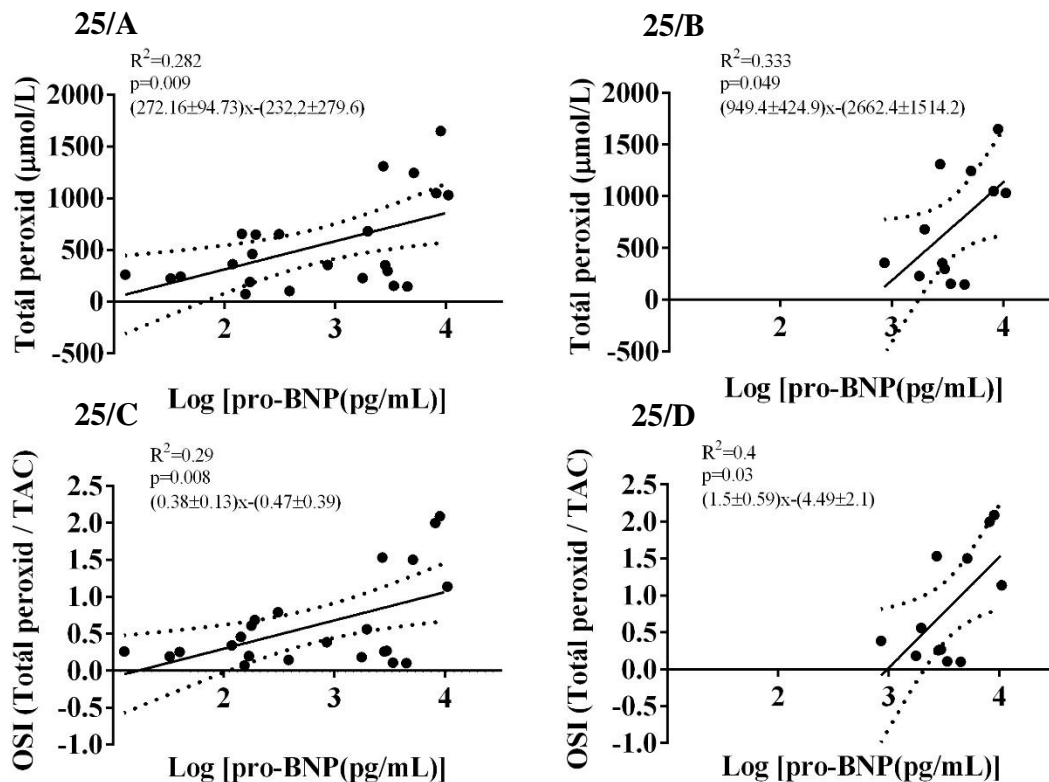
A teljes vizsgálati csoportban a pro-BNP szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a PRX értékkel, OSI-el, fehérvérsejt HNE festéssel, tirozin nitrációval, PARP aktivitással és az AIF transzlokációjával (2. táblázat). Ugyanezen paraméterek az EF vizsgálata során pedig negatív korrelációt mutattak.

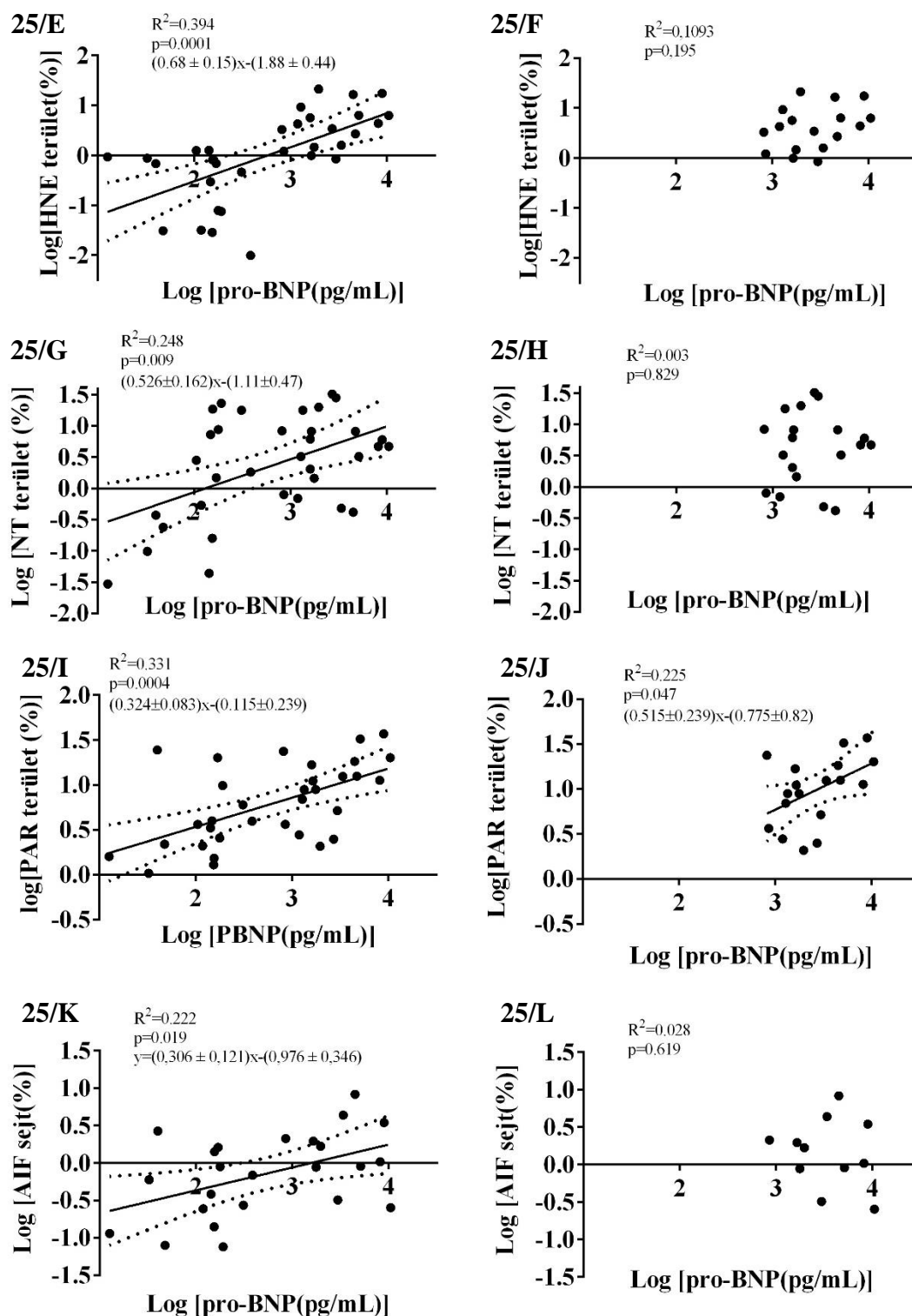
2. táblázat: A parthanatos és szívelégtelenség markerei közötti korrelációs eredmények
A teljes vizsgálati csoport esetén a TAC kivételével minden esetben negatív korreláció volt látható az EF-val és pozitív korrelációt találtunk a pro-BNP értékével. A szívelégtelen csoporton belül a totál peroxid, az oxidatív stressz index és a PAR festődés esetén volt kimutatható szignifikáns összefüggés a pro-BNP értékével. A folyamatos változók között Pearson korrelációt végeztünk. A nem normál eloszlású változók esetén logaritmizáltuk a paramétereket az analízis előtt. A táblázat szürke zónái jelzik a szignifikanciát. R: Pearson koefficiens; p: szignifikancia; N: esetszám

		Teljes vizsgálati csoport		Szívelégtelen csoport	
		EF (%)	log[pro-BNP(pg/mL)]	EF (%)	log[pro-BNP(pg/mL)]
Totál peroxid (µmol/L)	R	-0,458	0,531	-0,245	0,577
	p	0,028	0,009	0,444	0,049
	N	23	23	12	12
TAC (µmol CRE)	R	-0,244	0,142	0,226	-0,412
	p	0,165	0,424	0,351	0,08
	N	34	34	19	19
OSI (Totál peroxid/CRE)	R	-0,466	0,537	-0,339	0,630
	p	0,025	0,008	0,291	0,028
	N	23	23	12	12
Log[HNE terület(%)]	R	-0,682	0,628	0,336	0,331
	p	0,00002	0,0001	0,187	0,195
	N	32	32	17	17

Log[NT terület(%)]	R	-0,368	0,497	-0,213	0,051
	p	0,032	0,009	0,381	0,836
	N	34	34	19	19
Log[PAR terület(%)]	R	-0,466	0,576	-0,004	0,474
	p	0,006	0,000	0,986	0,047
	N	33	33	18	18
Log[AIF sejt(%)]	R	-0,431	0,472	0,000	-0,169
	p	0,035	0,020	0,999	0,620
	N	24	24	11	11

A szívelégtelen csoporton belül a pro-BNP csak a PRX-el, OSI-el és a PARP aktivitással mutatott pozitív korrelációt (25. ábra). A kontroll csoportban semmilyen korreláció nem volt kimutatható a szívelégtelenség paramétereit és a parthanatos markerei között.





25. ábra: A pro-BNP és a parthanatos markerei közötti lineáris regresszió ábrázolása

25/A ábra: Teljes vizsgálati csoportban a pro-BNP és a totál peroxid értékei között szignifikáns összefüggés volt látható.

25/B ábra: Krónikus szívelégtelen csoport analízise során a szignifikáns korreláció megmaradt a pro-BNP és a totál peroxid értékei között.

25/C ábra: Teljes vizsgálati csoportban a pro-BNP és oxidatív stressz index között szignifikáns korreláció volt látható.

25/D ábra: Krónikus szívelégtelen csoport vizsgálata során a pro-BNP és az oxidatív stressz index között szintén kimutatható volt az összefüggés.

25/E ábra: Teljes vizsgálati csoport analízise során a pro-BNP és a HNE festődés között szignifikáns összefüggés volt látható.

25/F ábra: A krónikus szívelégtelen csoportban a pro-BNP és a celluláris oxidáció közötti összefüggés már nem volt kimutatható.

25/G ábra: A pro-BNP és a tirozin nitráció között szignifikáns korreláció volt látható a teljes vizsgálati csoport esetén.

25/H ábra: A krónikus szívelégtelen csoportban a NT festődés nem mutatott jelentős összefüggést.

25/I ábra: A pro-BNP és a PARiláció között szignifikáns korreláció volt látható a teljes vizsgálati csoport analízise során.

25/J ábra: A krónikus szívelégtelen csoport vizsgálata során a pro-BNP és a PARiláció közötti szignifikáns korreláció megmaradt.

25/K ábra: A teljes vizsgálati csoport analízise során a pro-BNP és az AIF transzlokációja között kimutatható volt a korreláció.

25/L ábra: A krónikus szívelégtelen csoportban a pro-BNP és az AIF transzlokációja között nem találtunk összefüggést.

Összefoglalva a teljes vizsgálati csoportban, továbbá a krónikus szívelégtelen páciensek között is kimutatható volt, hogy a pro-BNP értékkel korrelál az oxidatív stressz (totál peroxid, oxidatív stressz index) és a PAPR aktiváció. A celluláris oxidáció, a tirozin nitráció és az AIF transzlokáció csak a teljes vizsgálati csoportban mutatott korrelációt a proBNP értékkel. (A határvonalak 95%-s konfidencia tartományt jelölnek. R^2 : determinációs koefficiens, p : szignifikancia értéke)

5.2.4 Parthanatos vizsgálata anamnesztikus és klinikai markerek függvényében

A teljes vizsgálati csoportban a plazma peroxidáció és az OSI pozitív korrelációt mutatott a koronária betegséggel ($R=0,587$, $p<0,01$; $R=0,573$, $p<0,01$) és a dohányzással ($R=0,552$, $p<0,01$; $R=0,525$, $p<0,01$). A celluláris oxidatív stressz ($\log[\text{HNE area}(\%)]$) pozitívan korrelált a bal kamrai átmérőkkel (LVEDD $R=0,440$, $p<0,05$; LVESD $R=0,505$, $p<0,05$). A leukocitákban kimutatott nitratív stressz ($\log[\text{NT area}(\%)]$) a cukorbetegséggel mutatott pozitív korrelációt ($R=0,376$, $p<0,05$). Továbbá az AIF transzlokáció és a bal kamrai végdiasztolés diaméter között szintén pozitív korrelációt találtunk ($R=0,497$, $p<0,05$).

