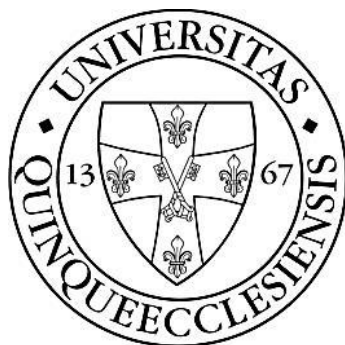


# **New drug targets and therapeutic approaches in heart failure**

PhD thesis

Author: Adam Riba



Program leader: Professor Kalman Toth, MD, PhD, DSc

Project leaders: Eszter Szabados MD, PhD

Robert Halmosi MD, PhD

First Department of Medicine

University of Pécs School of Medicine

Pécs

Hungary

2017

## **Abbreviations**

Akt-1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

BNP: B-type natriuretic peptide

BW: body weight

COX: cyclooxygenase

DOX: doxycycline

EF: ejection fraction

ERK 1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2

FS: fractional shortening

GSK-3 $\beta$ : glycogen synthase kinase-3 $\beta$

HF: heart failure

iNOS: inducible nitric oxide synthase

I/R: ischemia-reperfusion

IVS: thickness of interventricular septum

LV: left ventricle

LVEDV: left ventricular end-diastolic volume

LVESV: left ventricular end-systolic volume

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MI: myocardial infarction

NF-KB: nuclear factor kappa B

NT: nitrotyrosine

PW: thickness of left ventricular posterior wall

RES: resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene)

ROS: reactive oxygen species

SEM: standard error of mean

TL: tibia length

VW: ventricular weight

WKY: Wistar-Kyoto Rat

## **Introduction**

### *Definition of heart failure*

The 2016 European Society of Cardiology Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure defines heart failure as a „clinical syndrome characterized by typical symptoms (e.g. breathlessness, ankle swelling and fatigue) that may be accompanied by signs (e.g. elevated jugular venous pressure, pulmonary crackles and peripheral oedema) caused by a structural and/or functional cardiac abnormality, resulting in a reduced cardiac output and/or elevated intracardiac pressures at rest or during stress.” Heart failure (HF) is often, but not always, resulted from a myocardial dysfunction, caused by myocardial ischemia, myocarditis or primary myocardial diseases. Before clinical symptoms become apparent, it is important to recognize the causes and precipitating factors of HF and start treating them to prevent poor outcomes.

### *Prevalence of heart failure*

Despite advances in pharmacological and interventional cardiology heart failure remains a leading cause of morbidity and mortality in Europe or North America. The prevalence of HF depends on the definition applied, but is approximately 2% of the adult population in developed countries, rising to  $\geq 10\%$  among people  $>70$  years of age.

### *Causes and pathophysiology of heart failure*

Heart failure can be caused by a wide number of hereditary or acquired conditions. A reduced stroke volume may occur as a result of a failure of systole, diastole or both. Along with these macroscopic changes several pathological processes are activated at a cellular level: activation of different signal transduction pathways, reactive oxygen species (ROS) overproduction etc. resulting in myocyte death due to apoptosis or necrosis.

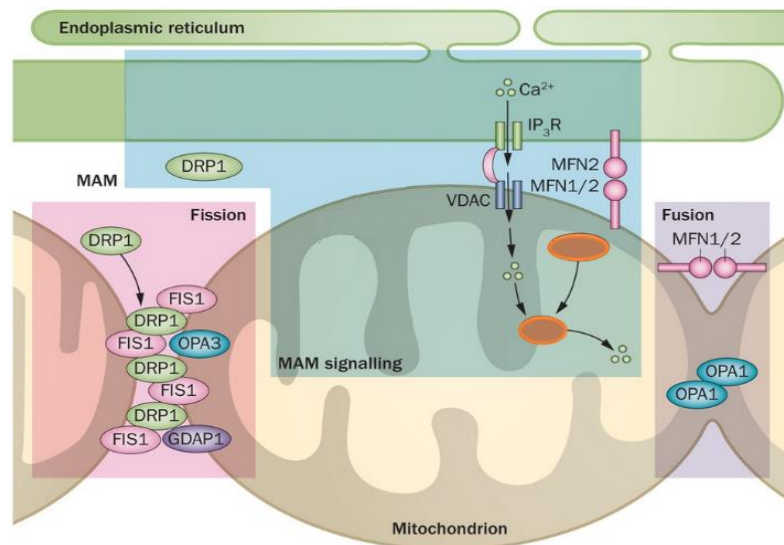
### *Oxidative stress in heart failure and role of mitochondria*

There is increasing evidence suggesting that chronic exposure to ROS play a major pathological role in the development and progression of heart failure.

Mitochondria are primarily responsible for ATP synthesis but under pathophysiological conditions, they become the main sources of endogenous ROS production. The superoxide radicals can react with nitric oxide (NO) to form peroxynitrite, a highly reactive and deleterious free radical species, or can be converted by SOD to  $H_2O_2$  that can further react to form highly reactive hydroxyl radicals.

A balance in mitochondrial fusion and fission is essential in the maintenance of mitochondrial networks and critical for cardiac metabolism and heart function. Oxidative conditions deteriorate this subtle balance. Mitochondrial fusion and fission are regulated by dynamin-like guanosine triphosphatases (GTPases) such as mitofusin 2 (Mfn-2), optic atrophy 1 (OPA-1) and dynamin-related protein 1 (Drp-1), which are markedly induced by oxidative stress. Regarding Mfn-1 and Mfn-2 they both produce connected mitochondria and make large mitochondrial networks. However, only Mfn-2 connects

mitochondria to the endoplasmatic reticuli. This connection between ER and mitochondria results in  $Ca^{2+}$  influx into the mitochondria, leading to fragmentation (Fig. 1).



**Fig 1: Mitochondrial dynamics and interactions:** Mitochondria-associated ER membranes (MAM) is a mechanism which results from communication between endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, this linkage consist of some proteins and a region on ER containing lipid biosynthetic enzyme connected reversibly to mitochondria. Mitochondria associated membranes are involved in the transport of calcium from the ER to mitochondria. This interaction is important for rapid uptake of calcium by mitochondria through Voltage dependent anion channels (VDACs), which are located at the outer mitochondrial membrane (OMM) mitofusin 2 (Mfn-2), optic atrophy 1 (OPA-1) and dynamin-related protein 1 Drp-1. OPA-1, Mfn-1 and Mfn-2 are essential mediators of the sequential fusion of the outer and inner membranes of adjacent mitochondria. During fission, DRP1 is recruited from the cytosol to the outer mitochondrial membrane. This figure was inserted from the article of Florence Burté et al. Disturbed mitchondrial dynamics and neurodegenerative disorders (Nature Rewievs Neurology 11, 11-24 (2015))

Fragmentation is also executed by Drp-1, a cytosolic protein that is recruited to the mitochondrial surface by phosphorylation in response to oxidative stress. A fragmentation of the mitochondrial network occurs in response to cellular stress and is observed in a wide variety of disease conditions, including heart failure via the modulation of ion transporters and calcium cycling.

#### *The role of intracellular signaling pathways in the pathophysiology of heart failure*

Pathological remodeling of the heart is accompanied by alterations in cardiac gene expression resulting in the shift from the activation of prosurvival factors (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase - Akt-1, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  – GSK-3 $\beta$ ) towards the activation of disadvantageous signaling factors

(p38-mitogen activated protein kinase - p38-MAPK, inducible nitrogen oxide synthase - iNOS, cyclooxygenase-2 - COX-2).

COX-2 and iNOS promotes adverse remodeling, apoptosis and the downregulation of cardiomyocyte contractility. Previous studies showed that COX-2 is upregulated by p38-MAPK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). The inducible nitric oxide synthase (iNOS) generates a prolonged release of large amounts of nitrogen-oxide (NO) which may be cytotoxic and/or inhibit myocyte contractility.

Growing data suggest that aiming the modulation of MAPK cascades could be a promising target to treat cardiomyocyte hypertrophy and HF. The exact role of MAPKs is still controversial in chronic heart failure (CHF). It was reported that ERK 1/2 activation leads to a concentric form of hypertrophy with enhanced cardiac function and dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2) protects the heart from ischemia induced apoptotic insults in mice.

#### *New therapeutic approaches in the treatment of HF*

Understanding the molecular basis of myocardial dysfunction and remodeling may help researchers for developing new treatments capable of restoring muscle function or slow the progression of HF. Our working group has also several promising preclinical results with different PARP inhibitors on cardiac hypertrophy, remodeling and vascular damage of hypertension. Furthermore many studies have previously examined drugs targeting mitochondrial energy metabolism and ROS production, but most of them have failed to alleviate cardiac damage in clinical investigations, demonstrating the complexity of the processes occurring in the mitochondrion.

#### *Cardiac effects of a well-known antibiotic: doxycycline*

Doxycycline (Dox) is a well-known antibiotic agent with a minimal amount of side-effects. It is used in the treatment of many bacterial infections, such as acne, urinary, gastrointestinal or eye infections, gonorrhea, chlamydia and Lyme's disease. Besides DOX has a well established matrix metalloproteinase (MMP) (MMP-2 and 9) inhibitory effect, which is believed to be the base of its major protective effect. Accordingly, pre-clinical studies showed that timed treatment with doxycycline significantly attenuates post-infarct LV remodeling. Moreover, doxycycline has showed a cardioprotective effect in isolated animal hearts subjected to ischaemia/reperfusion injury. Given the clinical availability and well-recognized safety profile of DOX it has been used in one clinical trial in patients with acute ST-elevation myocardial infarction with LV dysfunction, where DOX reduced myocardial infarct size and adverse LV remodeling.

#### *Resveratrol, a natural polyphenolic compound with numerous beneficial cardiac effects*

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) (RES) - Figure (Fig) 7 - is primarily found in grapes, red wine, nuts and some type of berries. Numerous experimental studies have verified that RES interferes with several pathological processes in different cardiovascular diseases such as myocardial ischemia,

myocarditis, cardiac hypertrophy and heart failure. In my present work I will mainly focus on the effect of RES in heart failure in an animal model. Different molecular mechanisms are involved in RES treatment but the most frequently mentioned protective effect was its antioxidant property.

