

POTENCIÁLIS FARMAKOLÓGIAI CÉLPONTOK VIZSGÁLATA HIPERTENZÍV CÉLSZERV-KÁROSODÁS KIALAKULÁSÁBAN ÉS PROGRESSZIÓJÁBAN

Ph.D. tézis

Szerző: Deres László

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Témavezető: Dr. Halmosi Róbert Ph.D.



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

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

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

Bevezetés

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

A krónikus hipertenzió állatkísérletes modellje

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

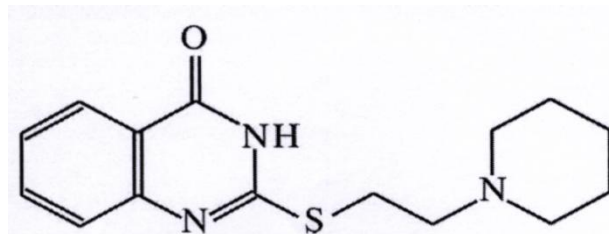
A hipertenzó másik fontos, korai következménye a vaszkuláris remodelling kialakulása, amit a vaszkuláris simaizom sejtek hipertrofiája és a megnövekedett extracelluláris mátrix produkció jellemez. A remodeláció kezdetben adaptív összetevője egy a krónikus nyomástúlterhelés hatására kialakuló folyamatnak,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

A PARP gátlás kardiovaszkuláris hatásai

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

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

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



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

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

A bradykinin B1 receptor antagonisták jelentősége

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

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

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

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

Célkitűzések

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

-Jelen kísérlet célja hogy a PARP-gátlás kardioprotektív hatásának új molekuláris mechanizmusait tárja fel.

-Vizsgáltuk a kardiális fibrózisra gyakorolt hatását.

- Megvizsgáltuk, hogy a PARP gátló L-2286 kedvezően befolyásolja-e a kardiális remodellingben érintett jelátviteli utak mintázatát.

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

-Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonizmus testtömegre, tápfogyasztásra, és vérnyomásra gyakorolt hatását.

- Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonizmus hatását a hipertenzió indukálta kardiovaszkuláris remodellingre (intima media vastagság, interstitialis fibrózis, bal kamra hipertrófia).

-Vizsgáltuk a bradykinin B1 receptor antagonistá esetleges kedvező hatásait a kardiovaszkuláris remodellingben érintett jelátviteli utakra.

A PARP GÁTLÁS HATÁSA A KARDIÁLIS REMODELLINGBEN

A PARP gátlás hatása spontán hipertenzív patkányok gravimetrikus paramétereire

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

	WKY	SHR-C	SHR-L
BW ^{6w} (g)	71.01±1.89	72.02±2.36	69.9±3.21
BW ^{30w} (g)	393±14.01	323.8±11.27 ^a	321.86±6.8 ^{a,c}
WV (g)	1.16±0.17	1.45±0.18 ^b	1.24±0.24 ^{b,c}
WV/BW (mg/g)	2.95±0.17	4.48±0.12 ^b	3.85±0.15 ^{b,c}
Lung wet weight/dry weight	4.84±0.92	4.79±0.84	4.77±0.99
p-BNP (ng/ml)	2.19±0.011	2.33±0.034	2.31±0.031

1. táblázat: L-2286 kezelés hatása a gravimetrikus paraméterekre és a plazma BNP szintre SHR patkányokban. WKY: normotenzív koregyeztetett kontroll patkányok (n=7), SHR-C: SHR kontroll patkányok (n=8), SHR-L: 24 hétig L-2286-tal kezelt SHR patkányok (n=9). BW^{6w}: 6 hetes patkányok testsúlya, BW: testsúly, WV: kamrák súlya, BNP: B-típusú natriuretikus peptid. ±S.E.M. ^a<0.01 (vs. WKY), ^b<0.05 (vs. WKY), ^c<0.05 (vs. SHR-C).