A szívelégtelen csoportban a totál peroxid és az OSI pozitív korrelációt mutattak a koronária betegség jelenlétével ($R=0,676$, $p<0,05$; $R=0,687$, $p<0,05$). Továbbá a plazma PRX, OSI és a bal kamrai diaméterek (LVESD, LVEDD) között negatív korrelációt találtunk ($R=-0,819$, $p<0,01$; $R=-0,838$, $p<0,01$ és $R=-0,793$, $p<0,05$; $R=-0,817$, $p<0,01$). A bal kamrai átmérők a koronária betegség jelenlétével szintén negatív korrelációt mutattak (LVESD $R=-0,660$, $p<0,05$; LVEDD $R=-0,673$, $p<0,05$).

5.2.5 Oxidatív stressz meghatározói szívelégtelenségben

A szívelégtelen csoportban a plazma peroxidáció és az oxidatív stressz pozitív korrelációt mutatott a pro-BNP-vel, a koronária betegség jelenlétével és negatív összefüggést találtunk a bal kamrai átmérőkkel (LVESD, LVEDD). Az oxidatív stressz kialakulásában szerepet játszó faktorok meghatározására többváltozós regressziót alkalmaztunk. Az összefüggés vizsgálata a pro-BNP-t és koronária betegséget találta, mint a PRX független determinánsait, melyek 97,7%-ban befolyásolják a PRX alakulását. Az OSI vizsgálata során egyedül a pro-BNP-t mutattuk ki, mint független determinánst (3. táblázat).

3. táblázat: Az oxidatív stressz többváltozós regressziós analízisének eredményei
 Független változónak tekintettük a pro-BNP-t, az iszkémiás szívbetegséget és a bal kamrai átmérőket (LVEDD, LVESD). A többváltozós regressziós analízis során a totál peroxid kialakulásában a pro-BNP és a koronária betegség bizonyult független determinánsnak. Az OSI esetében egyedül a pro-BNP értékét tekinthetjük szignifikánsnak.

	Totál peroxid ($\mu\text{mol/l}$) $r^2=0,977$, $p^A<0,002$, $N=12$			OSI $r^2=0,978$, $p^A<0,001$, $N=12$		
	B	SD of B	p^B	B	SD of B	p^B
Konstans	-1611,2	713,8	0,087	-2,629	0,927	0,047
log[pro-BNP (pg/mL)]	991,7	154,5	0,003	1,402	0,201	0,002
ISZB	362,4	127,5	0,047	0,421	0,166	0,064
LVEDD	26,3	25,7	0,362	0,059	0,033	0,151
LVESD	-55,2	30,2	0,141	-0,101	0,039	0,062

*r*²: determinációs koefficiens; *p*^A: modell szignifikancia szintje, *B*: beta koefficiens; *p*^B: független változók hatásainak szignifikancia szintje

6. Megbeszélés

6.1 Vaszkuláris diszfunkció ingadozó vércukorszintben

A szív és érrendszeri szövődmények kialakulásában a hipo- és hiperglikémia kórélettani szerepe széles körben ismert a nemzetközi irodalomban, viszont az ingadozó vércukor szint jelentőségéről már kevesebb információval rendelkezünk. Kutatásunk során igazolni tudtuk, hogy az ingadozó vércukorszint szignifikánsan rontja az endotél függő relaxációt. Eredményeink publikálását követően Zaccardi és munkatársai megkérdőjelezték a glikémiás variabilitás jelenlétét az ingadozó vércukor csoportban, ugyanis az objektív matematikai kalkulációkat, mint például a standard deviációk, a glukóz kiugrások átlagos amplitúdója, az egy napon belüli glikémiás variabilitás számításait hiányolták a vizsgálatból (116). Munkacsoportunk ezt követően végezte el a vércukor mérési protokollnak megfelelően adaptált statisztikai elemzéseket, amelyek egyértelműen igazolták, hogy az ingadozó vércukor csoportban a fenti kalkulációk is szignifikáns variabilitást igazoltak, ami felelős lehet az endotél függő relaxációs károsodás kialakulásáért (117).

Az endotél diszfunkció különböző szerepeket tölt be a diabétesz mellitusz progressziója során észlelhető mikrovaszkuláris és makrovaszkuláris szövődmények patofiziológiájában. A konduktív artériák és a rezisztencia erek esetében az endotél diszfunkció mértékét a vazodilatáció csökkenésével tudjuk felmérni, ellenben a vaszkuláris simaizomzattal nem rendelkező kapillárisok szintjében az eNOS és az adhéziós molekulák expressziója, a leukociták migrációja és a kapilláris denzitás utalhatnak a mikrovaszkuláris elváltozásokra (118). Cerilello és munkacsoportjának eredményei alapján az oszcilláló vércukor a flow-mediált vazodilatáció szignifikáns csökkenését és az oxidatív markerek jelentős emelkedését okozta a folyamatosan magas vércukorprofilhoz képest (80). Torimoto és munkatársai 57 T2DM páciensben 2 napon keresztül, folyamatosan monitorozták a vércukorszintet és a vaszkuláris endotél funkciót. Az endotél diszfunkció korrelált a vércukor értékek szórásával, a glikémiás kilengések és a posztprandiális glukóz átlagával, de a HbA1c és az éhomi glukóz értékeivel nem mutatott összefüggést (119). Azuma és munkatársai diabéteszes állatmodellben napi 2-szeri étkezéssel repetitív posztprandiális fluktuációt váltottak ki és az aorta endotéliumához kitapadt monocitákat vizsgálták. A glikémiás oszcilláció modellben az

ad libitum táplált csoporthoz képest alacsonyabb HbA1c volt mérhető, ennek ellenére a vércukor fluktuációja szignifikánsan megemelte az endotélhez kitapadó fehérvérsejtek számát. Viszont a fluktuáció gátlásával markánsan csökkent az adherens leukociták mennyisége (120). 21 T2DM páciens eset-kontroll tanulmányában az oxidatív stressz markere, a 8-izo prosztaglandin F2 α nem a HbA1c-vel mutatott korrelációt, hanem a glukóz kilengésekkel (121). Piconi és munkacsoportja a tartósan magas vércukorszinttel szemben az intermittálóan magas glukóz modellben mutattak ki szignifikáns emelkedést az adhézions molekulák és az interleukin 6 endoteliális expressziójában (77).

A vaszkuláris eredményeink közül érdekesnek tekinthető, hogy a kezeletlen DM csoportban nem volt detektálható relaxációs károsodás. A nemzetközileg használt streptozotocin által indukált állatmodellekhez képest a mi modellünk vizsgálati ideje rövid volt. Általában több hónapig tartó diabéteszes állapot után kerülnek vizsgálatra a vaszkuláris funkciók. Azontúl, hogy a vizsgálati időnk mindössze 4 hét volt, szintén különbségnek tekinthető, hogy az általában használt diabetogén táplálást nem folytattunk állatmodelleinknél. Ezek együttesen járulhattak hozzá, hogy a diabéteszre jellemző krónikus szövődmények, az endotél diszfunkció kialakulásához nem volt elegendő idő a kezeletlen diabéteszes csoportban. A nemzetközi tapasztalatok alapján hosszabb időtartam után látható endotél diszfunkció (122). A néhány hetes modelleknél a publikált eredmények alapján nem egyértelmű az endotél diszfunkció megjelenése és számos befolyásoló faktort azonosítottak, például a nemek közötti különbséget. Korábbi vizsgálatok alapján hím patkány modellek esetében az igen rövid időtartam, egy hét után nem volt kimutatható szignifikáns relaxációs károsodás (123). A 4 és 8 hetes vizsgálatoknál nem egyértelműek a nemzetközi eredmények, néhány vizsgálat esetében kimutatható volt, néhány esetben, kifejezetten hím patkány modellek esetén nem volt detektálható szignifikáns relaxációs károsodás (124, 125). Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a kezeletlen diabéteszes csoportban nem detektálható relaxációs károsodás hiánya a kidolgozott modellünkből fakadó rövid időtartammal magyarázható.

Eredményeinkkel összhangban arra a következtetésre juthatunk, hogy a vércukor szint átlaga mellett a glukóz ingadozások is okozhatnak endotél diszfunkciót, ami hozzájárulhat a vaszkuláris szövődmények kialakulásához. Bár a klinikai vizsgálatok eredményei alapján a diabétesz mellitusz vaszkuláris szövődményeinek kialakulásában az ingadozó vércukor szerepe kevésbé tisztázott (126). T1DM páciensek esetében sem a

DCCT, sem az EDIC vizsgálat során nem találtak összefüggést a glikémiás variabilitás és a mikrovaszkuláris szövődmények között (127). Egy kis esetszámú vizsgálatban, 100 páciens esetében a vércukor SD értéke a perifériás neuropátia prevalenciájának független prediktoraként volt kimutatható (128). A hosszú távú fluktuáció és a mikrovaszkuláris szövődmények közötti összefüggésről szintén ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésünkre. Gimeno-Orna kutatása során 130 T2DM páciens esetében sikerült kimutatni a retinopátia és az éhomi vércukor SD értékei közötti összefüggést (129). Ugyanakkor egy másik tanulmányban ezeket az összefüggéseket már nem lehetett reprodukálni (130). A makrovaszkuláris szövődmények klinikai vizsgálatai alapján szintén nem egyértelmű az ingadozó vércukor szerepe. Verona Diabétesz vizsgálat eredményei szerint az éhomi vércukor variabilitás és a kardiovaszkuláris mortalitás között szignifikáns összefüggés volt kimutatható (131). Ellenben a HEART2D vizsgálatban nem volt kapcsolat a glukóz variabilitás és kardiovaszkuláris események között az akut miokardiális infarktuson átesett betegek körében (132). Ugyanakkor több olyan vizsgálat eredményét ismerjük, ahol a glikémiás variabilitás és egyéb szubklinikai paraméterek közötti összefüggést vizsgálták. A posztprandiális hiperglikémia csökkentésével a carotis artéria intima-média vastagságának regresszióját igazolták (133). 216 T2DM páciens esetében az érlemeszesedés progresszióját ultrahang és MR vizsgálattal határozták meg. A glikémiás variabilitás paraméterei korrelációt mutattak a plakkok megjelenésével, de a plakk által okozott szűkület mértékével már nem volt összefüggés (134). Az ellentmondásos klinikai eredmények hátterében a vércukor szint fluktuációjának egységes vizsgálatának hiánya is közrejátszik. A rövid távú és hosszú távú fluktuáció jellemzésére jelenleg is több, különböző paramétert használnak. Az eddigi ellentmondásos vizsgálati eredmények megfelelő értékeléséhez olyan további nagy esetszámú klinikai vizsgálatok sora szükséges, ami a vaszkuláris szövődmények adekvát mérésén túl a vércukorszintek oszcillációjának egységes, részletesen kidolgozott módszertanával is rendelkezik.