### **Aims of the present work**

The aim of our work was to further evaluate the effects of two different compounds in heart failure: doxycycline and resveratrol.

1. To further clarify the cardioprotective effect of doxycycline in HF we examined its effect on ROS production and mitochondrial dynamics and fragmentation, cardiac fibrosis, severity of HF featured by BNP, LVEF, gravimetric parameters.
2. To further examine the cardioprotective effect of resveratrol in HF, the following experiments were carried out: measurements of echocardiographic parameters with high-resolution imaging system assessing interstitial fibrosis and oxidative stress on histological samples and evaluation of the steady state phosphorylation and expression levels of intracellular signaling factors: Akt-1, GSK-3B, p38-MAPK, ERK 1/2, MKP-1, COX-2 and iNOS.

# Examination of doxycycline in a postinfarction heart failure model

## Methods

*Cell viability assay, detection of mitochondrial fragmentation with fluorescent microscopy and mitochondrial membrane potential measurement with JC-1 assay for fluorescent microscopy*

The effect of DOX on cell viability was measured with SRB assay. To visualize the mitochondria, 50 nM of MitoTracker Red (Molecular Probes) was added and incubated for 15 minutes. Representative merged images of three independent experiments are presented. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was measured using the mitochondrial membrane potential-specific fluorescent probe, JC-1 (Molecular Probes). All experiments were repeated in triplicate.

### *Animals*

Male 16 week old Wistar rats (410–480 g) were used for the experiments. Animals received care according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the experiment was approved by the Animal Research Review Committee of the University of Pecs, Medical School (Permit number: BA02/2000-2/2010). We used the ISO-induced myocardial infarct model that is a relevant murine model of postinfarction heart failure.

### *Experimental protocol*

The animals were divided into the following four groups and were followed for 8 weeks: control group (C, n = 5), received clear tap water without any treatment; ISO group (ISO, n = 7) received two subcutaneous injections of ISO at a dosage of 80 mg/b.w.(kg) and clear tap water afterwards; ISO+doxycycline group (ISO+DOX or ISO+RES, n = 7), received 5 mg/b.w.(kg)/day or RES or clean water was administered. We set the dosage of resveratrol to 15 mg/kg/day. doxycycline after ISO treatment; doxycycline group (DOX or RES, n = 6), received 5 mg/b.w.(kg)/day doxycycline without ISO treatment. In the ISO-treated groups, 24 hours after the second injection the surviving animals were randomly assigned to receive either doxycycline (5 mg/b.w(kg)/day or tap water. At the end of the 8 week long treatment period, body weights were measured, animals were sacrificed and the hearts were removed.

### *Determination of plasma B-type natriuretic peptide level*

Blood samples were collected into Vacutainer tubes containing EDTA and aprotinin (0.6 IU/ml) and centrifuged at 1600 g for 15 minutes at 4°C to obtain plasma, which was collected and kept at -70°C. Plasma B-type natriuretic peptide-45 levels (BNP-45) were determined by enzyme immunoassay (BNP-45, Rat EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA).

### *Non-invasive evaluation of cardiac function*

Cardiac diameters and function were measured parasternal from the short- and long-axis views at the midpapillary level by using a VEVO 770 high-resolution ultrasound imaging system (VisualSonics, Toronto, Canada), which was equipped with a 25 MHz transducer. Left ventricular (LV) systolic function (ejection fraction-EF), LV end-diastolic volume (LVEDV), LV end-systolic volume (LVESV), as well as the thickness of the septum and posterior wall (PW) were determined. EF (%) was calculated as  $100 \times [(LVEDV - LVESV) / LVEDV]$  and FS (%) was calculated as left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) minus left ventricular end-systolic diameter (LVESD) over the LVEDD x 100.

### *Histology*

After fixation in formalin, the ventricles were sliced and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m thick) were cut serially from base to apex. Sections were stained with Masson's trichrome stain or nitrotyrosine to detect interstitial fibrosis, and quantified by the NIH ImageJ image processing program via its color deconvolution plugin.

### *Western blot analysis*

After blocking (2 h with 3% nonfat milk in Tris-buffered saline), membranes were probed overnight at 4 °C with antibodies recognizing the following antigens: mitofusin-2 (Mfn-2; 80 kDa; 1:1000; Cell Signaling), optic atrophy protein-1 (OPA-1; 100-110 kDa, 1:1000; Abcam), Drp-1 and phospho-specific Drp-1 Ser<sup>616</sup> (95 kDa; 1:1000, Cell Signaling), phospho-specific mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (*MKP-1*) Ser359 (1:1000), phospho-specific Akt-1/protein kinase B- $\alpha$  Ser473 (1:1000), phosphospecific glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  Ser9 (1:1000), phospho-specific p38 mitogenactivated protein kinase (p38-MAPK) Thr180–Gly–Tyr182 (1:1000), ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup>, COX-2 (1:1000), and iNOS (1:1000).. The results of Western blots were quantified using the NIH ImageJ program.

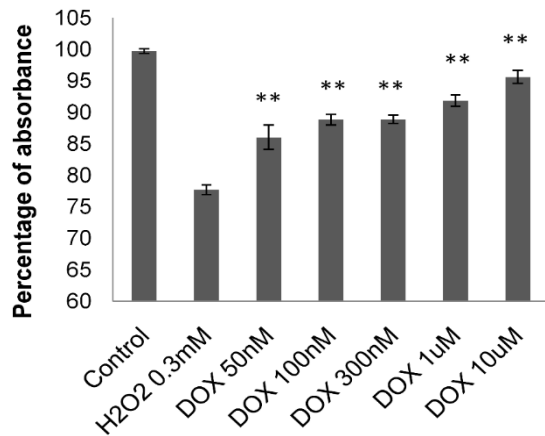
### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by analysis of variance and all of the data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The homogeneity of the groups was tested by F-test (Levene's test). There were no significant differences among the groups. Comparisons among groups were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni correction in SPSS for Windows, version 21.0. All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.



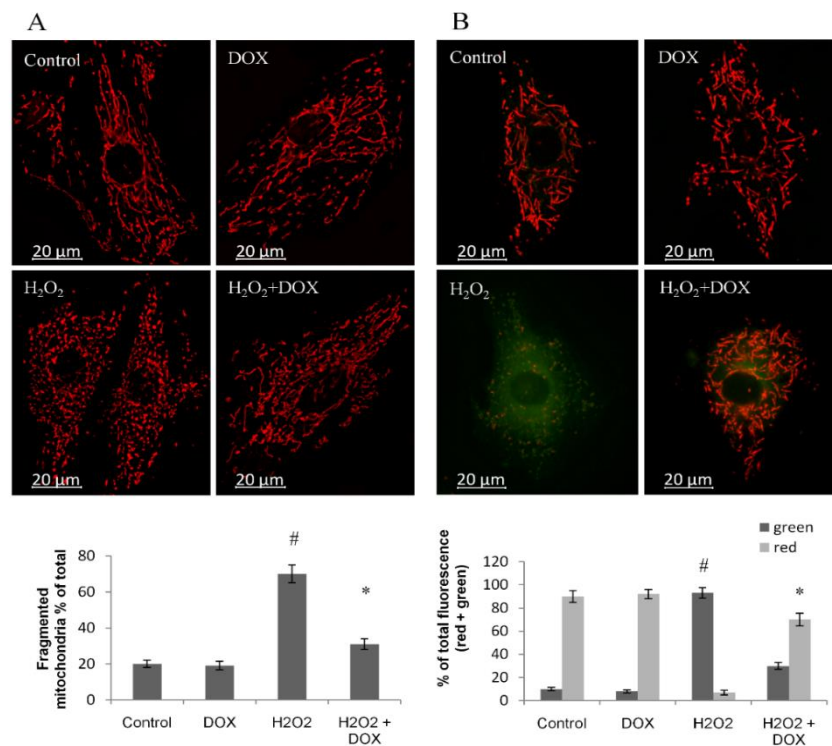
## Results

### *Protective effect of doxycycline against the free radical–induced injury of cardiomyocytes*



**Fig.2.** H9c2 cardiomyocytes were exposed to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours. Fifty percent of myocyte cell death was detected at a concentration of 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Increasing concentrations of DOX (50 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 10µM) were able to significantly improve cell survival ( $P < 0.01$ ; Fig 2).

### *Doxycycline attenuates oxidative stress–induced mitochondrial fragmentation and Doxycycline hyperpolarizes the mitochondrial membrane of H9c2 cardiomyocytes*



**Fig 3. Mitochondrial depolarization and fragmentation in H9c2 cardiomyocytes.**

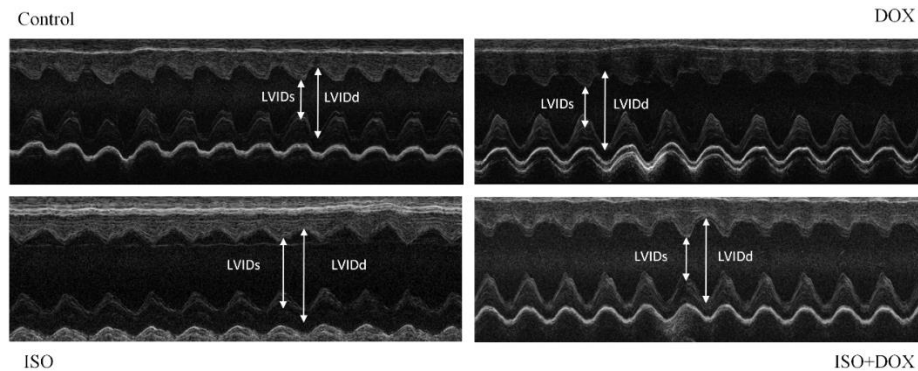
(A) Doxycycline reduced or completely prevented ROS–induced mitochondrial fragmentation at the concentration of 5 µM. (B) DOX protected H9c2 cells from cell death by preventing the depolarization of the mitochondrial membrane. (# $P < 0.05$ , C vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and \* $P < 0.05$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. DOX+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Doxycycline improves left ventricular function and moderates left ventricular hypertrophy in ISO treated rats*