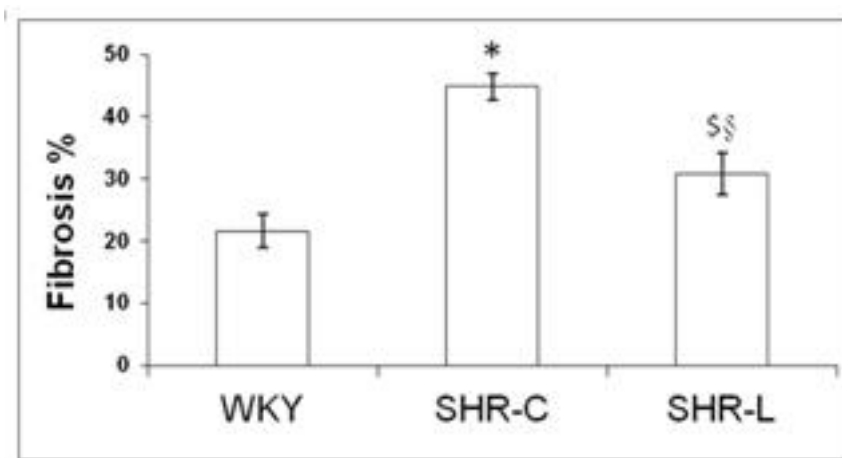
Az L-2286 kezelés nem befolyásolta a BNP plazma szintjét és a vérnyomást

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

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

Az L-2286 csökkentette az intersticiális fibrózist a szívizomban

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



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

A PARP gátlás csökkentette a bal kamra hipertrófiát spontán hipertenzív patkányokban

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Az L-2286 hatása a Hsp72 és 90 mennyiségére

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

Az L-2286 hatása a MAPK-ra

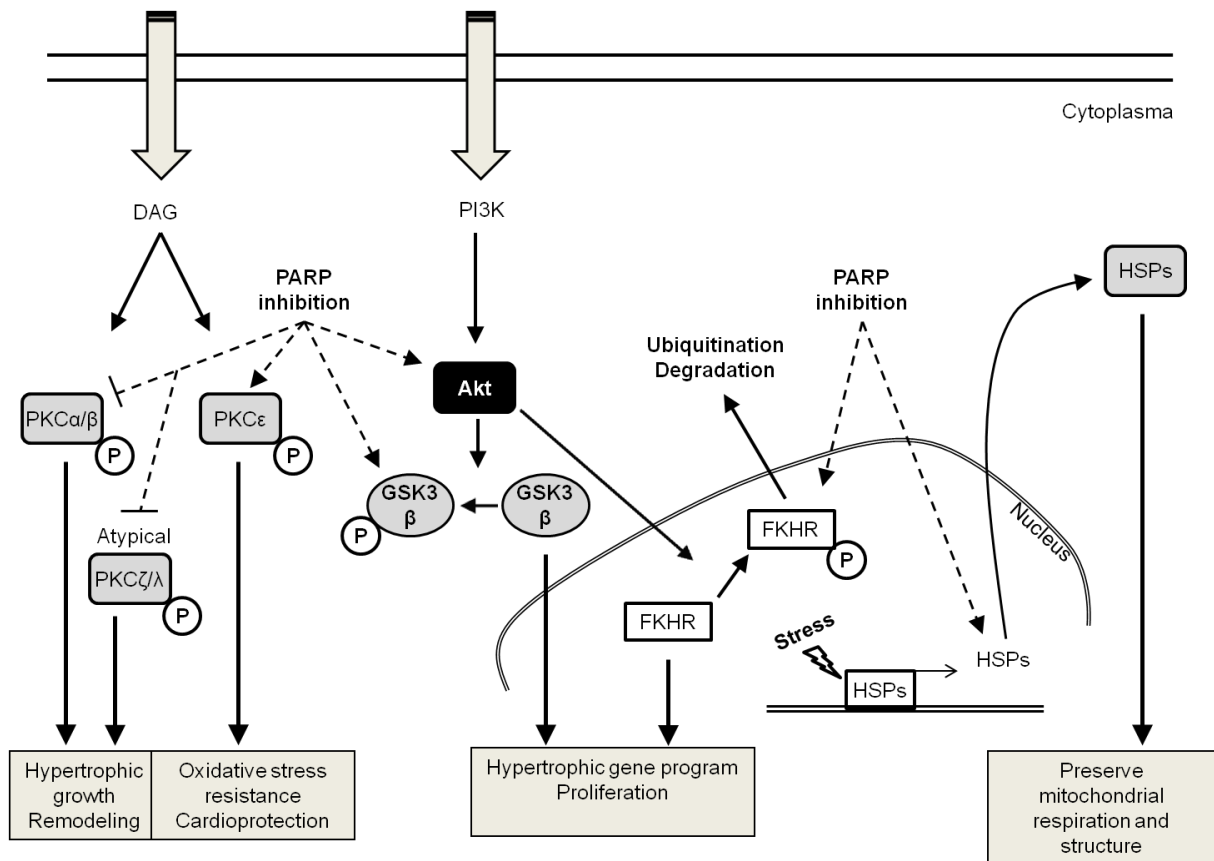
A p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}, ERK 1/2^{Thr183-Tyr185} és JNK foszforilációja a WKY csoportban bizonyult a legalacsonyabbnak az SHR-C és SHR-L csoportokhoz képest (p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}: p<0.01 vs. SHR csoportok, ERK 1/2: p<0.05 vs. SHR csoportok, JNK: p<0.05 vs. SHR csoportok). A p38-MAPK^{Thr180-Gly-Tyr182}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