Mai napig a cukorbetegség gondozásában központi szerepet játszik a vaszkuláris szövődmények megelőzése. A mikrovaszkuláris szövődmények kialakulása szoros összefüggést mutat a HbA1c szinttel. A DCCT és az UKPDS vizsgálat eredményei egyértelműen alátámasztották, hogy a HbA1c által meghatározott intenzív antidiabetikus terápia mellett szignifikánsan kevesebb a mikrovaszkuláris komplikációk előfordulása

(46). Ezzel szemben a nagy betegszámú vizsgálatok eredményei kevésbé támasztották alá a makrovaszkuláris szövődmények és a HbA1c által kontrollált terápia közötti összefüggést. Az ADVANCE vizsgálat során több mint 11 000, T2DM páciensben hasonlították össze a standard kontrollt és az intenzív glukóz kontrollt, majd az 5 éves utánkövetés alatt a vaszkuláris szövődmények (összmortalitás, kardiovaszkuláris mortalitás, mikrovaszkuláris szövődmények, makrovaszkuláris szövődmények) kialakulását vizsgálták. A standard terápia alapját a helyi protokoll jelentette, míg az intenzív glukóz kontroll során a HbA1c 6,5 % alá csökkentése volt a cél. Az intenzív glukóz kontrollban elért alacsonyabb HbA1c mellett szignifikánsan alacsonyabb volt a vaszkuláris szövődmények (a mikro- és a makrovaszkuláris) együttes incidenciája, ami elsősorban a nefropátia kialakulásának csökkenését jelentette. Önmagában a makrovaszkuláris eseményeket vizsgálva, nem volt kimutatható különbség, sőt az összmortalitás és a kardiovaszkuláris mortalitás sem mutatott szignifikanciát a két terápia között (135). A fenti eredmények tükrében úgy tűnik, hogy a vizsgált időszak alatt önmagában a HbA1c ellenőrzése nem volt elegendő olyan adekvát terápia kialakításához, ami sikeresen megakadályozza a vaszkuláris, kifejezetten a makrovaszkuláris szövődmények kialakulását. Ezzel összhangban mutat rá vizsgálatunk eredménye, hogy az átlagában alacsonyabb, de nagyobb ingadozásokat mutató glukóz profil mellett szignifikáns endotél diszfunkció alakult ki a magasabb átlagú, de kisebb ingadozásokat mutató vércukorszinttel szemben. Mindezek alapján a HbA1c mellett megfontolandó olyan további módszertanok kidolgozása, ami a glukóz fluktuáció kontrollálását szolgálja, a kezelőorvos számára részletesebb információt ad a szénhidrátháztartás ingadozásairól, és a mindennapi beteggondozásba könnyen integrálható.

A randomizált vizsgálatok sorai közül érdemes kiemelni a STENO-2 tanulmány eredményeit. 160, T2DM páciens került beválasztásra és a konvencionális kezelést egy multifaktoriális, intenzív, célzott terápiais stratégiával hasonlították össze. A közel 8 éves utánkövetés alatt vizsgálták a mortalitást és a vaszkuláris szövődmények kialakulását. A nagy betegszámú vizsgálatok eredményeivel szemben, ebben a tanulmányban a mikrovaszkuláris események mellett a makrovaszkuláris események rizikója is szignifikánsan csökkent az intenzív, multifaktoriális terápiais csoportban. Az intenzív terápia összeállításában az összes ismert kardiovaszkuláris rizikót figyelembe vették: hiperglikémia, hiperkoleszterinémia, hipertónia, túlsúly, fizikai inaktivitás, dohányzás,

diéta (136). Az intenzív terápiában részesülő pácienseknél nemcsak a vércukorszintet tartották szoros kontroll alatt, hanem a teljes rizikóstatusz figyelembevételével történt az életmódbeli, diétás és gyógyszeres terápiás lépések meghatározása. Bár közvetlenül nem vizsgálták, de a szoros kontrollból és a korai intenzív terápiából fakadó glikémiás fluktuáció csökkent valószínűsége is hozzájárulhatott a makrovaszkuláris események megelőzéséhez. Sőt, az endotél diszfunkció központi szerepét az is megerősítheti, hogy az intenzív terápiában meghatározott egyéb szempontok, például a dohányzás elhagyása, a renin-angiotenzin aldoszteron blokádtérápia, sztatin terápia, rendszeres fizikai aktivitás szintén javíthatja az endotél diszfunkciót (137-139). Ez alapján úgy tűnik, hogy az endotél diszfunkciót javító terápiás lehetőségek együttes figyelembevételével a makrovaszkuláris szövődmények kialakulásának rizikója is csökkenthető.

A mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásának etiológiai faktorai között is markáns különbségeket tudtak kimutatni. Az ADVANCE klinikai vizsgálat eredményei alapján a makrovaszkuláris szövődmények kialakulása nagymértékben függ a páciens életkorától, a cukorbetegség időtartamától, míg a mikrovaszkuláris szövődmények csak a cukorbetegség fennállási idejével mutattak összefüggést (140). A nagy esetszámú vizsgálatok (VADT, ACCORD, UKPDS, ADVANCE) metaanalízise alapján több mint 4 éves utánkövetés alatt a HbA1c 1%-s csökkenése a nem fatális miokardiális infarktus relatív rizikójának 15%-s csökkenését mutatta, de az ösztörtalitást érdemben nem befolyásolta (141). Az UKPDS vizsgálat meghosszabbításának 10 éves utánkövetése alatt a hosszú távú intenzív terápia hatására nemcsak a miokardiális infarktus kialakulásában, hanem az ösztörtalitásban is szignifikáns relatív rizikó csökkenés volt tapasztalható (142). Amennyiben már kardiovaszkuláris rizikóval rendelkező cukorbeteg páciensek kerültek bevonásra, akkor a több éves intenzív inzulin terápia ellenére sem csökkent a kardiovaszkuláris események kialakulásainak valószínűsége (143). Ez alapján úgy tűnik, hogy a mikrovaszkuláris szövődmények patofiziológiájában obligát károsodást jelentő endotél diszfunkció és további rizikó faktorok (hipertónia, diszlipidémia) jelenléte együttesen fokozhatják az érfal patológiás elváltozásait, ami végezetül az ateroszklerózis progresszióját és a kardiovaszkuláris események kialakulását okozhatják. A jól kontrollált terápia csökkentheti a mikrovaszkuláris komplikációk rizikóját, viszont a késői diagnózis, egyéb

rizikófaktorok megjelenése esetén a makrovaszkuláris események rizikója már kevésbé csökkenthető.

A diabétesz mellitusz glikémiás kontinuum koncepciójában az ingadozó vércukor szint okozta endotél diszfunkció egy kezdeti stádiumnak tekinthető, ami számos, egyéb rizikófaktor megjelenésével hozzájárulhat mind a mikro-, mind a makrovaszkuláris szövődmények kialakulásához. Bár a glukóz fluktuáció okozta patofiziológiai eltérések részletei és klinikai jelentősége a jelenleg rendelkezésre álló eredmények alapján kevésbé tisztázott, ezért olyan további vizsgálatok szükségesek, melyek a pontos molekuláris háttérmechanizmusok feltérképezése mellett a glikémiás variabilitás vaszkuláris szövődmények progressziójában betöltött szerepét is tanulmányozza.

6.2 Oxidatív-nitratív stressz és PARP aktiváció az ingadozó vércukorszint függvényében

Számos experimentális és humán vizsgálatban már leírásra került, hogy az oxidatív és nitratív stressz és a következményes PARP aktiváció kiemelt szerepet játszik a diabéteszes szövődmények patofiziológiájában, amiben a PARP aktivációért felelős legfontosabb faktornak a peroxinitrit által okozott DNS károsodást tekintették (144-146). Ezekben a vizsgálatokban kifejezetten a hiperglikémia által kiváltott kóros elváltozásokat tanulmányozták, viszont az oszcilláló vércukorszint hatásairól kevesebb információval rendelkezünk. Experimentális vizsgálatunk során az ingadozó vércukor hatására kifejezett PARP aktivitást tudtunk kimutatni a vaszkuláris endotél immunhisztokémiai elemzése során, bár semmilyen összefüggést nem mutatott a peroxinitrit jelenlétével. Emellett a lipidperoxidáció csupán tendenciájában volt markánsabb az ingadozó vércukorszintben, de a szignifikancia határát szintén nem érte el. Ezzel ellentétben a korábbi in vitro vizsgálatok azt igazolták, hogy az ingadozó vércukorszint hatására az endotéliumban szignifikánsan megemelkedik a reaktív gyökök termelődése, továbbá PARP inhibitorok hatása mellett markánsan csökken a peroxinitrit termelődése (77, 147). Eredményeink egyik lehetséges magyarázata, hogy az endotél a komplex érfal csak egy részét jelenti, ami alapján az itt látott eltéréseket a különböző patofiziológiai mechanizmusok részjelenségének értékelhetjük. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ingadozó vércukorszint hatására jelentősen megemelkedik az adhézions molekulák és a

gyulladásos citokinek expressziója az endotéliumban, melyek a leukociták kitapadását, migrációját tudják elősegíteni, ami hozzájárulhat az endotél diszfunkció kialakulásához (148). Elképzelhető, hogy az ingadozó vércukor szint okozta endotél diszfunkció hátterében lévő szabadgyökök nemcsak magában az ér falában termelődnek, hanem az oxidatív és nitratív stressz egyik jelentős forrásának a keringő leukocita is tekinthető. Ezzel áll összhangban a csontvelő vizsgálati eredményünk, miszerint az ingadozó vércukorszint hatására a kezeletlen cukorbeteg csoporthoz hasonló, szignifikáns NT festődést találtunk.

Annak ellenére, hogy az endotélben nem tudtunk igazolni lipidperoxidációt és peroxinitrit termelődést, szignifikáns PARP aktivitás volt látható az ingadozó vércukor modell mintáiban. Eredményeink alapján az ingadozó vércukorszint hatására vaszkuláris diszfunkció és jelentős PARP aktiváció alakult ki az endotélben. Sorino és munkatársai azt találták, hogy PARP inhibitor alkalmazásával nemcsak megelőzték a vaszkuláris diszfunkció kialakulását, hanem a korábban detektált csökkent vazodilatációs képességet is javította az utólagosan használt inhibitor terápia (124). Ezenkívül inzulin terápiával is csökkenteni tudták a kiváltott hiperglikémia mellett detektált PARP aktivitást (149). Tapasztalatunk annak tükrében egészíti ki az eddig rendelkezésre álló információkat, hogy önmagában az inzulin terápia alkalmazása nem feltétlenül jelent endoteliális PARP aktiváció csökkenést és vaszkuláris diszfunkció javulást, mivel nem megfelelő inzulin terápia esetén kialakuló glukóz oszcilláció hozzájárulhat a vaszkuláris diszfunkció és a PARP aktiváció kialakulásához.