**Table 2. Effects of doxycycline on the echocardiographic parameters.**

	Baseline	Control	DOX	ISO	ISO+DOX
EF (%)	76.42 ± 3.58	73.75 ± 1.39	72.81 ± 1.51	58.84 ± 1.27 <sup>#</sup>	68.39 ± 0.94 <sup>*</sup>
FS (%)	46.93 ± 3.29	44.21 ± 1.41	43.62 ± 1.32	33.29 ± 0.19	39.96 ± 0.56 <sup>*</sup>
Septum (mm)	1.52 ± 0.05	1.55 ± 0.04	1.46 ± 0.04	1.79 ± 0.08 <sup>#</sup>	1.57 ± 0.04 <sup>*</sup>
PW (mm)	1.50 ± 0.12	1.49 ± 0.74	1.42 ± 0.03	1.72 ± 0.05 <sup>#</sup>	1.51 ± 0.04 <sup>*</sup>
LLVIDd (mm)	8.21 ± 0.21	8.64 ± 0.29	8.30 ± 0.18	8.46 ± 0.07	8.31 ± 0.22
LVIDs (mm)	4.36 ± 0.33	4.77 ± 0.09	4.69 ± 0.19	5.34 ± 0.07 <sup>#</sup>	4.84 ± 0.12 <sup>*</sup>
LVEDV (ul)	365.83 ± 20.43	415.11 ± 32.63	375.50 ± 17.64	371.34 ± 8.83	387.42 ± 22.42
LVESV (ul)	86.31 ± 15.86	107.52 ± 5.73	103.24 ± 9.85	147.16 ± 3.26 <sup>#</sup>	121.42 ± 4.86 <sup>*</sup>
LV mass (mg)	991.69 ± 58.51	989.30 ± 63.91	953.00 ± 21.05	1212.24 ± 48.30 <sup>#</sup>	990.93 ± 59.33 <sup>*</sup>

Control group (C) (n=5); doxycycline group (DOX) (n=6); isoproterenol group (ISO) (n=7); ISO+ doxycycline group (ISO+DOX) (n=7). EF: ejection fraction, FS: fractional shortening, PW: posterior wall, LVIDd: diastolic left-ventricular inner diameter, LVIDs: systolic left-ventricular inner diameter, LVEDV: left ventricular end-diastolic volume, LVESV: left-ventricular end-systolic volume, LV mass: calculated left ventricular mass. Values are mean ± S.E.M. <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO.



**Fig 4. Representative echocardiographic M-mode images of left ventricles of control, DOX, ISO and ISO+DOX groups.**

*Doxycycline treatment improves the gravimetric parameters in an ISO-induced heart failure model and Doxycycline inhibits the heart failure-induced elevation of plasma BNP level*

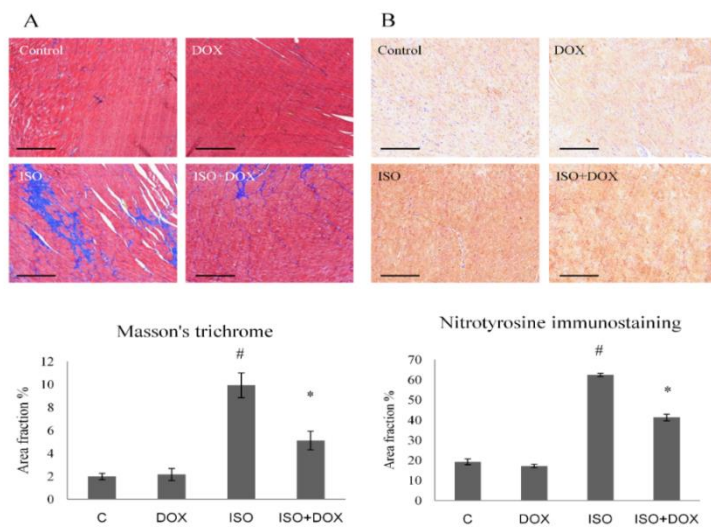
**Table 3. Effect of doxycycline on the ventricular weight/tibia length (VW/TL) ratio and on plasma BNP.**

Group	Control	DOX	ISO	ISO+DOX
Weight (g)	564.20 ± 21.55	569.67 ± 23.04	515.71 ± 19.66	550.86 ± 14.89
Ventricular weight (g)	1.27 ± 0.02	1.28 ± 0.02	1.46 ± 0.03 <sup>#</sup>	1.31 ± 0.02 <sup>*</sup>
Tibia length (mm)	48.00 ± 0.55	48.50 ± 0.76	48.86 ± 0.51	49.43 ± 0.49
Ventricular weight/body weight (mg/g)	2.28 ± 0.12	2.27 ± 0.09	2.87 ± 0.13	2.39 ± 0.06 <sup>*</sup>
Ventricular weight/tibia length (mg/mm)	25.54 ± 0.28	26.51 ± 0.69	29.95 ± 0.47 <sup>#</sup>	26.6 ± 0.92 <sup>*</sup>
p-BNP (ng/ml)	1.62 ± 0.11	1.61 ± 0.01	2.29 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.66 ± 0.10 <sup>*</sup>

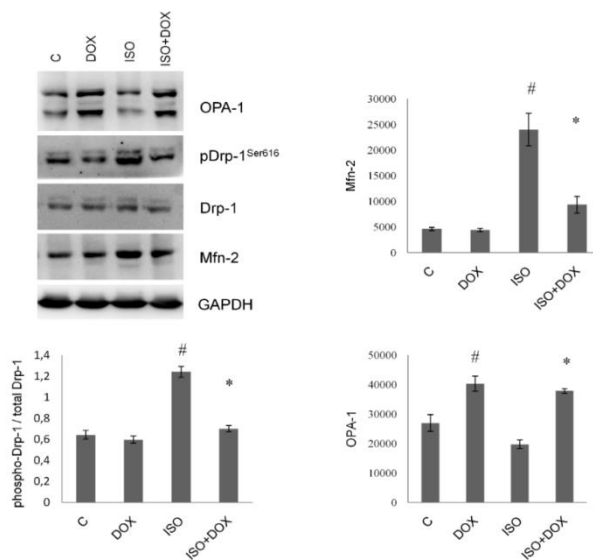
(<sup>#</sup>P < 0.05 vs. control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO)

Eight weeks after ISO-induced myocardial infarction, body weight, mass of ventricles and tibia length were measured. Ventricular weight/body weight (mg/g) and ventricular weight/tibia length (mg/mm) ratios were calculated. Plasma B-type Natriuretic Peptide (p-BNP) level was determined by ELISA. Control group (C) (n=5); doxycycline group (DOX) (n=6); isoproterenol group (ISO) (n=7); ISO+ doxycycline group (ISO+DOX) (n=7). The results were expressed as mean ± S.E.M. <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO.

*Doxycycline decreases the interstitial collagen deposition and the oxidative stress marker nitrotyrosine in the myocardium*



**Fig. 5.** Histological analysis revealed marked scar tissue formation and protein nitrosylation after ISO stress in failing rat hearts compared to the control group (P < 0.05). Doxycycline treatment significantly decreased the extent of interstitial fibrosis and oxidative stress (P<0.05). Doxycycline alone did not cause any alterations in nitrotyrosine staining or interstitial collagen deposition (Fig 5A).



**Fig 6. DOX favorably modulates the expression of Mfn-2, OPA-1 and the phosphorylation of Drp-1.** Values are mean  $\pm$  SEM. #  $P < 0.05$  vs control, \* $P < 0.05$  vs. ISO

## Discussion

We investigated the effect of DOX on H9c2 cardiomyocyte cell culture and on an isoproterenol-induced heart failure animal model. LV systolic function is a strong predictor of cardiac mortality and morbidity. ISO treatment significantly decreased the systolic left ventricular function, elevated ventricular wall thickness and diameter and caused significant myocyte hypertrophy. DOX was capable of preserving LV systolic function (EF%, FS%) and normalized wall thickness, ventricular diameter, fibrotic tissue formation and free radicals (Table 2, Fig 4). In accordance with these results, plasma BNP levels increased in the ISO-treated animals, and this increase was attenuated by DOX treatment (Table 3). There are data in the literature about the protective effect of doxycycline on isoproterenol induced cardiac hypertrophy and on the early phase of remodeling. Our working group verified for the first time that DOX strikingly reduces the severity of postinfarction heart failure in an advanced stage.

Since mitochondria are a major source (and target) of ROS and play a critical role in energy production, we turned our attention to these organelles. Intensive research on the mitochondria has previously demonstrated that their structural and functional integrity is essential for maintaining normal myocardial function. Defects in mitochondrial dynamics have been associated with various disorders, including heart failure, ischemia/reperfusion injury, diabetes, and aging. We first tested the effect of DOX on a H9c2 cardiomyocyte cell culture, where DOX protected cardiomyocytes against oxidative injury in the SRB assay (Fig 2). Next we examined the effect of DOX on ROS-induced mitochondrial fragmentation and membrane potential. Our results showed that DOX protected mitochondria against ROS-induced mitochondrial fragmentation (Fig 3A) and prevented ROS-induced collapse of the mitochondrial

membrane potential (Fig 3B), processes that cause rapid impairment of mitochondrial and cellular function leading to necrotic and apoptotic cell death.

We further investigated the effect of DOX on the expression of dynamin-like GTPases (OPA-1, Mfn-2, DRP-1) responsible for mitochondrial dynamics in western blot analysis of rat heart samples. It has been reported that Mfn-2 is markedly induced by oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes and Mfn-2 creates physical connection between mitochondria and endoplasmic reticulum. In our animal model, ISO treatment decreased OPA-1 and increased Mfn-2 levels, and augmented the phosphorylation of Drp-1. DOX was able to favorably modulate the steady state level of OPA-1, Mfn-2 and the phosphorylation of Drp-1, which prevented mitochondrial fragmentation and improved cell survival (Fig 6).