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

Az L-2286 kezelés hatása a PKC izoformák foszforilációjára

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

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

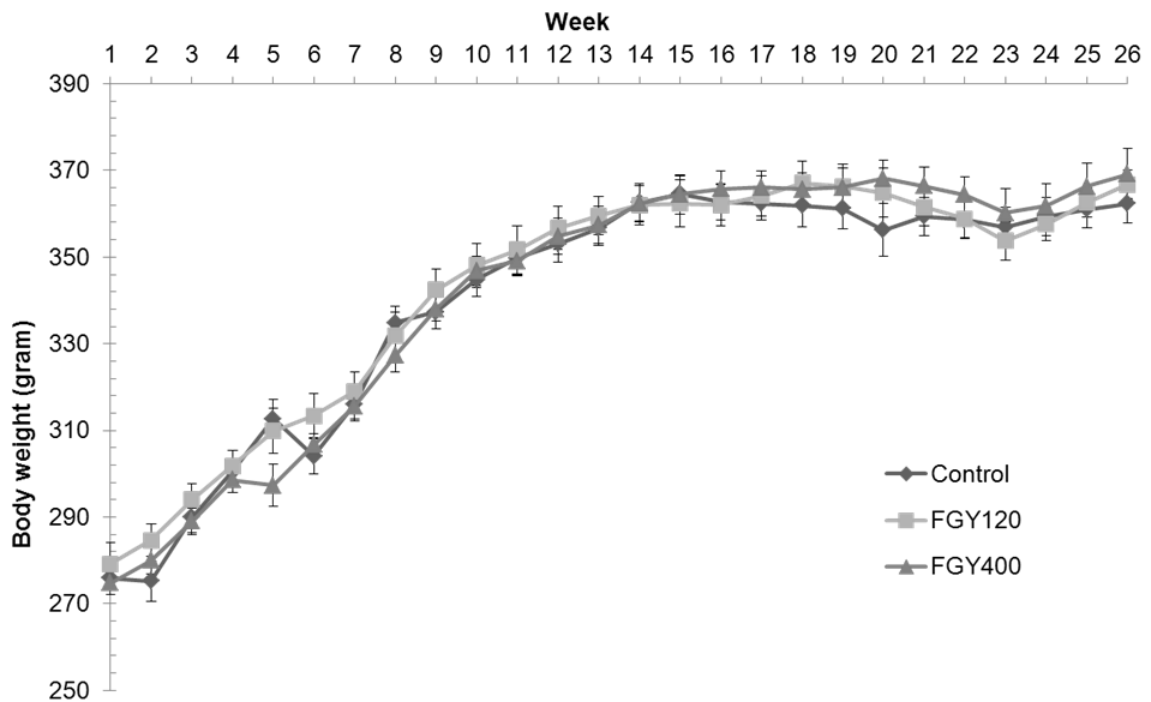


3. ábra: Az L-2286 hatása a vizsgált jelátviteli utakra.