A Western blot analízis során csak a kezeletlen cukorbeteg mintáiban tudtunk kimutatni szignifikáns PARP aktivációt. Az inzulin terápia szignifikánsan csökkentette a PARP festődését függetlenül annak beállításától. Bár érdemes szem előtt tartani, hogy a homogenizátumok nemcsak az endotél sejteket tartalmazták, hanem az érfal teljes felépítése vizsgálat alá került, beleértve a simaizom sejtréteget is. Ez alapján a Western blot analízise nem feltétlenül csak az endoteliális elváltozásokról tájékoztat minket. Mindenesetre érdekes eredménynek tekinthetjük, hogy 50 kDa molekulasúlynál fokozott PARiláció volt látható, ami a PARP aktiváció célfehérjéire mutathat rá. Eredményeink közlése óta még nem sikerült azonosítani az 50 kDa molekulasúlyú fehérjét, bár számos fehérjét azonosítottak a PARP aktivitás során, melyek molekulasúlya 50 kDa. A PARP hasításában több enzim is szerepet játszik, melyek különböző molekulasúlyú

fragmentumokat alakítanak ki (150). Talán a legrégebb óta a kaszpáz enzim szerepe ismert, amely működése során 89 és 24 kDa fragmentumokat alakít ki. A kalpin-1 enzim 40 és 70 közötti fragmentumokat hasít le a PARP fehérjéből. A katepszin enzim 44 és 89 kDa között különböző nagyságú fragmentumokért felelős. A granzimek működése során számos 50 kDa közötti hasítási termék keletkezik. A mátrix metalloproteázok 66 kDa mellett, alacsony molekulású, 48 kDa alatti fragmentumokat hasítanak le. Számos hasítási termék szerepe a mai napig nem tisztázott, de néhány kutatási eredmény egy-egy fragmentumnak aktív szerepet feltételez. A kaszpáz által hasított 21 kDa és a granzim által kialakított 55 kDa molekulású fragmentumoknak mutatták ki a PARP aktivációt gátló hatásukat. Bár egyre többet tudunk a PARP hasítási termékekről és elképzelhető, hogy az általunk kimutatott 50 kDa körüli fehérje is egy fragmentum, egyelőre keveset tudunk rólok és további vizsgálatok tárgyát képezik a hasítási fragmentumok szerepkörének kutatása. Amennyiben a későbbi vizsgálatok során beazonosítható lenne ezen molekulák csoportja, nagymértékben hozzájárulna az ingadozó vércukor szint okozta vaszkuláris PARP aktiváció patomechanizmusának feltérképezéséhez.

Az endotélben detektált PARP aktiváció másik lehetséges magyarázata, hogy az enzim aktivációjában nem feltétlenül csak a szabadgyökök által okozott DNS törés állhat, hanem számos reguláló folyamat, Ca^{2+} -háztartás, hormonok és egyéb endogén faktorok is szerepet játszhatnak (151). Ezen szabályozási mechanizmusok felerősödése egy másik lehetséges magyarázatot adhat arra, hogy az endotél PARP aktivációja mellett az érfalban nem volt kimutatható szignifikáns szabadgyök termelődés.

A diabéteszes szövödmények kialakulásában feltételezett oxidatív és nitratív stressz egy olyan szisztémás jelenségnek tekinthető, ami nem egy szervre korlátozódik, hanem számos, különböző szervi károsodás kialakulásában markánsan közrejátszik. Ceriello és munkatársai T2DM páciensek plazma vizsgálata során szignifikáns nitrotirozin emelkedést mutattak ki (80). A keringő leukocitákban már korábban igazolták, hogy cukorbetegség alatt fokozott az oxidatív DNS károsodás és a PARP aktiváció (152). A keringő leukocitákra akár úgyis tekinthetünk, mint a szisztémás oxidatív-nitratív stressz markereire, melyek nemcsak demonstrálhatják a szabadgyökök jelenlétét, hanem az általuk okozott patológiás hatások közvetítői is lehetnek. Eredményeink alapján szignifikáns PARP aktiváció csak a kezeltlen cukorbeteg keringő leukocitáiban volt kimutatható és függetlenül a vércukor profiltól, az inzulin terápia

hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A csontvelő immunhisztokémiai analízise során a kezeletlen cukorbeteg mintáiban szintén jelentős PARP aktivációt láttunk, de az ingadozó vércukor profilt biztosító inzulin terápia már nem okozott jelentős PARP csökkenést. A glukóz fluktuáció során tapasztalt eltérő csontvelő és periféria eredményének lehetséges magyarázata, hogy a fokozott PARP aktivációt mutató sejtek, a sejthalál útjára lépve, már nem kerülnek ki a perifériára vagy korán eliminálódnak a keringésből. Másik lehetséges magyarázat, hogy az inzulin kezelés perifériára gyakorolt hatása befolyásolja a leukociták PARP aktivitását. Munkacsoportunk korábbi experimentális vizsgálatában kimutatta, hogy az inzulin kezelés hatására in vivo és in vitro PARP aktivitás csökkenés látható. Ez alapján az inzulin terápia nemcsak a hiperglikémia rendezésén keresztül, indirekt módon befolyásolhatja a PARP aktivitást, hanem közvetlen celluláris hatása is feltételezhető (149).

Eredményeink szerint a glikémiás variabilitás során különböző mértékű PARP aktivációt találtunk a csontvelőben, a mononukleáris leukocitákban és az endotélben. Ez alapján további vizsgálatok szükségesek, hogy az ingadozó vércukor szint okozta patológiás eltérések hátterében a PARP aktiváció pontosan milyen szereppel rendelkezik. Viszont a mérések egyetemes áttekintése esetén arra a felismerésre juthatunk, hogy a jól beállított inzulin terápia minden mintában jelentős javulást mutatott. A csontvelő PARP festődése az adekvát inzulin terápia hatására szignifikánsan csökkent a kezeletlen cukorbeteg mintáihoz képest. Ehhez hasonlóan a keringő leukociták áramlásos citometriai eredményei szintén szignifikáns javulást mutattak a kezeletlen cukorbeteg csoportjához képest. Az endoteliális PARP aktiváció vizsgálata során szintén szignifikáns különbséget találtunk az adekvát kezelés és az ingadozó vércukor szint között. Tehát eredményeink nemcsak rámutatnak az ingadozó vércukor szint okozta nitratív stressz és PARP aktiváció jelenlétére, hanem az adekvát inzulin terápia jótékony hatásaira is felhívják a figyelmet.

6.3 Parthanatos markerei szívelégtelenségben

A nemzetközi irodalomban már számos experimentális és klinikai vizsgálat található, melyek alátámasztották az oxidatív stressznek a szívelégtelenség patomechanizmusában betöltött szerepét (100, 153, 154). Több szívelégtelenség

állatmodell során szoros összefüggést találtak a reaktív szabadgyökök és a ventrikuláris diszfunkció között (100). Nakamura és munkatársai 31 hipertrófiás kardiomiopátia miatt kezelt páciensben vizsgálták az oxidatív stressz jelenlétét és összehasonlították a kamrai dilatáció illetve a szisztolés diszfunkció mértékével. Eredményeik alapján szignifikáns szabadgyök termelés volt kimutatható és az üregméretekkel pozitív korrelációt, az ejekciós frakcióval negatív összefüggést találtak (154). Ezzel megegyező képet találtunk a saját vizsgálatunk során is, amikor a plazma peroxidáció és celluláris oxidáció markereinek jelentős emelkedése volt látható a szívelégtelen csoportban, továbbá a teljes vizsgálati populációban szignifikáns korrelációt tapasztaltunk mind az ejekciós frakcióval, mind a pro-BNP mértékével. Annak ellenére, hogy az oxidatív stressz szerepéről egyre több bizonyítékot találunk, az antioxidánsok jótékony hatásait egyértelműen nem tudták igazolni a klinikai vizsgálatok. Ugyanakkor a szívelégtelenségben jelenleg alkalmazott gyógyszeres terápia számos ágenséről ismert az adjuváns antioxidáns hatása, mely hozzájárulhat a terápiás hatékonyság kialakításához (153, 155, 156).

Mind a teljes vizsgálati csoportban, mind a szívelégtelen pácienseknél a plazma peroxidáció és a koronária betegség között pozitív korrelációt találtunk. Korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy az iszkémia-reperfúzió patofiziológiájában fokozott szabadgyök termelés volt tapasztalható (72, 157). Eredményünk ez alapján azzal is magyarázható, hogy a krónikus, iszkémiás környezet jelentősen hozzájárulhat az oxidatív stressz mértékének fokozódásához. Továbbá a teljes populációban a dohányzás és az oxidatív stressz között szintén összefüggést találtunk, ami egybevág a korábbi vizsgálatok megfigyeléseivel (158).

A teljes populációban a totál peroxid a bal kamrai átmérővel nem mutatott összefüggést, bár a szívelégtelen csoportban negatív korreláció volt látható az üregméretekkel és a koronária betegséggel. Ezen eredmények háttere kevésbé tisztázott. Egyik lehetséges magyarázat, hogy a szívelégtelen csoporton belül a koronária betegséggel rendelkezőknél szignifikánsan kisebb diamétereket találtunk és ennek következményeként értékelhető a peroxidációval kimutatott ellentétes összefüggés a szívelégtelen csoporton belül.

A nemzetközi tudományos világban az oxidatív szabadgyökök mellett egyre nagyobb figyelmet kapott a nitratív stressz és a peroxinitrit által közvetített

patomechanizmusok vizsgálata. Lokuta és munkacsoportja szignifikáns nitrotirozin festődést mutattak ki dilatatív kardiomiopátia biopsziás mintáiban, in vitro vizsgálatukban pedig a peroxinitrit hatására a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} -pumpájának inaktivációját találták (159). Ezzel összhangban, a vizsgálatunkban szintén fokozott nitratív stressz volt kimutatható a szívelégtelen csoportban. A szívelégtelenség progresszióját jelző paraméterekkel, mint az EF-val és a pro-BNP-vel szintén markáns összefüggést mutatott, bár ezek a korrelációk a szívelégtelenség csoporton belül már nem voltak kimutathatóak.

A korábbi vizsgálatok tükrében nem meglepő, hogy a leukociták NT festődésének mértéke a cukorbetegség jelenlétével szoros összefüggést mutatott (160). Az előző vizsgálatunk eredményével ez összhangban áll, ahol az ingadozó vércukor hatására és a kezeletlen DM csoportban szignifikáns NT festődést találtunk a csontvelő vizsgálatok során. Eredményeink utalhatnak arra, hogy különböző betegségek esetén azonos patofiziológiai folyamatok is kimutathatóak, ami akár magyarázhatják azt a megfigyelést, hogy egy betegségben bizonyított terápiás lehetőség jótékony hatással lehet egy másik betegség klinikumára is. A cukorbetegség kezelésében használt empaglifozin mellett a szívelégtelenség miatti hospitalizáció csökkenését tapasztalták, ami további vizsgálatokat indított ennek a megfigyelés részleteinek feltérképezése céljából (65).

Számos experimentális modell mellett, viszonylag kevesebb humán vizsgálat eredménye szól a szívelégtelenségben kialakult PARP aktivációról. Doxorubicin, endotoxin és aorta beszűkítésével indukált szívelégtelen állatmodellek mintáiban szignifikáns PARP aktiváció volt látható (106-108). Molnár és munkatársainak vizsgálata szívelégtelen páciensekből nyert miokardiális biopsziákban közvetlenül mutatta ki az oxidatív stressz és PARP aktiváció jelenlétét (111). Li és munkatársai szeptikus sokkban szenvedő betegek keringő leukocitáiban igazolták a PARP aktivitást, ami negatív korrelációt mutatott az EF-val (161). Jelen vizsgálatunkban hasonló eredményeket kaptunk, miszerint szívelégtelenség alatt a keringő leukocitákban szignifikáns PARP aktiváció volt detektálható, ami szignifikáns korrelációt mutatott a betegség progressziójával. A saját és a korábbi eredmények alapján úgy tűnik, hogy függetlenül a szívelégtelenség etiológiájától mind a miokardiumban, mind a keringő leukocitákban kimutatható a PARP aktiváció. Egyre több bizonyíték került leírásra arról, hogy szívelégtelenség során az immunrendszerben olyan adaptív változás alakul ki, mely

nemcsak a miokardiális inzultusra adott válaszreakciónak tekinthető, hanem egy szisztémás, krónikus gyulladás fenntartásáért felelős állapotnak, amely számos patológiás elváltozásban is közrejátszik (162). A szívelégtelenségben meghatározott B- és T-sejtek aktivációja figyelhető meg, amely a kardiomiociták sejthalálával, a szöveti remodellációval, a fokozott fibrózissal mutat összefüggést, hozzájárulva a kardiális diszfunkció progressziójához. Ez alapján úgy is tekinthetünk a PARP aktivációra, mint ennek a szisztémás, krónikus gyulladásos állapotnak a részjelenségére, amiben a keringő leukociták aktivációja nem csak következmény lehet, hanem további progresszióért felelős faktor.