According to our results, DOX might be a promising agent in the treatment of postinfarction heart failure. Besides its well-known protective effect on cardiac hypertrophy, remodeling and fibrosis, we could demonstrate that DOX was able to decrease the ROS-induced mitochondrial fragmentation and depolarisation on H9C2 cardiomyocytes.

## Examination of resveratrol in a postinfarction heart failure model

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) (RES) (Fig 7.) is a natural phytoalexin found in a wide variety of plant species including grapes and nuts and present in varying concentration in red wines. Numerous experimental studies have verified that RES interferes with several pathological processes in different cardiovascular diseases such as myocardial ischemia, myocarditis, cardiac hypertrophy and heart failure. Multiple mechanisms have been proposed to be responsible for the protective effects of RES in HF. The aim of the present study was to further examine RES in a postinfarction heart failure animal model, where isoproterenol, a strong sympathetic agent was used to induce myocardial infarction, causing patchy, predominantly subendocardial necrosis and fibrosis. We examined the effect of RES on left ventricular function, myocyte hypertrophy, collagen deposition, ROS production and intracellular signaling pathways taking part in the process of cardiac remodeling and heart failure.

Similarly to the study with doxycycline, myocardial infarction was induced with subcutaneous administration of 80 mg/kg ISO in two consecutive days. Control animals received 1ml/kg saline solution. The surviving animals were divided randomly into 2 groups 24 hours after the second injection: one group (ISO+RES) was given 15mg/kg/day RES dissolved in tap water, the other group did not receive any other treatment (ISO group). The other two groups were age matched Control (C) and RES treated only (RES) groups.

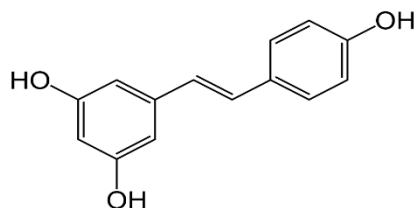


Fig 7. Chemical structure of resveratrol (RES).

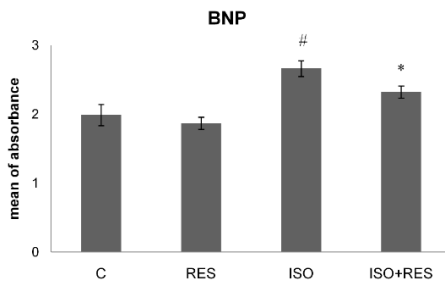
## Results

### *Resveratrol treatment improved the gravimetric parameters in ISO-induced heart failure model*

Group	Control	RES	ISO	ISO+RES
weight (g)	595.86±15.15	596.00±21.30	544.50±11.63	593.86±18.41
ventricular weight (g)	1.33±0.01	1.31±0.01	1.53±0.02#	1.35±0.01*
tibia length (mm)	51.43±0.72	51.57±0.72	50.86±0.55	49.86±0.35
ventricular weight/body weight (mg/g)	2.25±0.06	2.21±0.08	2.81±0.06#	2.29±0.09*
ventricular weight/tibia length (mg/mm)	26.03±0.47	25.33±0.33	29.96±0.28#	27.02±0.13*

**Table 4. Effects of RES and ISO on the gravimetric parameters.** Eight weeks after ISO-induced myocardial infarction, body weight, mass of ventricles and tibia length were measured. Ventricular weight/body weight (mg/g) and ventricular weight/tibia length (mg/mm) ratios were calculated. The results are expressed as mean±S.E.M. #P<0.05 vs. Control. \*P<0.05 vs. ISO.

*Resveratrol decreased the heart failure-induced elevation of plasma BNP level*



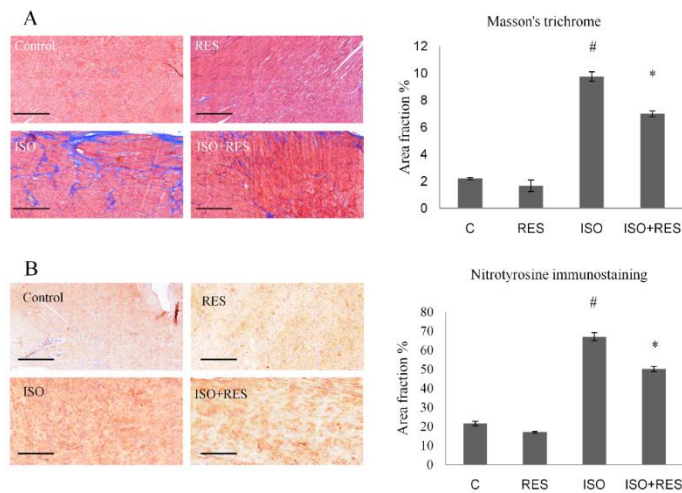
**Fig 8. RES inhibited the heart failure-induced elevation of plasma BNP level.** Plasma BNP level was determined using an ELISA method as described in the Materials and methods. C: control animals; RES: animals treated with resveratrol for 8 weeks; ISO: animals 8 weeks after ISO administration; ISO + RES: animals treated with resveratrol, 8 weeks after ISO administration. Values are mean  $\pm$  SEM, \*P<0.05 vs. ISO, #P<0.05 vs C.

*Resveratrol improved left ventricular function and moderated left ventricular hypertrophy in ISO-treated rats*

	Baseline	C	RES	ISO	ISO+RES
EF (%)	75.62 $\pm$ 0.87	71.70 $\pm$ 1.61	72.47 $\pm$ 1.69	56.96 $\pm$ 1.43 <sup>#</sup>	67.49 $\pm$ 1.14 <sup>*</sup>
Septum (mm)	1.63 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.10	1.61 $\pm$ 0.03	1.82 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	1.70 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>
PW (mm)	1.57 $\pm$ 0.03	1.59 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.03	1.81 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	1.60 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>
LVIDd (mm)	8.19 $\pm$ 0.11	8.44 $\pm$ 0.22	8.43 $\pm$ 0.17	7.88 $\pm$ 0.12	8.41 $\pm$ 0.23
LVIDs (mm)	4.42 $\pm$ 0.08	4.85 $\pm$ 0.09	4.69 $\pm$ 0.19	5.70 $\pm$ 0.2 <sup>#</sup>	4.90 $\pm$ 0.12 <sup>*</sup>
LVEDV ( $\mu$ l)	364.23 $\pm$ 10.38	393.36 $\pm$ 19.32	386.40 $\pm$ 16.82	365.54 $\pm$ 6.64	401.59 $\pm$ 18.63
LVESV ( $\mu$ l)	88.83 $\pm$ 4.40	109.9 $\pm$ 4.53	106.14 $\pm$ 7.26	157.71 $\pm$ 7.29 <sup>#</sup>	130.27 $\pm$ 6.69 <sup>*</sup>
LV mass (mg)	994.1 $\pm$ 21.8	1035.31 $\pm$ 59.79	1038.38 $\pm$ 44.44	1239.14 $\pm$ 76.5 <sup>#</sup>	1041.85 $\pm$ 35.50 <sup>*</sup>

**Table 5. Resveratrol improved left ventricular function in ISO-treated rats and reduced left ventricular hypertrophy.** Control group (C); resveratrol group (RES); isoproterenol-treated group: (ISO); ISO+ resveratrol group (ISO+RES). EF: ejection fraction, LVESV: left-ventricular end-systolic volume, LVEDV: left ventricular end-diastolic volume, LVIDd: diastolic left ventricular inner diameter, LVIDs: systolic left-ventricular inner diameter.

## Resveratrol decreased interstitial collagen deposition in the myocardium

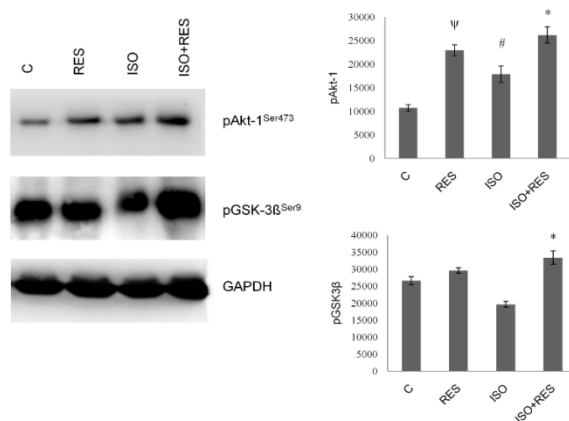


Marked scar tissue formation was revealed by histological analysis after ISO stress in failing rat hearts compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Resveratrol treatment significantly decreased the extent of interstitial fibrosis ( $P < 0.05$ ). Resveratrol alone did not cause any significant alterations in physiological conditions related to myocardial hypertrophy or interstitial collagen deposition (Fig 10A).

## Effects of resveratrol on the oxidative stress marker nitrotyrosine

The presence of oxidative stress was confirmed in our rodent heart failure model by the measurement of NT, which is a product of tyrosine nitration. Almost no immunostaining for NT was observed in myocardial sections of the control group. In contrast, in animals with heart failure (ISO), immunostaining was significantly more extensive ( $P < 0.05$ , C vs. ISO), but this increase was attenuated by RES treatment ( $P < 0.05$ , ISO vs. ISO+RES; Fig. 10B).

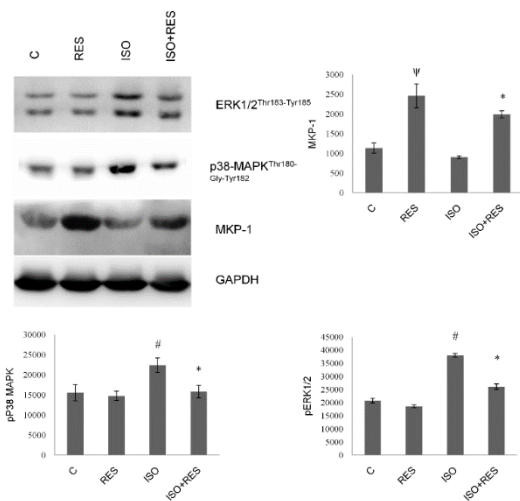
## Resveratrol favourably influenced the phosphorylation of Akt-1<sup>Ser473</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> in failing myocardium



**Fig 11. Effect of resveratrol treatment on Akt-1<sup>Ser473</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>.** Values are mean  $\pm$  SEM, # $P < 0.05$  vs. Control, \* $P < 0.05$  vs. ISO,  $\psi P < 0.05$  C vs. RES.