EGY BRADYKININ B1 RECEPTOR ANTAGONISTA HATÁSA HIPERTENZÍV CÉLSZERV-KÁROSODÁSBAN

Az FGY-1153 kezelés hatása a testtömegre

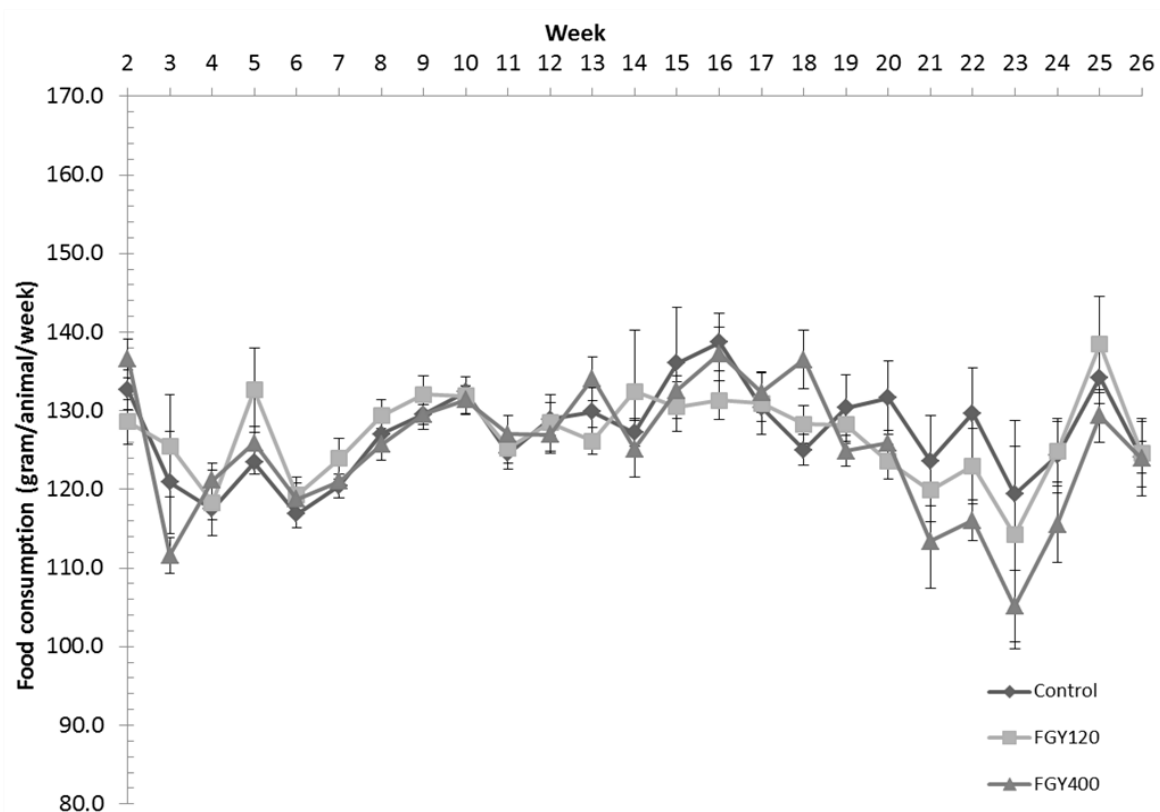
A testtömeget a kezelés időtartama alatt hetente mértük és rögzítettük. Nem volt szignifikáns különbség a három csoport között. (4. ábra)



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

Az FGY-1153 kezelés tápfogyasztásra gyakorolt hatása

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



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

Az FGY-1153 kezelés hatása a vérnyomásra

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

Az FGY-1153 kezelés hatása az echokardiográfias paraméterekre

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

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

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

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

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

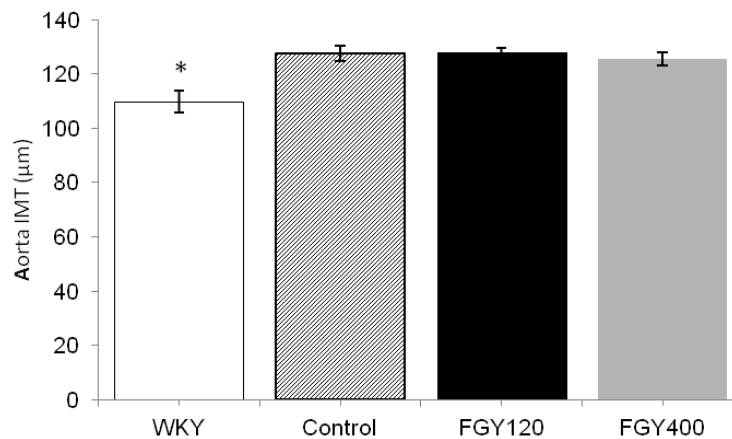
Az FGY-1153 hatása az intersticiális fibrózisra a szívben és a nagyerekben