A parthanatos-ra jellemző AIF transzlokáció számos experimentális szívelégtelenség modellben leírásra került, ennek ellenére a humán vizsgálatok eredményei ellentmondásosak (163). Korábbi vizsgálatunk során STEMI miatt PCI-n átesett páciensek keringő leukocitáiban a PARP aktiváció mellett az AIF transzlokációja is kimutatható volt, ellenben a szívtranszplantáció során nyert mintákban már nem volt szignifikáns AIF festődés (72, 111). Vizsgálatunk során a szívelégtelen csoportban szignifikáns AIF festődést találtunk, továbbá az EF-val, a pro-BNP értékével és a balkamrai végdiasztolés átmérővel korrelációt mutatott, bár a csoporton belüli analízis már nem mutatott összefüggést. Ez alapján úgy tűnik, hogy az AIF transzlokáció a szívelégtelenség kialakulásában közreműködik, de a progresszió mértékéről, a betegség súlyosságáról kevésbé tájékoztat.

6.4 Oxidatív stressz meghatározó tényezői a szívelégtelenség klinikumában

Az oxidatív stressz mértékét a totál peroxid mérésével és az oxidatív stressz index kalkulációjával jellemeztük, ugyanakkor a szívelégtelenség vizsgálatára az EF-t és a pro-BNP-t használtuk. Statisztikai analízisünk során azt találtuk, hogy a plazma peroxidáció kialakulásában két független determináns volt látható: a pro-BNP és a koronária betegség. Ugyanakkor az OSI esetében az egyedüli meghatározó faktor a pro-BNP volt. A korábbi vizsgálatok eredményeivel megegyezően elmondhatjuk, hogy az oxidatív stressz kialakulásában a szívelégtelenség és az iszkémiás környezet jelentős szerepet játszik. Bár érdemes külön figyelmet fordítani az ejekciós frakció és a pro-BNP közötti különbségre.

Az ejekciós frakció egy meghatározott echokardiográfiás módszerrel végzett kalkuláció, amely a szisztolés funkció jellemzésére a verőtér fogat és a végdiasztolés térfogat közötti arányt használja. A klinikai gyakorlat számára a szívultrahang szerepe vitathatatlan a szívelégtelenség diagnózisának felállításában és hosszú távú gondozásában. A szakmai ajánlások alapján a nátriuretikus peptidek magas negatív prediktív értéke segítséget jelenthet a diagnózis felállításában a kezelőorvos számára, bár érdemes szem előtt tartani, hogy pozitív prediktív értéke alacsonyabb (37). Ugyanakkor számos vizsgálat kimutatta, hogy a mortalitás független prediktoraiként tekinthetünk az akut dekompenzációban mért peptidekre (164). Van Veldhuisen és munkatársai a nátriuretikus biomarkerek prognosztikus szerepét vizsgálták HFpEF és HFrEF betegek körében, ahol a peptid szintek szoros összefüggést mutattak a mortalitással és a szívelégtelenség miatti hospitalizációval (165). Az Európai Kardiológiai Társaság 2016-os ajánlásában már említésre került, hogy az akut szívelégtelenség miatt hospitalizált páciensek monitorozásában hasznos eszköz lehet, ugyanis a nátriuretikus peptidek a terápia következtében mérhető csökkenése alacsonyabb mortalitást és kevesebb rehospitalizációt jelenthet (37). Összevetve eredményeinkkel arra következtethetünk, hogy a szívelégtelenségben mérhető nátriuretikus peptidek szintje és a kialakult oxidatív stressz mértéke összefüggésben állhat.

A teljes vizsgálati populációban végzett korrelációs analízis során kimutatott összefüggések nem minden esetben voltak kimutathatóak a szívelégtelen csoporton belül. A teljes populációban a totál peroxid, az oxidatív stressz index, a celluláris lipidperoxidáció, a nitratív stressz, a PARP aktiváció és az AIF transzlokáció negatív korrelációt mutatott az EF-val és pozitív összefüggést találtunk a pro-BNP értékével. A szívelégtelen betegeknél az EF egyik paraméterrel sem mutatott összefüggést, csak a pro-BNP esetében volt kimutatható a pozitív korreláció a plazma peroxidáció, az OSI és a PARP aktiváció mértékével. Ez alapján úgy tűnik, hogy a parthanatos-ra jellemző paraméterek a szívelégtelenség kialakulásában közreműködnek, de kialakult betegség esetén már nem mutatnak összefüggést annak súlyosságával. Továbbá a szívelégtelenség progressziójában a PARP aktiváció szerepvállalása nemcsak a parthanatos jelenségre korlátozódik, hanem számos egyéb patomechanizmusban is közreműködhet, ami magyarázhatja, hogy a szívelégtelen csoporton belül a PARP aktiváció az AIF transzlokáció nélkül mutatott pozitív korrelációt a pro-BNP-vel.

6.5 Parthanatos markerei, mint diagnosztikus és terápiás célpontok

Az ingadozó vércukorszint okozta endotél diszfunkcióra utaló diagnosztikus marker jelenleg nem elérhető a mindennapi orvosi gyakorlatban. A cukorbetegség gondozásában használatos HbA1c és fruktózamin nem ad tájékoztatást a glukóz variabilitásról. Az oxidatív és nitratív stressz kialakulásában az ingadozó vércukor szint mellett számos faktor közreműködhet, melyek a szabadgyökök túltermelődését okozhatják és megnehezítik a vércukor ingadozás szerepének értékelését. Ellenben a PARP aktiváció mérése egy lehetséges szempont, ugyanis korábbi vizsgálatok alapján a PARP és az endotél diszfunkció közötti összefüggés már leírásra került (166). Cukorbetegség humán bőr biopszia vizsgálata alapján a PARP aktivitás jelentős összefüggést mutatott a vaszkuláris reaktivitással, viszont a módszer nem kivitelezhető a mindennapi betegellátásban. Saját eredményeink alapján a keringő leukociták PARP aktivitásának mérése viszont nem alkalmas módszer az ingadozó vércukor szint okozta vaszkuláris diszfunkció megítélésére. Ennek lehetséges magyarázata munkacsoportunk korábbi vizsgálatának eredménye, amelyben kimutatták, hogy az inzulin terápia a glukóz csökkentő hatásán túl, direkt úton is tudja a PARP aktivitást befolyásolni (149). Ez alapján az inzulinkezelés melletti PARP aktivitás mérése, mint diagnosztikus módszer nehezen értékelhető. Ezért olyan további vizsgálatok sora szükséges, ami a PARP aktiváció szerepének feltérképezésén túl egy lehetséges, könnyen kivitelezhető rutin diagnosztikus módszer kidolgozását is jelentheti a klinikusok számára.

Az ingadozó vércukor szint okozta patológiás eltérések csökkentésében és megelőzésében a PARP inhibitorok jótékony hatásairól kevés információ áll rendelkezésünkre. Magyarázható azzal, hogy viszonylag kevés vizsgálat történt a „csak” glukóz oszcilláció indukálta patofiziológiai folyamatok feltérképezésére, amiben az esetleges PARP inhibitorok szerepe is tanulmányozható lett volna. Bár néhány experimentális vizsgálatban a PARP inhibitor jótékony hatásait ki tudták mutatni, de jelenleg ezek az eredmények nem elegendőek a humán vizsgálatok elindításához, csupán további kutatások alapjait képezhetik (124).

A szívelégtelenség mindennapi orvosi gyakorlatban tapasztalható aktualitása miatt a tudományos világban is erőteljes szándék érezhető a diagnosztikus és terápiás lehetőségek kibővítésében. A szívelégtelenség patomechanizmusának részletesebb megismerése során a parthanatos egyes elemei is a figyelem középpontjába kerültek (167).

Az oxidatív és nitratív szabadgyökök szerepe szinte már megkérdőjelezhetetlen, sőt az egyes terápiás lehetőségek háttérében feltételezett antioxidáns hatás is elfogadott a mindennapi gyakorlatban. Számos vizsgálat igazolta, hogy miokardium károsodás esetén szignifikáns PARP aktiváció alakul ki, ugyanakkor az AIF transzlokációról is egyre több vizsgálat eredménye érhető el. A keringő leukociták analízise egy lehetséges módszer, ami a PARP aktiváció diagnosztikus szerepén túl, a szívelégtelenség progressziójára is utalhat az eredményeink alapján. A páciens számára csak egy vérvételt jelent, ami módszertani szempontból további humán vizsgálatok kivitelezését is elő tudja segíteni.

A PARP inhibitorok számos experimentális vizsgálatban kipróbálásra kerültek, ahol a miokardium különféle károsodásait és az inhibitorok terápiás hatásait vizsgálták (168). L-2286 PARP inhibitor mellett a miokardiális remodelációt jellemző szövettani elváltozások mértékének csökkenése volt megfigyelhető krónikus szívelégtelenség állatmodellben (169). INO-1001 PARP inhibitor az AIF transzlokációt és a miokardiális hipertrófiát csökkentette az állatvizsgálatok során (109). Posztinfarktusos szívelégtelenségben a 4-aminobenzamid PARP inhibitor csökkentette a miokardiális fibrózist (170). Minocyclin a PARP gátlásával javította a miokardiális infarktus utáni kardiális funkciót a gyulladáshoz kapcsolódó markerek expressziójának csökkenése mellett (171). Az onkológia területen végzett humán vizsgálatok nagy száma ellenére kevesebb tanulmányt végeztek a kardiovaszkuláris betegséggel rendelkező páciensek körében. Kecsegtető eredményeket közöltek a TIMI-37 befejeztével, ahol a ST-elevációs miokardiális infarktusos páciensekben bizonyították az INO-1001 biztonságosságát (172). Továbbá a szívelégtelenségben alkalmazott, evidenciákkal rendelkező terápia -például enalapril- hatásosságát hasonlították össze L-2286 PARP inhibitorral, ami markánsan csökkentette a miokardiális remodelációt az experimentális modellben (173). Az egyre bővülő eredmények ellenére jelenleg nem áll rendelkezésre olyan PARP inhibitor terápia, aminek hatékonysága humán szívelégtelen tanulmányokban bizonyítást nyert volna, viszont az experimentális eredmények ezirányú vizsgálatok kivitelezése felé mutatnak.

A parthanatos kaskád rendszer másik target molekulája lehet az AIF, amelynek transzlokációja során számos beavatkozási pont azonosítható: AIF *release* blokkolása, AIF-fehérje interakció gátlása, AIF transzlokáció inhibíciója (174). Bár az AIF terápiával kapcsolatban jelenleg közel sem rendelkezünk annyi tapasztalattal, de mint terápiás lehetőség, további kutatások tárgyát képezheti.

7. Következtetések

1, Az ingadozó vércukor profil mellett szignifikáns endotél függő relaxációs károsodást mutattunk ki. Ez alapján a diabétesz mellitusz szív és érrendszeri szövődeményeinek kialakulásában nemcsak a folyamatosan magas vércukor szint, hanem a glukóz ingadozása is szerepet játszhat.

2, Vizsgálatunk során a korábbi irodalmi eredményekkel megegyezően kimutattuk a glukóz oszcilláció hatására kialakuló szabadgyökök jelenlétét. Az ingadozó vércukor jelentős tirozin nitrációt okozott a csontvelőben, ami a nitrozatív stressz fokozódására utal.

3, Szignifikáns PARP aktivációt találtunk az ingadozó vércukor modell endotél mintáiban. Western blott analízis során fokozott PARilációt a kezeletlen DM csoportban találtunk, bár 50 kDa sávban az ingadozó VC csoport mutatott fokozott PARP aktivitást. A csontvelőben a kezeletlen DM csoportban volt szignifikáns PARP aktivitás, az ingadozó VC mellett csak tendencia volt látható. A keringő leukociták csak a DM csoportban mutattak PARP aktivitást. Eredményeink alapján a hiperglikémia mellett a vércukor szintek ingadozása is befolyásolhatja a PARP aktivációt.