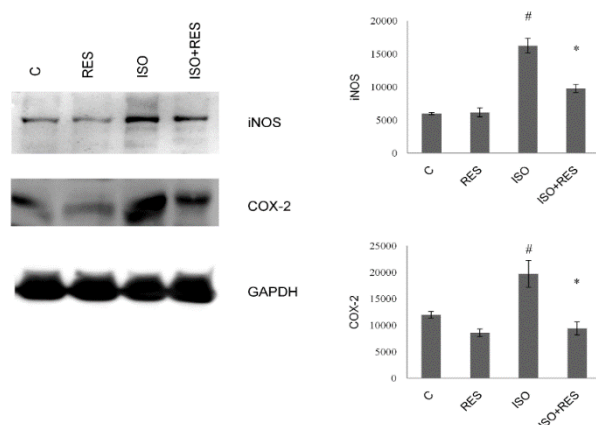


Resveratrol attenuated the phosphorylation of p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup>, ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> and increased the amount of MKP-1 in ISO-stressed hearts



**Fig 12. Effect of resveratrol treatment on the phosphorylation of p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup>, ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> and on the amount of MKP-1.** Values are mean ± SEM, #P <0.05 Control vs. ISO, ψP<0.01 C vs. RES, P<0.05 ISO vs. ISO+RES.

Resveratrol decreased the expression of COX-2 and iNOS



**Fig 13. Effect of resveratrol treatment on COX-2 and iNOS.** Representative western blot analysis of COX-2 and iNOS activation and densitometric evaluation is shown. Values are mean ± SEM, #P <0.05 Control vs. ISO, ψP<0.01 C vs. RES, P<0.05 ISO vs. ISO+RES.

## Discussion

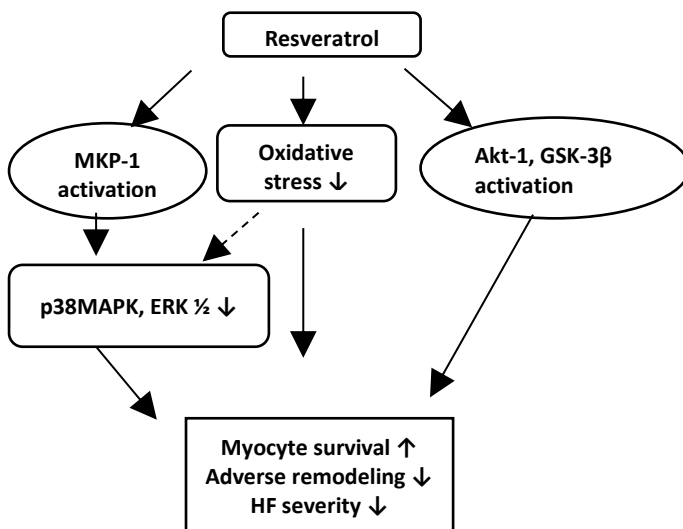
There are data in the literature about the protective effect of resveratrol on isoproterenol induced cardiac hypertrophy and on the earlier phase of remodeling. Our working group has previously demonstrated the beneficial effects of an alcohol-free red wine extract in a postinfarction heart failure murine model. This time we aimed to test the cardioprotective effect of RES on oxidative stress and different signaling pathways in an advanced stage of heart failure. RES was capable of preserving LV function, decrease fibrosis and free radical formation and moderated the severity of heart failure (Table 5.).

In our investigation phosphorylation of Akt-1 and GSK-3β were elevated in all groups compared to the control group but the highest level of phosphorylations were in the ISO+RES group (Fig 11.), indicating that RES facilitated the activity of endogenous prosurvival signaling pathways.

In our study, the phosphorylation of p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> and ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> was elevated in ISO-treated groups but RES treatment significantly decreased this elevation. These changes in the activation state of signaling molecules were probably due to the increased production of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) which is the major regulator of MAPKs. In accordance with this, the amount of MKP-1 was increased in the RES-treated groups compared to untreated animals.

Whereas COX-1 plays a housekeeping role, COX-2 plays a major part in inflammation, atherosclerosis and tumor formation. Previous studies showed that COX-2 is upregulated by p38-MAPK and ERK1/2. Moreover, prolonged activation of COX-2 produces cardiac cell death, leading to gradual loss of myocardial function and eventually heart failure. We found in our postinfarction animal model that RES was able to reduce the activation of COX-2 induced by ISO treatment (Fig 13.). Previous in vivo animal and human studies demonstrated the elevated expression of iNOS in heart failure. In our study ISO increased both nitrotyrosin formation (Fig.10B) and iNOS activity (Fig.13.) which was efficiently attenuated by RES treatment. It has also been shown that iNOS, as well as COX-2 expression level is strongly correlated with the phosphorylation level of the MAPK-s (p38-MAPK and ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup>) suggesting a strong relation between oxidative stress and intracellular signal transduction.

In our study RES treatment moderated the severity of HF by decreasing oxidative stress, increasing the activity of pro-survival signaling pathways (Akt1, GSK-3 $\beta$ ) and decreasing p38MAPK and ERK1/2 stress signaling pathways Fig. 14.)



**Fig 14. Summary of the beneficial effect of RES treatment in our HF model.** Akt-1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, COX: cyclooxygenase, ERK 1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2, GSK-3 $\beta$ : glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , MAPK: mitogen-activated protein kinase, MKP-1: mitogen-activated protein (MAP) kinase-phosphatase-1, iNOS: inducible nitric oxide synthase.

## **Summary of new findings**

### *Summary of new findings of DOX treatment.*

1. Our working group verified for the first time that DOX strikingly reduces the severity of postinfarction heart failure in an advanced stage of HF.
2. DOX protected mitochondria against ROS-induced mitochondrial fragmentation and prevented ROS-induced collapse of the mitochondrial membrane potential in H9c2 cardiomyocytes
3. DOX increased OPA-1 and decreased Mfn-2 level, and decreased the phosphorylation of Drp-1 in an ISO induced animal model of HF. Through these processes beneficially influenced mitochondrial dynamics and cell survival.

### *Summary of new findings of RES treatment in an ISO induced animal model of HF*

1. RES improved left ventricular function, and decreased the VW/TL ratio, collagen deposition in the myocardium and the plasma BNP level.
2. RES exerted its beneficial effects through modifying several intracellular signaling pathways (Akt-1, GSK-3 $\beta$ , p38-MAPK, ERK1/2, MKP-1, COX-2 and iNOS).

## **Acknowledgements**

These studies were carried out at the Szentagothai Research Laboratory of the 1st Department of Medicine and at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs between 2013 and 2017.

I would like to express my special thanks to my program leader, Professor Kalman Toth, who gave support during my work, and to my project leaders Dr. Eszter Szabados and Dr. Robert Halmosi who managed my experiments and helped me to perform echocardiographic examinations.

I am grateful to Professor Balázs Sümegi who taught me a biochemical way of thinking and ensured the possibility of undisturbed work in his department for my work.

I would like to express my gratitude to Professor Ferenc Gallyas, who gave me useful advices during the experiments and in the process of the acceptance of my first scientific paper.

Krisztián Erős, Dr. László Deres gave also a hand with a part of the experiments.

I am grateful to Völgyiné Dózsa Tímea, Istvánné Pásztor, Heléna Halasz, Bertalan Horváth and László Girán, who gave much assistance in the laboratory work.

I express my thanks to my family and friends for their encouraging support during my studies and work.

## Publications of the author

### *Papers*

ADAM RIBA, LASZLO DERES, BALAZS SUMEGI, KALMAN TOTH, ESZTER SZABADOS, AND ROBERT HALMOSI, "Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 6819281, 10 pages, 2017. doi:10.1155/2017/6819281

ADAM RIBA LASZLO DERES, KRISZTIAN EROS, ALIZ SZABO, KLARA MAGYAR, BALAZS SUMEGI, KALMAN TOTH, ROBERT HALMOSI, ESZTER SZABADOS. (2017) Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISO-induced heart failure. *PLoS ONE* 12(4): e0175195. doi:10.1371/journal.pone.0175195

KRISZTIAN EROS, KLARA MAGYAR, LASZLO DERES, ARPAD SKAZEL, ADAM RIBA, ZOLTAN VAMOS, TAMAS KALAI, FERENC GALLYAS JR., BALAZS SUMEGI. (2017) Chronic PARP-1 inhibition reduces carotid vessel remodeling and oxidative damage of the dorsal hippocampus in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE* 12(3): e0174401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174401>

LASZLO DERES, EVA BARTHA, ANITA PALFI, KRISZTIAN EROS, ADAM RIBA, JANOS LANTOS, TAMAS KALAI, KALMAN HIDEG, BALAZS SUMEGI, FERENC GALLYAS, KALMAN TOTH, ROBERT HALMOSI

PARP-Inhibitor Treatment Prevents Hypertension Induced Cardiac Remodeling by Favorable Modulation of Heat Shock Proteins, Akt-1/GSK-3 $\beta$  and Several PKC Isoforms

*PLoS One*. 2014; 9(7): e102148. Published online 2014 July 11. doi: 10.1371/journal.pone.010214

### *Abstracts*

MAGYAR K., RIBA Á., VÁMOS Z., BALOGH A., DERES L., HIDEG K., SÜMEGI B., KOLLER Á., HALMOSI R., TÓTH K., Az Akt és a MAP kináz szerepe a krónikus hipertenzív patkány modellben a PARP gátlás által kiváltott védelemben. A Magyar Kardiológusok Társasága 2011. évi Tudományos Kongresszusa, 2011. május 1-14., Balatonfüred.