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

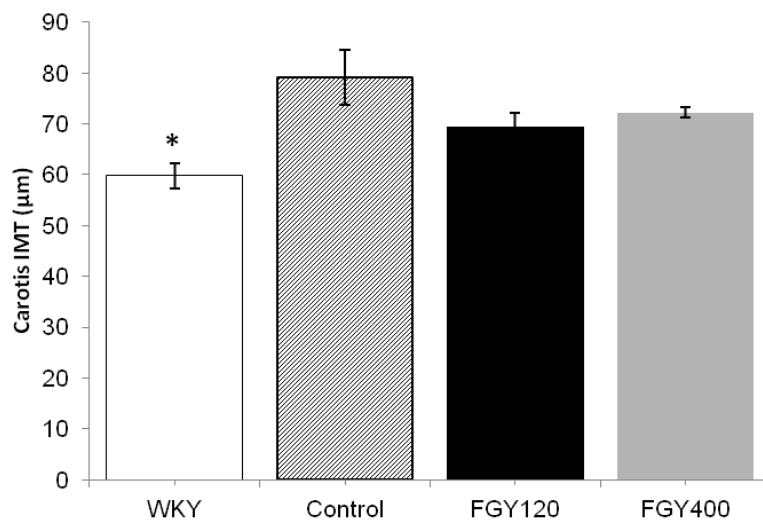
szignifikáns emelkedése figyelhető meg a Kontroll csoport carotisaiban és az aortáiban a WKY csoporthoz képest. A Kontroll, FGY120 és FGY400 csoportok értékei között szignifikáns különbség azonban nem mutatkozott (Mean area fractions \pm SEM: Aorta: WKY: 1.084 ± 0.112 ($p=0.536$ vs. Kontroll); Kontroll: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

Az FGY-1153 hatása a nagyerek intima media vastagságára

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



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

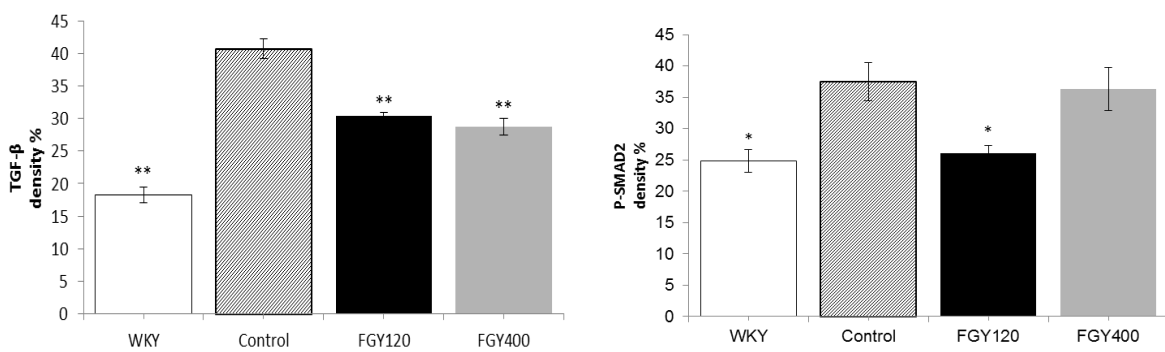
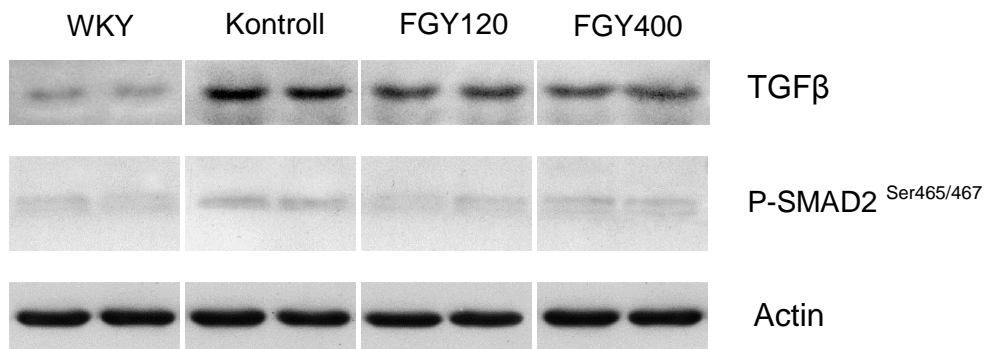


7.ábra: Az FGY-1153 hatása a carotis intima media vastagságára. (* $p < 0.05$ vs. Control group).