4, Krónikus szívelégtelen páciensekből nyert keringő leukocitákban kimutattuk az oxidatív-nitratív stressz fokozódását, a következményes PARP aktivációt és az AIF transzlokációt, ami a „parthanatos” folyamatának celluláris sajátosságaira utal.

5, Az oxidatív-nitratív stressz markerei, a PARP aktiváció és az AIF transzlokáció szignifikánsan korrelált a krónikus szívelégtelenség klinikai képével. A teljes vizsgálati csoportban a TAC kivételével minden vizsgált érték mind az ejekciós frakció, mind a pro-BNP mértékével szignifikáns korrelációt mutatott. A szívelégtelen csoporton belül az oxidatív stressz és a PARP aktiváció mutatott szignifikáns összefüggést a pro-BNP értékkel. Nemzetközi irodalommal összehangban a vizsgálatunk során a szívelégtelenségben kimutatott oxidatív stressz kialakulásáért felelős faktoroknak a koronária betegséget és a pro-BNP mértékét azonosítottuk.

8. Összefoglalás

A cukorbetegség vaszkuláris szövődményeinek kialakulásában és a szívelégtelenség hátterében a reaktív szabadgyökök központi szerepet játszanak, ami következményes poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációt eredményezhet. A PARP egy nukleáris enzim, ami képes az oxidatív, nitratív stressz okozta DNS károsodás felismerésére, aktiválódik és részt vesz a DNS *repair* mechanizmusában. Azonban a sejthalál különböző formáiban is szerepet vállalhat. Ezek közül kiemelendő a parthanatos jelensége, ahol a PARP aktiváció mellett az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációja is látható.

Kutatásaink célja volt a szabadgyökök által kiváltott PARP aktiváció jelenlétének vizsgálata kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Összefüggéseket kerestünk az egyes szövetekben megfigyelhető parthanatos jelenléte és az állatkísérletes modellben az ingadozó vércukorszint kiváltotta endotél diszfunkció, valamint humán krónikus szívelégtelenség között. Vizsgáltuk, hogy a vaszkuláris és a kardiális funkció eltéréseiben milyen mértékű enzim aktiváció mutatható ki.

Az ingadozó vércukorszint szignifikáns endotél függő relaxációs károsodást okozott az aortában, ami mellett a csontvelőben jelentős nitrotirozin festődés és az endotélben markáns PARP aktiváció volt látható. Az adekvát inzulin kezelés a csontvelőben, az endotélben és a keringő leukocitákban szignifikánsan csökkentette az enzim aktivációját. A szívelégtelenségben a perifériás vérben meghatározott oxidatív-nitratív stressz, a PARP aktiváció és az AIF transzlokáció mutattak jelentős emelkedést, amelyek szignifikánsan korreláltak az ejekciós frakció romlásával és a pro-BNP mértékével. A szívelégtelen csoporton belül az oxidatív stressz és a PARP aktiváció esetében volt látható pozitív korreláció a pro-BNP-vel. Eredményeink alapján a koronária betegség és a pro-BNP mértéke mutatott független korrelációt a szívelégtelenségben kimutatott oxidatív stressz mértékével.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a reaktív szabadgyökök jelenlétével jellemezhető, szív és érrendszeri betegségekben a PARP aktiváció kimutatható, és különböző mértékű összefüggéseket mutat a kardiovaszkuláris funkcionális eltérésekkel. Eredményeink nemcsak hozzájárulnak a PARP enzim szerepének megismeréséhez, hanem a klinikumban használható diagnosztikus és terápiás szerepvállalásának lehetőségére is felhívják a figyelmet.

Summary

Reactive free radicals causing poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation enable to play central role in the development of both the vascular complications of diabetes mellitus and heart failure. PARP is a nuclear enzyme involved in detection and repair of DNA damage in response to oxidative, nitrosative stress. On the other hand, it can also contribute to different types of cell death. Parthanatos is a form of cell death that is characterized by PARP activation and translocation of apoptosis inducing factor (AIF).

Our aim was to investigate PARP activation in cardiovascular diseases. We examined the possible relationship between markers of parthanatos detected in various tissues and endothelial dysfunction induced by glycemic oscillation in an animal model or human chronic heart failure. We also analyzed the correlation between enzyme activation and the level of vascular and cardiac dysfunction.

Impairment of endothelium-dependent relaxation of aortae induced by glycemic swings was detected together with significant nitrotyrosine staining of bone marrow cells and marked PARP activation in the endothelial layer. Due to adequate insulin treatment PARP activation was significantly reduced in the bone marrow cells, endothelium and circulating leukocytes. Peripheral blood markers of oxidative-nitrosative stress, PARP activation, and AIF translocation were significantly higher in the heart failure group. In all subjects, significant correlation of both pro-BNP levels and impairment of ejection fraction was showed with the latter parameters. Among heart failure patients, positive correlation of pro-BNP with PARP activation and oxidative stress was also found. According to our results, pro-BNP and coronary artery disease showed independent correlations to the degree of oxidative stress.

Our findings suggest that PARP activation can be detected in the mechanism of cardiovascular diseases and it is characterized by the presence of reactive free radicals and correlation can be demonstrated between enzyme activity and cardiovascular dysfunction. Our results not only contribute to the better understanding of PARP's role, but also attract attention to the possibility of its diagnostic and therapeutic involvement.

9. Irodalomjegyzék

1. Kohen R, Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30: 620-650.
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5: 9-19.
3. Munzel T, Gori T, Keaney JF, Jr, Maack C, Daiber A. (2015) Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J*, 36: 2555-2564.
4. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol*, 169: 1417-1429.
5. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, 37: 1613-1622.
6. Szabo C. (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 140-141: 105-112.
7. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. (2014) Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 24: 15-28.
8. Girolamo Maria FG. (2018) The ADP-Ribosyl-Transferases Diphtheria Toxin-Like (ARTDs) Family: An Overview. *Challenges*, 9: 24.
9. Virag L, Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54: 375-429.

10. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Soto M, Perez JM. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1: 39-53.
11. Luo X, Kraus WL. (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev*, 26: 417-432.
12. Robu M, Shah RG, Petitclerc N, Brind'Amour J, Kandan-Kulangara F, Shah GM. (2013) Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 1658-1663.
13. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem*, 277: 23028-23036.
14. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays*, 26: 882-893.
15. Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. (1993) Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J Biol Chem*, 268: 22575-22580.
16. Shall S. (1995) ADP-ribosylation reactions. *Biochimie*, 77: 313-318.
17. Ogata N, Ueda K, Kawaichi M, Hayaishi O. (1981) Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei. *J Biol Chem*, 256: 4135-4137.
18. Kun E, Kirsten E, Mendeleyev J, Ordahl CP. (2004) Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3, and ATP. *Biochemistry*, 43: 210-216.
19. Ungerstedt JS, Blomback M, Soderstrom T. (2003) Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol*, 131: 48-52.

20. Hegedus C, Lakatos P, Olah G, Toth BI, Gergely S, Szabo E, Biro T, Szabo C, Virag L. (2008) Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *FEBS Lett*, 582: 1672-1678.
21. Kraus WL, Hottiger MO. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol Aspects Med*, 34: 1109-1123.
22. Virag L, Szabo C. (2001) Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J*, 15: 99-107.
23. Zaremba T, Thomas HD, Cole M, Coulthard SA, Plummer ER, Curtin NJ. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers. *Biochem J*, 436: 671-679.
24. Pacher P, Szabo C. (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*, 25: 235-260.
25. D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci*, 114: 3771-3778.
26. Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO. (2000) Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem*, 275: 8121-8125.
27. Degterev A, Yuan J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 378-390.
28. Aredia F, Scovassi AI. (2014) Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochem Pharmacol*, 92: 157-163.
29. Wang Y, Kim NS, Haince JF, Kang HC, David KK, Andrabi SA, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. (2011) Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal*, 4: ra20.

30. Dolle C, Rack JG, Ziegler M. (2013) NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. *FEBS J*, 280: 3530-3541.
31. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. (2009) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*, 218: 193-202.
32. Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellicchia M, Blomgren K, Plesnila N. (2005) Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 25: 10262-10272.
33. Li X, Klaus JA, Zhang J, Xu Z, Kibler KK, Andrabi SA, Rao K, Yang ZJ, Dawson TM, Dawson VL, Koehler RC. (2010) Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 113: 1012-1022.
34. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ, Naghavi M. (2014) Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*, 129: 1483-1492.
35. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). (2011) National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*, 377: 557-567.
36. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). (2011) National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378: 31-40.

37. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Authors/Task Force Members, Document Reviewers. (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 18: 891-975.
38. Klein L, Gheorghide M. (2004) Coronary artery disease and prevention of heart failure. *Med Clin North Am*, 88: 1209-1235.
39. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*, 12: 773-790.
40. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. (2009) Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 32 Suppl 2: S314-21.
41. Fonyó A. Lipidmediátorok az intercelluláris jelátvitelben. Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 74-76.
42. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancina G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ, Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*, 23: 233-246.
43. Soriano FG, Virag L, Szabo C. (2001) Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med*, 79: 437-448.

44. Calles-Escandon J, Cipolla M. (2001) Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*, 22: 36-52.
45. Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbuhl S, Diem P. (2006) Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J*, 152: 27-38.
46. Authors/Task Force Members, Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J, Patrono C, Seferovic P, Uva MS, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Document Reviewers, De Backer G, Sirnes PA, Ezquerra EA, Avogaro A, Badimon L, Baranova E, Baumgartner H, Betteridge J, Ceriello A, Fagard R, Funck-Brentano C, Gulba DC, Hasdai D, Hoes AW, Kjekshus JK, Knuuti J, Kolh P, Lev E, Mueller C, Neyses L, Nilsson PM, Perk J, Ponikowski P, Reiner Z, Sattar N, Schachinger V, Scheen A, Schirmer H, Stromberg A, Sudzhaeva S, Tamargo JL, Viigimaa M, Vlachopoulos C, Xuereb RG. (2013) ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*, 34: 3035-3087.
47. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. (2012) The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*, 126: 753-767.
48. Xu Y, Arora RC, Hiebert BM, Lerner B, Szwajcer A, McDonald K, Rigatto C, Komenda P, Sood MM, Tangri N. (2014) Non-invasive endothelial function testing and the risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 15: 736-746.

49. Lerman A, Zeiher AM. (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation*, 111: 363-368.
50. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. (2004) The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol*, 43: 616-623.
51. Asselbergs FW, Monnick SH, Jessurun GA, van Boven AJ, Veeger NJ, Zijlstra F, van Gilst WH, Tio RA. (2004) Assessing the prognostic value of coronary endothelial function in patients referred for a first coronary angiogram. *Am J Cardiol*, 94: 1063-1067.
52. Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW. (1990) Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 81: 772-779.
53. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. (1991) Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*, 84: 1589-1596.
54. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. (1998) Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 97: 363-368.
55. Hornig B, Maier V, Drexler H. (1996) Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 93: 210-214.
56. Hornig B, Arakawa N, Haussmann D, Drexler H. (1998) Differential effects of quinaprilat and enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 98: 2842-2848.
57. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, Drexler H. (2005) Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J*, 26: 65-69.