MAGYAR K., RIBA Á., VÁMOS Z., BALOGH A., DERES L., HIDEG K., SÜMEGI B., KOLLER Á., HALMOSI R., TÓTH K., The role of akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of PARP inhibition in a chronic hypertensive rat model. FAMÉ 2011. június 8-11., Pécs

MAGYAR K., RIBA Á., VÁMOS Z., BALOGH A., DERES L., HIDEG K., SÜMEGI B., KOLLER Á., HALMOSI R., TÓTH K., Az L-2286 jelű PARP-gátló vegyület lehetséges szerepe a mitokondriális

összejt regenerációban. A Magyar Kardiológusok Társasága 2012. évi Tudományos Kongresszusa, 2012. május 9-12., Balatonfüred.

MAGYAR, K, RIBA A., VAMOS, Z., BALOGH, A., DERES, L., HIDEG, K., SUMEGI, B., KOLLER, A., HALMOSI, R., TOTH, K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the vasoprotection elicited by PARP inhibition in hypertensive rats. Congress of the European Society of Cardiology, August 27-31, 2011, Paris, France, Eur. Heart J, 32 (Abstract Supplement), 34, 2011.

ERŐS K., DERES L., MAGYAR K., RIBA Á., HIDEG K., SERESS L., SÜMEGI B., TÓTH K., HALMOSI R. A PARP1-gátlás hatása a mitokondriumok fragmentációjára in vivo SHR modellben. A Magyar Kardiológusok Társasága 2013. évi Tudományos Kongresszusa, 2013. május 8–11., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2013; 43; B16.

RIBA Á., DERES L., ERŐS K., SÜMEGI B., TÓTH K., HALMOSI R., SZABADOS E.

A doxycycline hatása az isoproterenol indukálta szívelégtelenség kialakulására. A Magyar Kardiológusok Társasága 2013. évi Tudományos Kongresszusa, 2015. május 6-9., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2015

A. RIBA L. DERES, K. EROS, A. SZABO, B. SUMEGI, K. TOTH, R. HALMOSI, E. SZABADOS

Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISO-induced heart failure. European Society of Cardiology Heart Failure Congress, Firenze, 2016.

RIBA Á., DERES L., ERŐS K., SÜMEGI B., TÓTH K., , SZABADOS E, HALMOSI R.

A rezveratrol hatása a posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulására állatmodellen. A Magyar Kardiológusok Társasága 2016. évi Tudományos Kongresszusa, 2016. május 5-7., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2016

RIBA Á., NAGYNÉ-KISS GY., DERES L., SÜMEGI B., TÓTH K., HALMOSI R

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátló HO-3089 védő hatása iszkémia-reperfúzióban a megnövelt myocardiális glükóz-felvételen keresztül A Magyar Kardiológusok Társasága 2017. évi Tudományos Kongresszusa, 2017. május 10-13., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2017

# Új terápiás megközelítések a szívelégtelenség kezelésében

PhD Tézis

Írta: Dr. Riba Ádám



Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán, az MTA doktora

Témavezetők: Dr. Szabados Eszter PhD

Dr. Halmosi Róbert PhD

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs

2017

## Rövidítések jegyzéke

AKT: protein kináz B (PKB)

BNP: B-típusú natriuretikus peptid

BW: testtömeg

COX: ciklooxygenáz-2

DOX: doxiciklin

EF: injekciós frakció

ERK 1/2: extracelluláris szignál-regulált kináz

FS: frakcionális rövidülés

GSK-3 $\beta$ : glikogén szintáz kináz-3 $\beta$

HF: heart failure (szívelégtelenség)

IR: iszkémia-reperfúzió

iNOS: indukálható nitrogen-oxid szintáz

IVS (d): interventrikuláris szeptum vastagság diasztolében

IVS (s): interventrikuláris szeptum vastagság szisztolében

LVEDV: bal kamra végdiasztolés térfogat

LVESV: bal kamra végszisztolés térfogat

LVID (d): bal kamra végdiasztolés átmérő

LVID (s): bal kamra végszisztolés átmérő

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

PW (d): bal kamra poszterior fal vastagság diasztolében

PW (s): bal kamra poszterior fal vastagság szisztolében

RES: rezveratrol

ROS: reaktív oxigén gyök

TBS: TRIS-pufferelt sóoldat

TL: tibia hossz

WKY: Wistar-Kyoto patkány



## **Bevezetés**

### *Definíció*

A szívelégtelenség egy komplex klinikai szindróma, melyet a szív olyan strukturális és/vagy funkcionális elváltozásai okoznak, melyek eredményeképpen terhelés alatt vagy akár nyugalomban is a szív nem képes a szükséges perctérfogatot normális végdiasztolés nyomás mellett elérni. Háttérében leggyakrabban a csökkent pumpafunkciót okozó iszkémiás szívbetegség áll, de egyéb okok pl. miokarditisz, volumen - vagy nyomásterhelés, toxicus ártalmak, vagy a miokardiumot érintő primer megbetegedések állhatnak. Fontos időben felismerni és kezelni a szívelégtelenség hajlamosító tényezőit, és megelőzni a betegség kialakulását.

### *Prevalencia*

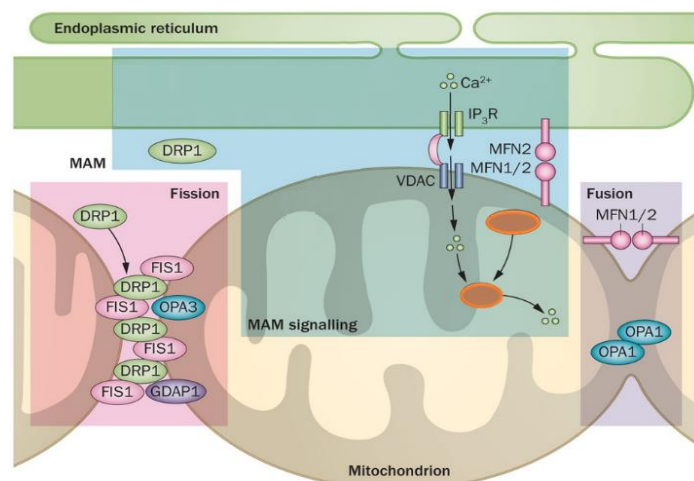
A korszerű gyógyszeres kezelés és az invazív kardiológia legújabb vívmányai ellenére a szívelégtelenség még mindig a vezető halálok Európában és Észak-Amerikában egyaránt, amely a 70 év feletti populáció 10%-át érinti.

### *A szívelégtelenség patomechanizmusa*

A normál perctérfogat fenntartására kompenzatórikus mechanizmusok aktiválódnak, melyek közül a legfontosabbak a szimpatikus idegrendszer, valamint a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválódása, a kardiális szöveti hormonok (ANP, BNP) fokozott termelődése, a szívizom hypertrophia és a fetalis gének expressziója. Mindezek mellett számos, egyéb maladaptív folyamat aktiválódik, az oxidatív foszforiláció zavart szenved, reaktív oxigén szabadgyökök termelődnek, a szív energia háztartása felborul, és végül a szívizomsejtek elpusztulnak.

### *A mitokondriumok és az oxidatív stressz szerepe a szívelégtelenség kialakulásában*

Egyre szélesebb körben bizonyított, hogy a megnövekedett ROS termelés központi szerepet játszik a szívelégtelenség kialakulásában és progressziójában.



**1. ábra: Mitokondriális dinamika és interakciók.** (Nature Reviews Neurology 11, 11-24 (2015))

A mitokondriumok fő feladata az ATP szintézis, azonban patológiás körülmények között a ROS képződés fő helyszíneivé válhatnak. A normál mitokondriális hálózatot a mitokondriumok fúziójának és szétválásának finom egyensúlya tartja fenn. Ezt a kényes egyensúlyt a szabadgyökök túlzott termelődése könnyen megtöri. A Mfn-2, OPA-1, Drp-1 és a hozzájuk hasonló GTP-ázok szabályozzák a mitokondriális dinamikát (1. ábra). Oxidatív stressz során a Mfn-2 kapcsolatot létesít az ER és a mitokondriumok membránja között, elősegítve a  $Ca^{2+}$  beáramlást, amely a mitokondriumok fragmentációjához vezet. Továbbá az oxidatív stressz a Drp-1 foszforilációjához vezet, amely szintén fragmentáció irányába mozdítja a mitokondriális dinamikát. Szívelégtelenség kapcsán is megfigyelhető a mitokondriális hálózat fragmentációja, melynek következtében a mitokondriális energiatermelő folyamatok és ATP képzés csökken, mely végső soron szívelégtelenséghez vezet.

#### *Az intracelluláris jelátviteli utak szerepe a szívelégtelenség kialakulásában*

Patológiás körülmények között a káros (p38-MAPK, iNOS, COX-2) és a túlélést elősegítő (pl. Akt-1, GSK-3) jelátviteli utak aktivitása is felerősödik, azonban az utóbbiaké nem elégedő mértékben.

Az Akt-1 és a GSK-3 $\beta$  központi szerepet töltenek be a szív angiogenezisében, és a szívizom hipertrófia és a következményes szívelégtelenség kifejlődésének gátlásában.

A p38-MAPK és ERK 1/2 által aktivált COX-2 kontraktilitás csökkenéshez, apoptózishoz és káros remodellinghez vezet. Ezen felül, hosszú távú, túlzott sejten belüli COX-2 aktivitás, fokozatos kontraktilitás csökkenéshez, és végül szívelégtelenség kialakulásához vezet. Az iNOS hatására nagy mennyiségű NO szabadgyök szabadul fel, amely oxidatív károsodást idéz elő a szívizomsejtekben.

A MAPK család (p-38MAP, ERK 1/2, JNK) szerepe még nem teljesen tisztázott krónikus szívelégtelenségben, de a legtöbb irodalmi adat alapján ezen kaskád gátlása, a szívizom-hipertrófiával és szívelégtelenséggel szemben ígéretes lehet.

#### *Új terápiás megközelítések a szívelégtelenség kezelésében*

Az Európai Kardiológus Társaság Szívizom funkciókkal foglalkozó munkacsoportja által 2014-ben publikált állásfoglalás alapján a következő potenciális hatóanyagokat és terápiás célpontokat tekintette

ígéretesnek: „omecamtiv mecarbil” (miozin aktivátor), nitroxil (HNO) donorok (pl.: CXL-1020 javítja a szívizom funkciót), ciklosporin A (gátolja a mitokondriumok ioncsatornáinak megnyílását és a sejthalált), SERCA2a (szarkoplazmatikus/endoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz 2a, növeli a  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt a szarkoplazmás retikulumba), neuregulin1 (elősegíti a túlélést aktiváló jelátvitelt), VEGF-A, VEGF-B (szabályozza az angiogenezist) stb.