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

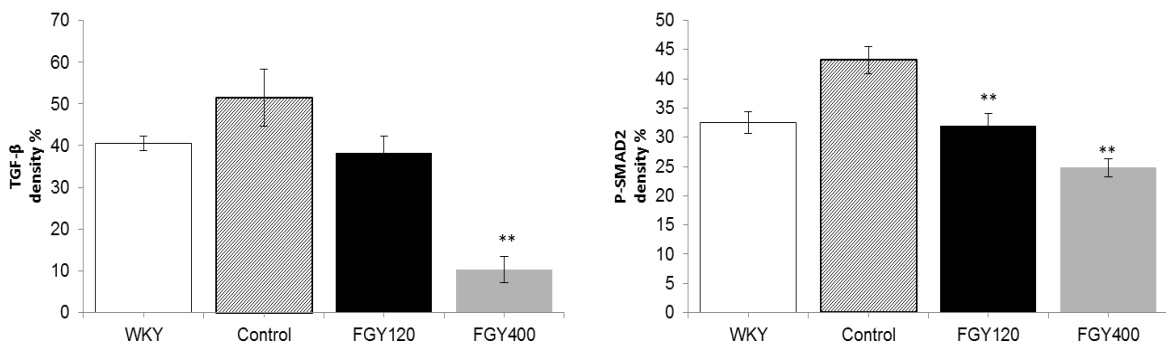
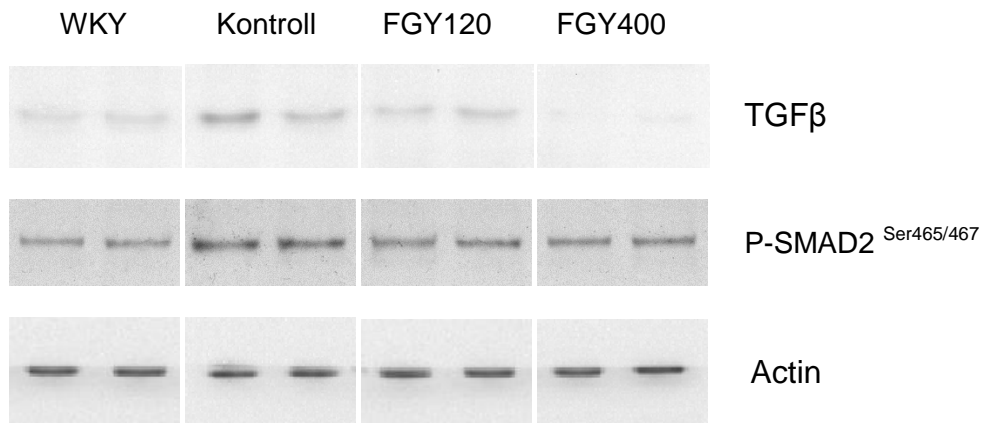
Az FGY-1153 hatása a TGF β /SMAD2 jelátviteli útvonalra a szívben és a nagyerekben

Western blot analízis, szív



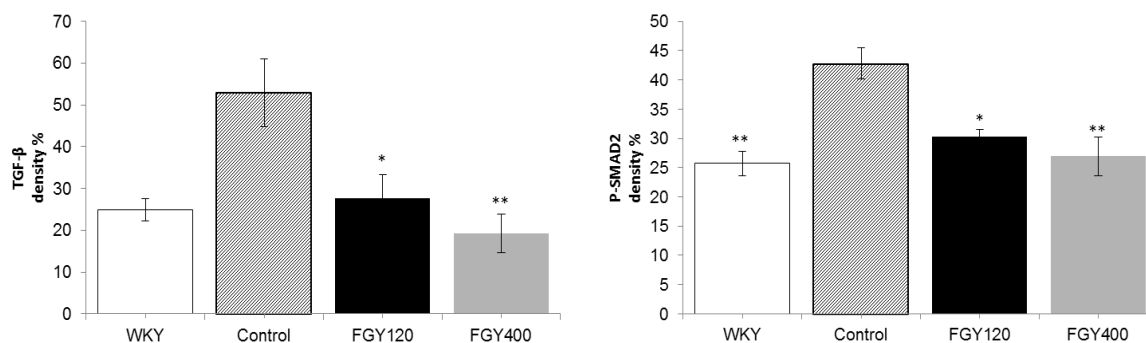
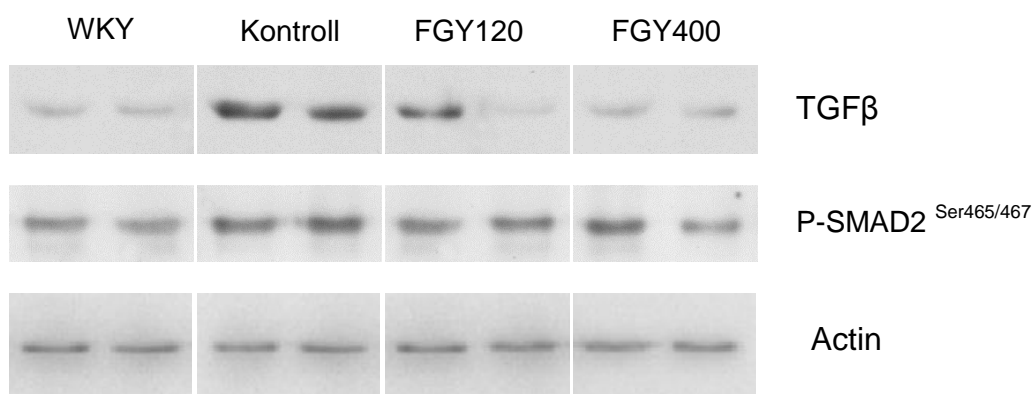
11.ábra Az FGY-1153 hatása a TGF β /SMAD2 jelátviteli útvonalra a szívben. FGY-1153 kezelés gátolta a TGF β kardiális expresszióját és a SMAD2 protein foszforilációját az FGY120 csoportban, ugyanakkor a magas dózisu kezelés nem volt hatással a SMAD2 foszforilációjára az FGY400 csoportban. (n=4), \pm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