58. Gevaert AB, Lemmens K, Vrints CJ, Van Craenenbroeck EM. (2017) Targeting Endothelial Function to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The Promise of Exercise Training. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 4865756.
59. Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. (2012) Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 60: 1455-1469.
60. Ledoux J, Gee DM, Leblanc N. (2003) Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggests an alteration in vascular smooth muscle function. *Br J Pharmacol*, 139: 1245-1248.
61. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Authors/Task Force Members, Document Reviewers. (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 18: 891-975.
62. Daniels LB, Maisel AS. (2007) Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*, 50: 2357-2368.
63. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. (1994) Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*, 90: 195-203.
64. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). (2012) The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J*, 33: 1750-1757.
65. Seferovic PM, Petrie MC, Filippatos GS, Anker SD, Rosano G, Bauersachs J, Paulus WJ, Komajda M, Cosentino F, de Boer RA, Farmakis D, Doehner W, Lambrinou E,

Lopatin Y, Piepoli MF, Theodorakis MJ, Wiggers H, Lekakis J, Mebazaa A, Mamas MA, Tschope C, Hoes AW, Seferovic JP, Logue J, McDonagh T, Riley JP, Milinkovic I, Polovina M, van Veldhuisen DJ, Lainscak M, Maggioni AP, Ruschitzka F, McMurray JJV. (2018) Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*, 20: 853-872.

66. Jia G, Hill MA, Sowers JR. (2018) Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*, 122: 624-638.

67. Braunwald E, Kloner RA. (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 76: 1713-1719.

68. Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengeller Z, Salzman AL, Szabo C. (1997) Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovasc Res*, 36: 205-215.

69. Szabo C. (2005) Cardioprotective effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Pharmacol Res*, 52: 34-43.

70. Khan TA, Ruel M, Bianchi C, Voisine P, Komjati K, Szabo C, Sellke FW. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves postischemic myocardial function after cardioplegia-cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Surg*, 197: 270-277.

71. Murthy KG, Xiao CY, Mabley JG, Chen M, Szabo C. (2004) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in circulating leukocytes during myocardial infarction. *Shock*, 21: 230-234.

72. Toth-Zsamboki E, Horvath E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengeller Z, Barany T, Pek T, Fekete K, Kiss RG, Preda I, Lacza Z, Gero D, Szabo C. (2006) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med*, 12: 221-228.

73. Szabo C. (2009) Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol*, 156: 713-727.

74. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*, 140-141: 113-124.
75. Pacher P, Szabo C. (2005) Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid Redox Signal*, 7: 1568-1580.
76. Testa R, Bonfigli AR, Prattichizzo F, La Sala L, De Nigris V, Ceriello A. (2017) The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*, 9: 10.3390/nu9050437.
77. Piconi L, Quagliario L, Da Ros R, Assaloni R, Giugliano D, Esposito K, Szabo C, Ceriello A. (2004) Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Thromb Haemost*, 2: 1453-1459.
78. La Sala L, Cattaneo M, De Nigris V, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, Ceriello A. (2016) Oscillating glucose induces microRNA-185 and impairs an efficient antioxidant response in human endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*, 15: 71-016-0390-9.
79. Zakaria EM, El-Bassossy HM, El-Maraghy NN, Ahmed AF, Ali AA. (2016) PARP-1 inhibition alleviates diabetic cardiac complications in experimental animals. *Eur J Pharmacol*, 791: 444-454.
80. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. (2008) Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 57: 1349-1354.
81. Muggeo M, Verlato G, Bonora E, Zoppini G, Corbellini M, de Marco R. (1997) Long-term instability of fasting plasma glucose, a novel predictor of cardiovascular mortality in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Verona Diabetes Study. *Circulation*, 96: 1750-1754.

82. Ceriello A, Ihnat MA. (2010) 'Glycaemic variability': a new therapeutic challenge in diabetes and the critical care setting. *Diabet Med*, 27: 862-867.
83. Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Henkel E, Leonhardt W, Fuecker K, Hanefeld M. (2000) Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. *Diabetes Care*, 23: 1830-1834.
84. Krinsley JS. (2008) Glycemic variability: a strong independent predictor of mortality in critically ill patients. *Crit Care Med*, 36: 3008-3013.
85. Khunti K, Davies M, Majeed A, Thorsted BL, Wolden ML, Paul SK. (2015) Hypoglycemia and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in insulin-treated people with type 1 and type 2 diabetes: a cohort study. *Diabetes Care*, 38: 316-322.
86. Zinman B, Marso SP, Poulter NR, Emerson SS, Pieber TR, Pratley RE, Lange M, Brown-Frandsen K, Moses A, Ocampo Francisco AM, Barner Lekdorf J, Kvist K, Buse JB, DEVOTE Study Group. (2018) Day-to-day fasting glycaemic variability in DEVOTE: associations with severe hypoglycaemia and cardiovascular outcomes (DEVOTE 2). *Diabetologia*, 61: 48-57.
87. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*, 106: 3073-3078.
88. Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, O'Rourke B, Maack C. (2010) Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation*, 121: 1606-1613.
89. Hasenfuss G, Teerlink JR. (2011) Cardiac inotropes: current agents and future directions. *Eur Heart J*, 32: 1838-1845.

90. Tian N, Moore RS, Braddy S, Rose RA, Gu JW, Hughson MD, Manning RD, Jr. (2007) Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H3388-H3395.
91. Shah KB, Kop WJ, Christenson RH, Diercks DB, Henderson S, Hanson K, Li SY, deFilippi CR. (2011) Prognostic utility of ST2 in patients with acute dyspnea and preserved left ventricular ejection fraction. *Clin Chem*, 57: 874-882.
92. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbely A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ. (2008) Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117: 43-51.
93. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ. (2009) Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*, 104: 780-786.
94. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 11: 214-222.
95. Paulus WJ, Tschope C. (2013) A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 62: 263-271.
96. Munzel T, Gori T, Keaney JF, Jr, Maack C, Daiber A. (2015) Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J*, 36: 2555-2564.
97. Silberman GA, Fan TH, Liu H, Jiao Z, Xiao HD, Lovelock JD, Boulden BM, Widder J, Fredd S, Bernstein KE, Wolska BM, Dikalov S, Harrison DG, Dudley SC, Jr. (2010) Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation*, 121: 519-528.

98. Lovelock JD, Monasky MM, Jeong EM, Lardin HA, Liu H, Patel BG, Taglieri DM, Gu L, Kumar P, Pokhrel N, Zeng D, Belardinelli L, Sorescu D, Solaro RJ, Dudley SC, Jr. (2012) Ranolazine improves cardiac diastolic dysfunction through modulation of myofilament calcium sensitivity. *Circ Res*, 110: 841-850.
99. Jeong EM, Dudley SC, Jr. (2014) New diagnostic and therapeutic possibilities for diastolic heart failure. *R I Med J* (2013), 97: 35-37.
100. Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P. (2005) Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol*, 3: 221-229.
101. Polidori MC, Pratico D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. (2004) Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail*, 10: 334-338.
102. Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. (1998) Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J*, 19: 1814-1822.
103. Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. (2002) Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation*, 106: 221-226.
104. Givertz MM, Anstrom KJ, Redfield MM, Deswal A, Haddad H, Butler J, Tang WH, Dunlap ME, LeWinter MM, Mann DL, Felker GM, O'Connor CM, Goldsmith SR, Ofili EO, Saltzberg MT, Margulies KB, Cappola TP, Konstam MA, Semigran MJ, McNulty SE, Lee KL, Shah MR, Hernandez AF, NHLBI Heart Failure Clinical Research Network. (2015) Effects of Xanthine Oxidase Inhibition in Hyperuricemic Heart Failure Patients: The Xanthine Oxidase Inhibition for Hyperuricemic Heart Failure Patients (EXACT-HF) Study. *Circulation*, 131: 1763-1771.
105. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. (2002) The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes*, 51: 514-521.

106. Pillai JB, Russell HM, Raman J, Jeevanandam V, Gupta MP. (2005) Increased expression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 contributes to caspase-independent myocyte cell death during heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H486-96.
107. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C. (2002) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 862-867.
108. Pacher P, Cziraki A, Mabley JG, Liaudet L, Papp L, Szabo C. (2002) Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in endotoxin-induced cardiac collapse in rodents. *Biochem Pharmacol*, 64: 1785-1791.
109. Xiao CY, Chen M, Zsengeller Z, Li H, Kiss L, Kollai M, Szabo C. (2005) Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 891-898.
110. Qin WD, Liu GL, Wang J, Wang H, Zhang JN, Zhang F, Ma Y, Ji XY, Li C, Zhang MX. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Oncotarget*, 7: 35618-35631.
111. Molnar A, Toth A, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Vaszily M, Galajda Z, Papp JG, Varro A, Szuts V, Lacza Z, Gero D, Szabo C. (2006) Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Mol Med*, 12: 143-152.
112. Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Teixeira AC, Cappi SB, Lotufo PA, Bernik MM, Zsengeller Z, Chen M, Szabo C. (2006) Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med*, 34: 1073-1079.
113. Pillai JB, Russell HM, Raman J, Jeevanandam V, Gupta MP. (2005) Increased expression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 contributes to caspase-independent myocyte cell death during heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H486-96.

114. Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem*, 280: 43121-43130.
115. Furman BL. (2015) Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*, 70: 5.47.1-20.
116. Zaccardi F, Pitocco D, Ghirlanda G. (2009) A rat model of glycaemic variability. *Diabetologia*, 52: 1689-90; author reply 1691-1692.
117. Horvath E, Szabo C. (2009) A rat model of glycaemic variability. Reply to Zaccardi F, Pitocco D, Ghirlanda G letter]. *Diabetologia*, 52: 1691-1692.
118. Shi Y, Vanhoutte PM. (2017) Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*, 9: 434-449.
119. Torimoto K, Okada Y, Mori H, Tanaka Y. (2013) Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 12: 1-2840-12-1.
120. Azuma K, Kawamori R, Toyofuku Y, Kitahara Y, Sato F, Shimizu T, Miura K, Mine T, Tanaka Y, Mitsumata M, Watada H. (2006) Repetitive fluctuations in blood glucose enhance monocyte adhesion to the endothelium of rat thoracic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 2275-2280.
121. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. (2006) Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*, 295: 1681-1687.
122. Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. (1997) Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res*, 34: 145-156.
123. Pinna C, Cignarella A, Zanardo R, Bolego C, Puglisi L. (2001) Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 431: 71-79.

124. Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, Szabo C. (2001) Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res*, 89: 684-691.
125. Han X, Shaligram S, Zhang R, Anderson L, Rahimian R. (2016) Sex-specific vascular responses of the rat aorta: effects of moderate term (intermediate stage) streptozotocin-induced diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 94: 408-415.
126. Jung HS. (2015) Clinical Implications of Glucose Variability: Chronic Complications of Diabetes. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 30: 167-174.
127. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. (2009) Effect of glucose variability on the long-term risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 32: 1901-1903.
128. Bragd J, Adamson U, Backlund LB, Lins PE, Moberg E, Oskarsson P. (2008) Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? *Diabetes Metab*, 34: 612-616.
129. Gimeno-Orna JA, Castro-Alonso FJ, Boned-Juliani B, Lou-Arnal LM. (2003) Fasting plasma glucose variability as a risk factor of retinopathy in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*, 17: 78-81.
130. Zoppini G, Verlato G, Targher G, Casati S, Gusson E, Biasi V, Perrone F, Bonora E, Muggeo M. (2009) Is fasting glucose variability a risk factor for retinopathy in people with type 2 diabetes? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19: 334-339.
131. Muggeo M, Verlato G, Bonora E, Zoppini G, Corbellini M, de Marco R. (1997) Long-term instability of fasting plasma glucose, a novel predictor of cardiovascular mortality in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Verona Diabetes Study. *Circulation*, 96: 1750-1754.