Dominálón oxidatív károsodás és mitokondriális diszfunkció, mint kóroki tényező tekintetében először a Q-SYMBIO vizsgálat és a Coenzim Q10 használata mutatott pozitív eredményeket. A mitokondriális dinamika komplexitását jól szemlélteti, hogy eddig a legtöbb, klinikai gyakorlatban kipróbált gyógyszernek nem sikerült a mitokondriális energiametabolizmust valóban kedvező irányba befolyásolnia.

*Doxiciklin: egy, a klinikai gyakorlatban ismert antibiotikum új arca*

A doxiciklin, a mindennapi gyakorlatban jól ismert antibiotikum hatásos olyan fertőzések leküzdésében, mint a klamídia, gonorrhoea és a Lyme-kór. Kevésbé ismert tulajdonsága a matrix metaloproteinase gátló hatása, amelyhez köthető szívizomhipertrofia-gátló hatása is. Pre-klinika vizsgálatok azt mutatták, hogy a DOX sikeresen alkalmazható bal kamrai remodeling gátlásában és iszkémia-reperfúziós károsodás kivédésében. Ezen előzményekből kiindulva, egy alkalommal eredményesen használták humán klinikai vizsgálatban, ST elevációs infarktuson átesett betegeken, az infarktusos terület csökkentése céljából coronaria intervenció után.

*A rezveratrol, mely számos előnyös kardiovaszkuláris hatással bír*

Számos kísérletes tanulmány bizonyította, hogy a szőlőben és egyéb bogyós gyümölcsökben és a vörösborban is változó koncentrációban megtalálható rezveratrol védő hatással rendelkezik olyan kardiovaszkuláris betegségek kivédésében, mint a koronáriabetegségek, miokarditisz, hipertenzív szívbetegség vagy a szívelégtelenség. Jelen kísérletünkben egy állatmodellen vizsgáltuk a RES hatását a szívelégtelenség progressziójára.

## Célkitűzéseink

1. Első kísérletünk célja: a doxiciklin szívelégtelenségre gyakorolt hatásait vizsgáltuk:
  - 1.1. Kardiomiocita sejtvonalon a doxiciklin sejttúlélésre, mitokondriális fragmentációra és mitokondriális membrán potenciálra gyakorolt hatásait vizsgáltuk oxidatív környezetben.
  - 1.2. Állatmodellben vizsgáltuk hogyan befolyásolja a doxiciklin a szívizom fibrózist, az oxidatív stresszt és a mitokondriális dinamikát szabályozó faktorok aktivitását, mint az OPA-1, Mfn-2 és Drp1.
2. A rezeveratrolnak az izoproterenol-indukálta szívelégtelenségre gyakorolt hatásait vizsgáltuk:
  - 2.1. Echokardiografiával mértük a bal kamra funkciót és szövettani analízist végeztünk a fibrózis és az oxidatív stressz mértékének meghatározására. A szívelégtelenség súlyosságát a plazma BNP szint változásával is követtük.
  - 2.2. Vizsgáltuk továbbá a rezveratrol szívelégtelenség kialakulásában fontos szerepet játszó jelátviteli utakra gyakorolt hatását (Akt-1, GSK-3B, p38-MAPK, ERK 1/2, MKP-1, COX-2 és iNOS).

## Doxiciklin hatásainak vizsgálata poszt-infarktusos szívelégtelenség modellben

### Módszerek

*Sejttúlélés, mitokondriális fragmentáció és mitokondriális membrán depolarizáció vizsgálata kardiomiocita sejtvonalon*

A sejttúlélést SRB assay-vel vizsgáltuk. A mitokondriális fragmentáció mértékének meghatározását Mitotracker red festéssel, a membrán polaritást JC-1 festéssel végeztük.

*Posztinfarktusos szívelégtelenség model*

Hím WKY patkányokban a miokardiális infarktust (MI) 80 mg/kg ISO subcutan adásával idéztük elő, míg a kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak (1 ml/kg). 24 órával a második injekció után, a túlélő patkányokat véletlenszerűen 4 csoportra osztottuk: két csoport 5 mg/kg/nap DOX-t (DOX és ISO+DOX csoportok) kapott ivóvízben feloldva. A másik két csoport a kortárs kontroll (C), illetve a csak ISO-t (ISO) kapott csoportok voltak.

### *Gravimetriás paraméterek*

Az állatokat ketamin hidroklorid túladagolásával altattuk túl. A pitvarokat és a nagy ereket leválasztottuk a kamrákról, megmértük a kamrák tömegét, ezt normalizáltuk a testtömegre és a jobb sípcsont hosszára (szívizom hipertrófia mértékét jelzi).

### *Plazma B-típusú nátriuretikus peptid szint meghatározása*

A vérmintákat EDTA-t tartalmazó Lavender Vacutainer csövekbe vettük le. A plazma B-típusú nátriuretikus peptid-45 szintjét (BNP-45) enzimátikus immunoassay módszerrel mértük meg.

### *Szövettan*

Formalinban fixált kamrákat lemetszettük és paraffinba ágyasztuk. 5 µm vastagságú metszeteket vágunk a bázistól a csúcsig. Az 1 mm-enként nyert szeleteket megfestettük. A metszeteket pikroszirusz vörössel vagy Masson trikrom festésével festettük meg, hogy detektáljuk az intersticiális fibrózis mértékét. A metszeteket NIH ImageJ program segítségével elemeztük.

### *A szívfunkciók noninvazív mérése*

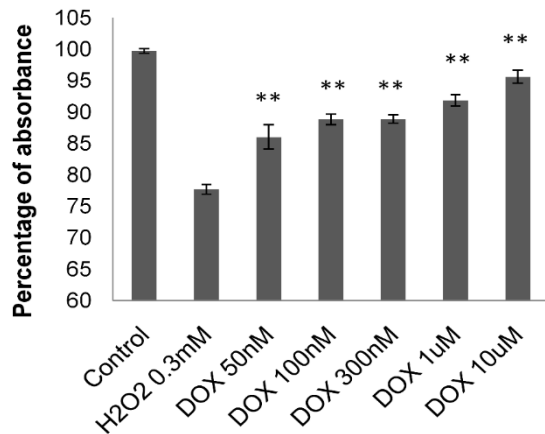
A kísérlet kezdetén és végén minden állatnál szívultrahangos vizsgálat történt. A szív dimenzióit és funkcióit a rövid és hossz tengelyi metszetekből vizsgáltuk a középső papilláris izom szintjében VEVO 770 nagy felbontású ultrahang rendszerrel (VisualSonics, Toronto, Canada) 37.5 MHz-es transzducerrel

### *Western blot analízis*

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

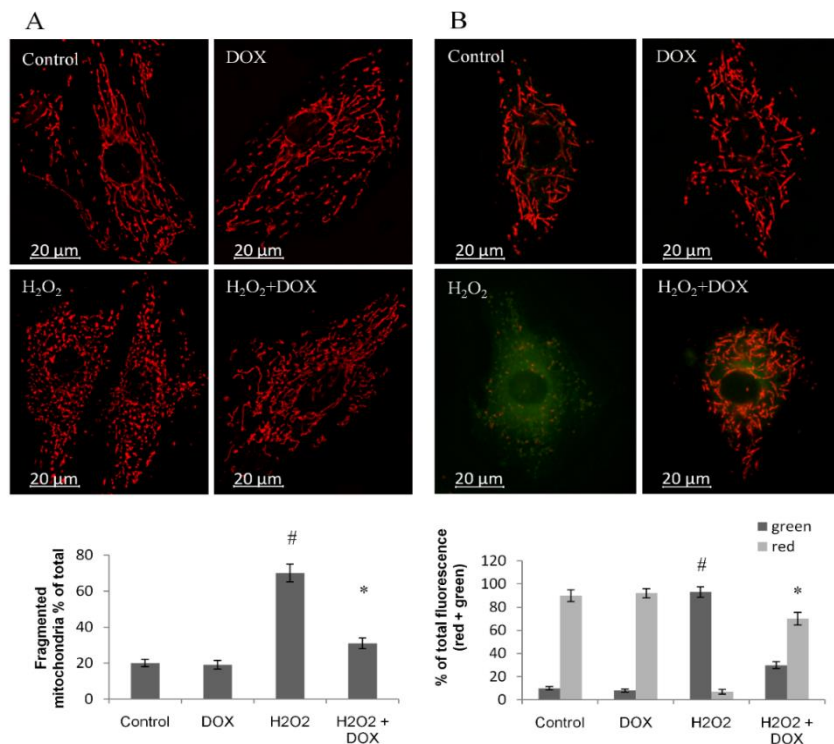
## Eredmények

*A doxiciklin védő hatása a szabadgyökök okozta kardiomiocita pusztulással szemben*



**2. ábra:** H9c2 kardiomiocitákat különböző koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nak tettük ki 24 órán keresztül. 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nál 50%-os degradáció következett be. Növekvő koncentrációjú DOX (50 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM, 10μM) szignifikánsan javította a sejttúlélést (P < 0.01; 2. Ábra).