Western blot analízis, aorta



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

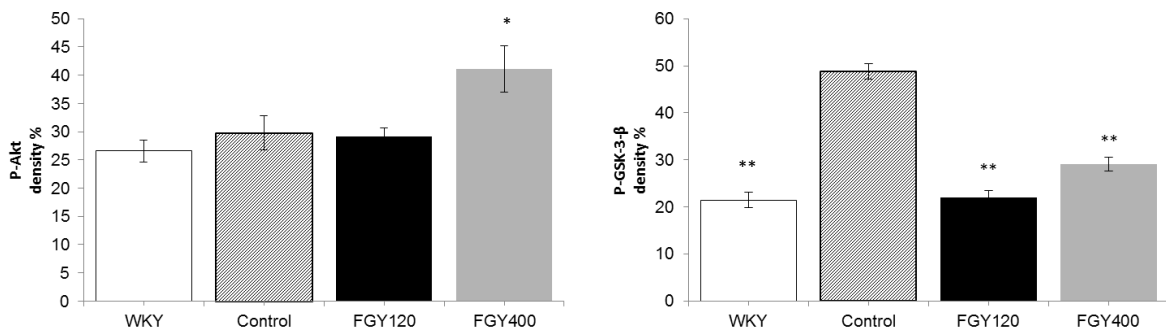
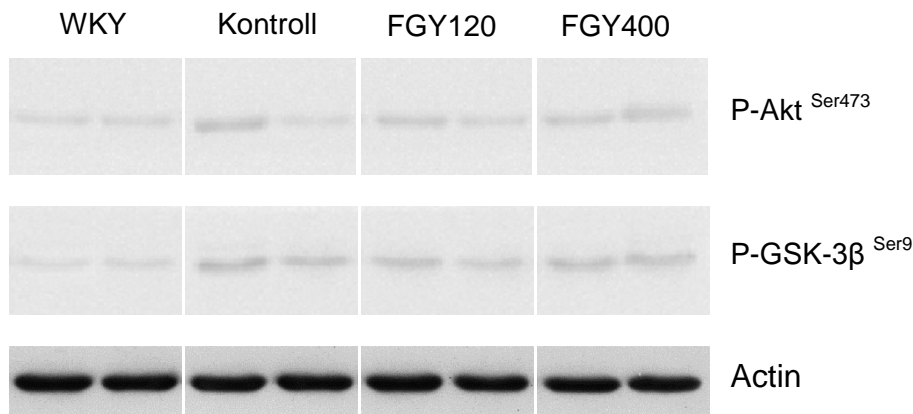
Western blot analízis, carotis