132. Siegelaar SE, Kerr L, Jacober SJ, Devries JH. (2011) A decrease in glucose variability does not reduce cardiovascular event rates in type 2 diabetic patients after acute myocardial infarction: a reanalysis of the HEART2D study. *Diabetes Care*, 34: 855-857.
133. Esposito K, Giugliano D, Nappo F, Marfella R, Campanian Postprandial Hyperglycemia Study Group. (2004) Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 110: 214-219.
134. Mo Y, Zhou J, Li M, Wang Y, Bao Y, Ma X, Li D, Lu W, Hu C, Li M, Jia W. (2013) Glycemic variability is associated with subclinical atherosclerosis in Chinese type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*, 12: 15-2840-12-15.
135. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. (2008) Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 358: 2560-2572.
136. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. (2003) Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 348: 383-393.
137. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. (1993) Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*, 88: 2149-2155.
138. Sjöholm A, Nystrom T. (2005) Endothelial inflammation in insulin resistance. *Lancet*, 365: 610-612.
139. Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Caselli A, Caballero AE, Economides PA, Veves A, Horton ES. (2003) Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*, 26: 2119-2125.

140. Zoungas S, Woodward M, Li Q, Cooper ME, Hamet P, Harrap S, Heller S, Marre M, Patel A, Poulter N, Williams B, Chalmers J, ADVANCE Collaborative group. (2014) Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 57: 2465-2474.
141. Turnbull FM, Abraira C, Anderson RJ, Byington RP, Chalmers JP, Duckworth WC, Evans GW, Gerstein HC, Holman RR, Moritz TE, Neal BC, Ninomiya T, Patel AA, Paul SK, Travert F, Woodward M. (2009) Intensive glucose control and macrovascular outcomes in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52: 2288-2298.
142. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. (2008) 10-Year Follow-Up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 359: 1577-1589.
143. ORIGIN Trial Investigators, Gerstein HC, Bosch J, Dagenais GR, Diaz R, Jung H, Maggioni AP, Pogue J, Probstfield J, Ramachandran A, Riddle MC, Ryden LE, Yusuf S. (2012) Basal insulin and cardiovascular and other outcomes in dysglycemia. *N Engl J Med*, 367: 319-328.
144. Garcia Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. (2001) Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med*, 7: 108-113.
145. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. (1997) Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest*, 100: 723-735.
146. Obrosova IG, Mabley JG, Zsengeller Z, Charniauskaya T, Abatan OI, Groves JT, Szabo C. (2005) Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB J*, 19: 401-403.
147. Piconi L, Quagliari L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A. (2006) Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev*, 22: 198-203.

148. Wu N, Shen H, Liu H, Wang Y, Bai Y, Han P. (2016) Acute blood glucose fluctuation enhances rat aorta endothelial cell apoptosis, oxidative stress and pro-inflammatory cytokine expression in vivo. *Cardiovasc Diabetol*, 15: 109-016-0427-0.
149. Horvath EM, Benko R, Gero D, Kiss L, Szabo C. (2008) Treatment with insulin inhibits poly(ADP-ribose)polymerase activation in a rat model of endotoxemia. *Life Sci*, 82: 205-209.
150. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*, 8: 31-811X-8-31.
151. Szabo C, Pacher P, Swanson RA. (2006) Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 626-630.
152. Adaikalakoteswari A, Rema M, Mohan V, Balasubramanyam M. (2007) Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 1673-1684.
153. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. (2005) Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci*, 26: 302-310.
154. Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Nakamura Y, Miura A, Nishii N, Banba K, Nagase S, Miyaji K, Morita H, Saito H, Emori T, Ohe T. (2005) Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail*, 11: 117-123.
155. Kawai K, Qin F, Shite J, Mao W, Fukuoka S, Liang CS. (2004) Importance of antioxidant and antiapoptotic effects of beta-receptor blockers in heart failure therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H1003-H1012.
156. Krysiak R, Okopien B. (2008) Pleiotropic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in normotensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Rep*, 60: 514-523.

157. Nicholls SJ, Wang Z, Koeth R, Levison B, DeFraio B, Dzavik V, Griffith OW, Hathaway D, Panza JA, Nissen SE, Hochman JS, Hazen SL. (2007) Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation*, 116: 2315-2324.
158. Messner B, Bernhard D. (2014) Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 509-515.
159. Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, Haworth RA. (2005) Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation*, 111: 988-995.
160. Szabo C. (2009) Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol*, 156: 713-727.
161. Li L, Hu B, Gong S, Yu Y, Dai H, Yan J. (2014) Association of poly(ADP-ribose) polymerase activity in circulating mononuclear cells with myocardial dysfunction in patients with septic shock. *Chin Med J (Engl)*, 127: 2775-2778.
162. Sanchez-Trujillo L, Vazquez-Garza E, Castillo EC, Garcia-Rivas G, Torre-Amione G. (2017) Role of Adaptive Immunity in the Development and Progression of Heart Failure: New Evidence. *Arch Med Res*, 48: 1-11.
163. Zhao YJ, Liu FQ, Xiu CH, Jiang J, Wang JH, Xu YS, Fu SY, Huang Q. (2014) The effects of high thoracic epidural anesthesia on sympathetic activity and apoptosis in experimentally induced congestive heart failure. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 28: 317-322.
164. Santaguida PL, Don-Wauchope AC, Oremus M, McKelvie R, Ali U, Hill SA, Balion C, Booth RA, Brown JA, Bustamam A, Sohel N, Raina P. (2014) BNP and NT-proBNP as prognostic markers in persons with acute decompensated heart failure: a systematic review. *Heart Fail Rev*, 19: 453-470.

165. van Veldhuisen DJ, Linssen GC, Jaarsma T, van Gilst WH, Hoes AW, Tijssen JG, Paulus WJ, Voors AA, Hillege HL. (2013) B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*, 61: 1498-1506.
166. Szabo C, Zanchi A, Komjati K, Pacher P, Krolewski AS, Quist WC, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. (2002) Poly(ADP-Ribose) polymerase is activated in subjects at risk of developing type 2 diabetes and is associated with impaired vascular reactivity. *Circulation*, 106: 2680-2686.
167. Henning RJ, Bourgeois M, Harbison RD. (2018) Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Toxicol*, 18: 493-506.
168. Halmosi R, Deres L, Gal R, Eros K, Sumegi B, Toth K. (2016) PARP inhibition and postinfarction myocardial remodeling. *Int J Cardiol*, 217 Suppl: S52-9.
169. Palfi A, Toth A, Hanto K, Deres P, Szabados E, Szereday Z, Kulcsar G, Kalai T, Hideg K, Gallyas F, Jr, Sumegi B, Toth K, Halmosi R. (2006) PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3beta pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 41: 149-159.
170. Wang H, Yang X, Yang Q, Gong L, Xu H, Wu Z. (2018) PARP-1 inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through regulating autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 503: 1625-1632.
171. Zhao H, Zhang J, Hong G. (2018) Minocycline improves cardiac function after myocardial infarction in rats by inhibiting activation of PARP-1. *Biomed Pharmacother*, 97: 1119-1124.
172. Morrow DA, Brickman CM, Murphy SA, Baran K, Krakover R, Dauerman H, Kumar S, Slomowitz N, Grip L, McCabe CH, Salzman AL. (2009) A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in

patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial. *J Thromb Thrombolysis*, 27: 359-364.

173. Bartha E, Kiss GN, Kalman E, Kulcsar G, Kalai T, Hideg K, Habon T, Sumegi B, Toth K, Halmosi R. (2008) Effect of L-2286, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor and enalapril on myocardial remodeling and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 52: 253-261.

174. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. (2014) Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171: 2000-2016.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Barany T**, Simon A, Szabo G, Benko R, Mezei Z, Molnar L, Becker D, Merkely B, Zima E, Horvath EM. (2017) Oxidative Stress-Related Parthanatos of Circulating Mononuclear Leukocytes in Heart Failure. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 1249614. **IF: 4,936**
2. Horvath EM, Benko R, Kiss L, Muranyi M, Pek T, Fekete K, **Barany T**, Somlai A, Csordas A, Szabo C. (2009) Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 52: 952-961. **IF: 6,551**

10.2 Disszertációtól független közlemények

1. Toth-Zsamboki E, Horvath E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengeller Z, **Barany T**, Pek T, Fekete K, Kiss RG, Preda I, Lacza Z, Gero D, Szabo C. (2006) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med*, 12: 221-228. **IF:2,708**
2. **Bárány T**, Muk B, Osztheimer I, Szilágyi Sz, Molnár L, Kutyifa V, Becker D, Gellér L, Merkely B, Zima E. (2011) Pacemaker-implantált betegek telekardiológiai utánkövetése – Hazai tapasztalatok a Home Monitoring rendszerrel. *Card Hu*, 41: 231-238.
3. Boriani G, Da Costa A, Ricci RP, Quesada A, Favale S, Iacopino S, Romeo F, Risi A, Mangoni di S Stefano L, Navarro X, Biffi M, Santini M, Burri H, MORE-CARE Investigators (**Barany T**). (2013) The MOonitoring Resynchronization dEVICES and CARdiac patiEnts (MORE-CARE) randomized controlled trial: phase 1 results on dynamics of early intervention with remote monitoring. *J Med Internet Res*, 15: e167. **IF: 4,669**

4., **Bárány T**, Szilágyi Sz, Molnár L, Gellér L, Hüttl K, Merkely B, Zima E. (2013) Carotis-intervenciót követő hemodinamikai instabilitás kezelése. Card Hu, 43: 8-10.

5. Csobay-Novak C, **Barany T**, Zima E, Nemes B, Sotonyi P, Merkely B, Huttli K. (2015) Role of stent selection in the incidence of persisting hemodynamic depression after carotid artery stenting. J Endovasc Ther, 22: 122-129. **IF: 3,128**

6. Zima E, Dér G, **Bárány T**, Németh T, Molnár L, Osztheimer I, Szilágyi Sz, Király Á, Papp R, Tarjányi Z, Kiss O, Kosztin A, Nagy Klaudia V, Muk B, Kiss B, Nagy A, Bokrosné Magyar E, Csobánné Oláh Cs, Gellér L, Merkely B. (2017) A telemonitorozás lehetőségei beültethető kardiális elektronikus eszközökkel. Card Hu, 47: 281-289.

7. Papai G, Csato G, Racz I, Szabo G, **Barany T**, Racz A, Szokol M, Sarman B, Edes IF, Czuriga D, Kolozsvari R, Edes I. (2018) The transtelephonic electrocardiogram-based triage is an independent predictor of decreased hospital mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. J Telemed Telecare, 1357633X18814335. **IF: 3.046**

11. Köszönetnyilvánítás

Disszertációm végén köszönetet mondok mindenkinek, akik segítettek a munkámat. Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Horváth Eszter Mária tanárnőnek, hogy PhD hallgatónak elfogadott és szakmai tudásával mindvégig felügyelte és segítette munkámat.

Köszönetet mondok Dr. Szabó Csaba tanár úrnak, amiért támogatta, hogy diákköri munkámat a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézetben elindíthassam. Köszönetet mondok Dr. Merkely Béla professzor úrnak, hogy a kardiológiai szakképzésem alatt támogatta a kutatásomat. Hálás vagyok Dr. Zima Endre főorvos úrnak, hogy a szakmai felügyeletével folyamatosan segítette a munkámat. Köszönettel tartozom Dr. Skopál Judit főorvosnőnek, hogy a kutatásomhoz szükséges labormunkákat segítette.

Köszönöm Dr. Benyó Zoltán professzor úrnak és Dr. Hunyady László professzor úrnak, hogy a PhD képzésemet támogatták. Köszönöm közvetlen munkatársaimnak: Benkő Ritának, Mezei Zsuzsannának, Szabó Gergőnek, Tiago Grohmann Pereira kollégának, Dr. Simon Andreának támogató együttműködésüket. Továbbá köszönetet mondok a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika és az Élettani Intézet minden munkatársának, akik segítettek kutatásomat.

Köszönöm a Doktori Iskola Hivatalának minden kolléganőjének, hogy mindig segítettek a PhD képzés adminisztrációs teendőiben. Végezetül köszönetet mondok szüleimnek, feleségemnek, amiért eltűrték, megértették és elfogadták távolléteket, amikor a mindennapi betegellátás mellett a kutatói munkámra is időt, energiát kívántam fordítani!