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

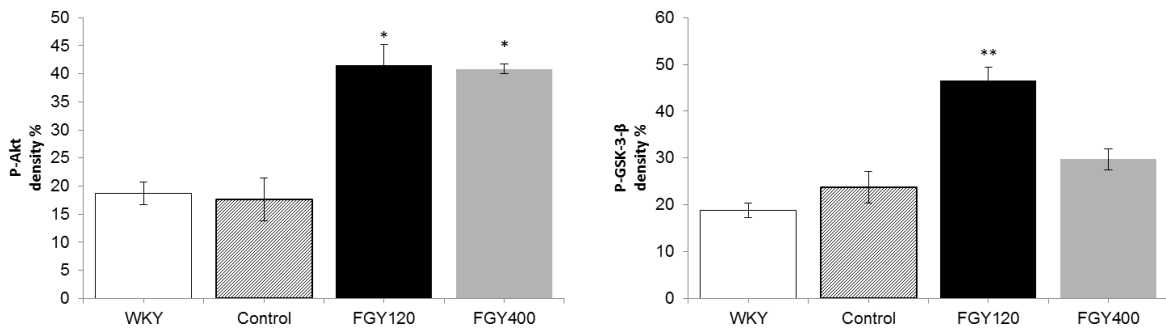
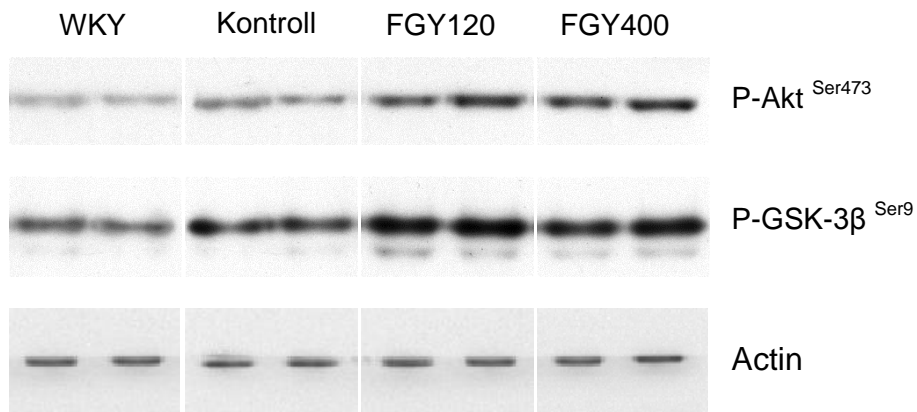
Az FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3 β szignalizációs kaszkádra szívben és nagyeregekben

Western blot analízis, szív



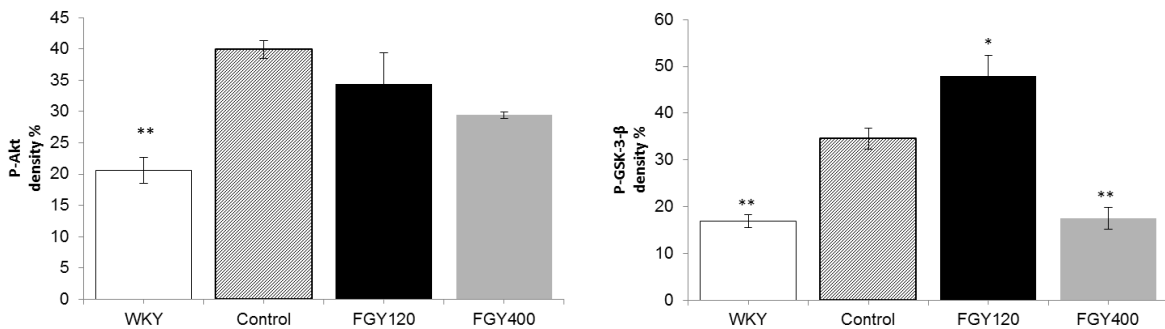
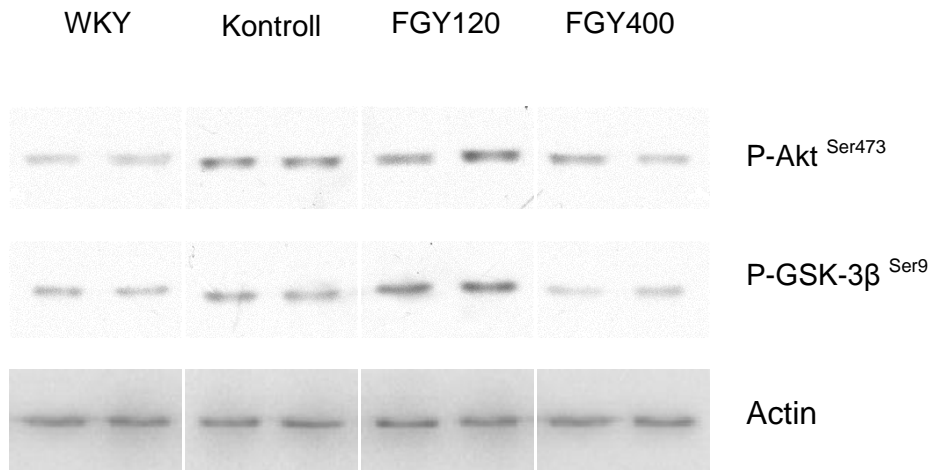
14.ábra: Az FGY-1153 hatása az Akt/GSK-3 β szignalizációs kaszkádra szívben. A GSK-3 β foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb a WKY csoportban a Kontroll csoporthoz viszonyítva. A magas dózisű FGY-1153 kezelés szignifikáns mértékben emelte az Akt protein aktivációját, valamint mind az alacsony, mind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

Western blot analysis, aorta



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

Western blot analízis, carotis



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

ÖSSZEGZÉS

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

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

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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