*A doxiciklin megakadályozta az oxidatív-stressz indukálta mitokondriális fragmentációt és hiperpolarizációt a H9c2 kardiomiociták mitokondriumainak külső membránjában*



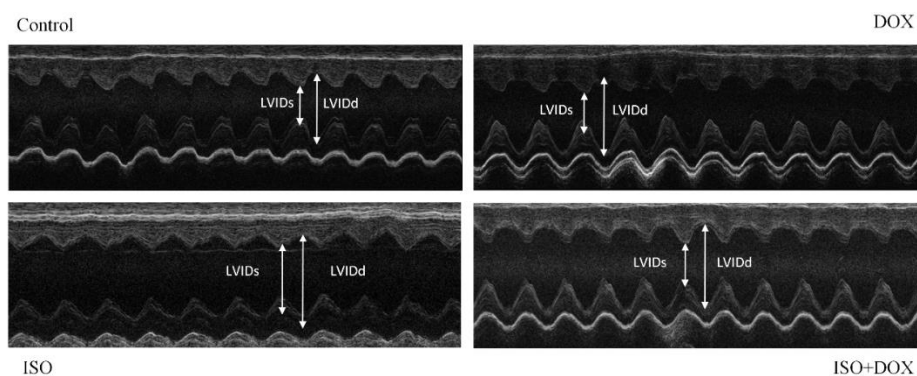
**3. ábra:** H9c2 kardiomiociták mitokondriális depolarizációja és fragmentációja.

(A) Az 5 Mm-os koncentrációjú doxiciklin csökkentette vagy teljesen visszafordította a ROS-indukálta mitokondriális fragmentációt. (B) DOX megakadályozta a mitokondriális membrán depolarizációt a H9c2 sejtekben (#P < 0.05, C vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and \*P < 0.05, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. DOX+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Az ISO kezelt állatokban, DOX hatására, javult a bal kamra funkció, csökkent a bal kamra hipertrófia*

	Kezdeti	Kontroll	DOX	ISO	ISO+DOX
EF (%)	76.42 ± 3.58	73.75 ± 1.39	72.81 ± 1.51	58.84 ± 1.27 <sup>#</sup>	68.39 ± 0.94 <sup>*</sup>
FS (%)	46.93 ± 3.29	44.21 ± 1.41	43.62 ± 1.32	33.29 ± 0.19	39.96 ± 0.56 <sup>*</sup>
Szeptum (mm)	1.52 ± 0.05	1.55 ± 0.04	1.46 ± 0.04	1.79 ± 0.08 <sup>#</sup>	1.57 ± 0.04 <sup>*</sup>
PW (mm)	1.50 ± 0.12	1.49 ± 0.74	1.42 ± 0.03	1.72 ± 0.05 <sup>#</sup>	1.51 ± 0.04 <sup>*</sup>
LVIDd (mm)	8.21 ± 0.21	8.64 ± 0.29	8.30 ± 0.18	8.46 ± 0.07	8.31 ± 0.22
LVIDs (mm)	4.36 ± 0.33	4.77 ± 0.09	4.69 ± 0.19	5.34 ± 0.07 <sup>#</sup>	4.84 ± 0.12 <sup>*</sup>
LVEDV (ul)	365.83 ± 20.43	415.11 ± 32.63	375.50 ± 17.64	371.34 ± 8.83	387.42 ± 22.42
LVESV (ul)	86.31 ± 15.86	107.52 ± 5.73	103.24 ± 9.85	147.16 ± 3.26 <sup>#</sup>	121.42 ± 4.86 <sup>*</sup>
LV mass (mg)	991.69 ± 58.51	989.30 ± 63.91	953.00 ± 21.05	1212.24 ± 48.30 <sup>#</sup>	990.93 ± 59.33 <sup>*</sup>

**2. Táblázat: A doxiciklin hatása az echokardiográfias paraméterekre.** Kontroll csoport (C) (n=5); doxiciklin csoport (DOX) (n=6); izoproterenol csoport (ISO) (n=7); ISO+doxiciklin csoport (ISO+DOX) (n=7). EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális rövidülés, PW: hátsó fal, LVIDd: a bal kamra vég-diasztolés belső átmérője, LVIDs: a bal kamra vég-szisztolés belső átmérője, LVEDV: a bal kamra vég-diasztolés térfogata, LVESV: a bal kamra vég-szisztolés térfogata, LV mass: számított bal kamrai tömeg. <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Kontroll, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO.



**4. ábra:** Reprezentatív echokardiográfias M-mód képek a Kontroll, DOX, ISO and ISO+DOX csoportokról.

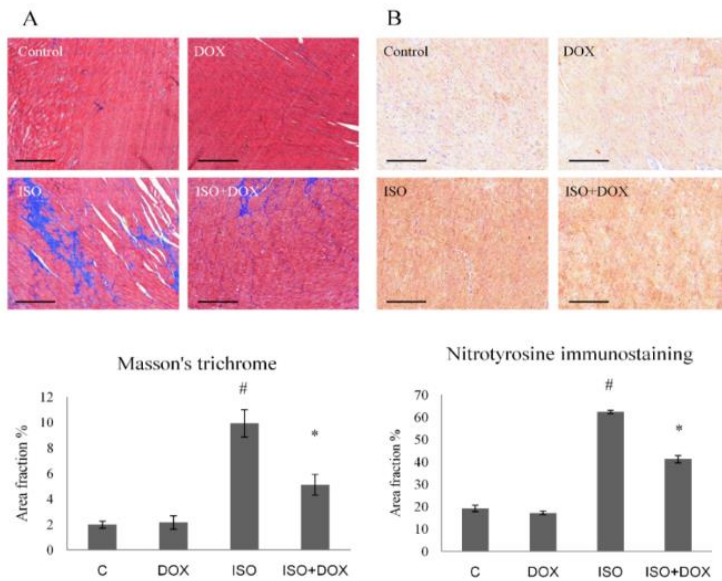
*Doxiciklin kezelés hatására javultak a gravimetrikus paraméterek és csökkent a plazma BNP szintje*

Csoport	Kontroll	DOX	ISO	ISO+DOX
Testtömeg (g)	564.20 ± 21.55	569.67 ± 23.04	515.71 ± 19.66	550.86 ± 14.89
Kamratömeg (g)	1.27 ± 0.02	1.28 ± 0.02	1.46 ± 0.03 <sup>#</sup>	1.31 ± 0.02 <sup>*</sup>
Tibia hossz (mm)	48.00 ± 0.55	48.50 ± 0.76	48.86 ± 0.51	49.43 ± 0.49
Kamratömeg / Testtömeg (mg/g)	2.28 ± 0.12	2.27 ± 0.09	2.87 ± 0.13	2.39 ± 0.06 <sup>*</sup>
Kamratömeg / Tibia hossz (mg/mm)	25.54 ± 0.28	26.51 ± 0.69	29.95 ± 0.47 <sup>#</sup>	26.6 ± 0.92 <sup>*</sup>
p-BNP (ng/ml)	1.62 ± 0.11	1.61 ± 0.01	2.29 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.66 ± 0.10 <sup>*</sup>

(<sup>#</sup>P < 0.05 vs. control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO)

**3. táblázat: A doxiciklin hatása a bal kamra súly/tibiahossz arányra és a plazma BNP szintre.** 8 héttel az ISO-kiváltotta infarktus után, testtömeg kamratömeg és tibiahossz méréseket végeztünk. Kamratömeg / Testtömeg (mg/g) és Kamratömeg / Tibia hossz (mg/mm) arányokat mártunk. Plazma B-típusú Natriuretikus Peptid (p-BNP) szintet határoztunk meg ELISA segítségével. Kontroll csoport (C) (n=5); doxiciklin csoport (DOX) (n=6); izoproterenol csoport (ISO) (n=7); ISO+ doxiciklin csoport (ISO+DOX)

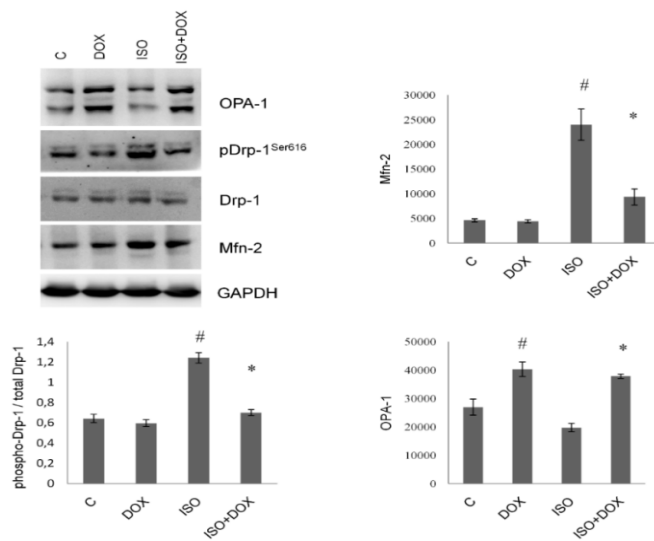
*A doxiciklin hatása az intersticiális kollagén felhalmozódására és a nitrotirozin mennyiségére a szívizom mintákban*



**5. ábra:** Szövettani vizsgálat erőteljes kollagén felhalmozódást és nitrotirozin képződést mutatott ISO stresszt követően (P < 0.05). A doxiciklin kezelés szignifikánsan csökkentette a fibrózis mértékét és a ROS képződést (P<0.05). (5A Ábra).



## Doxiciklin hatása az OPA-1 és a Mfn-2 expressziójára és a Drp-1<sup>Ser616</sup> foszforilációjára



**6. Ábra:** A DOX kedvezően befolyásolta a Mfn-2, OPA-1 expresszióját és a Drp-1 foszforilációját. # P < 0.05 vs control, \*P < 0.05 vs. ISO

## Következtetések

H9c2 kardiomiocitákon és izoproterenol indukálta szívelégtelenség modellben vizsgáltuk a doxiciklin hatásait. Az ISO kezelés hatására szignifikánsan csökkent a bal kamra funkció. DOX hatására megtartottá vált a balkamra funkció, a falvastagságok, és az üregméretek, továbbá, csökkent a fibrózis mértéke és a szabadgyök képződés. (2. táblázat, 4. ábra). Ezekkel az eredményekkel összhangban csökkent a plazma BNP szint is (3. táblázat).

Jelen vizsgálatunk középpontjában a mitokondriumok voltak, mivel ezek a sejtalkotók központi szerepet játszanak az endogén ROS termelésben és integritásuk fenntartása elengedhetetlen a szív normál energia metabolizmusában. Először SRB assay-vel H9c2 kardiomiocitákon teszteltük a DOX hatásait oxidatív környezetben. (Fig 2.), majd a mitokondriális fragmentációra és membránpotenciál változásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Kísérleteink bizonyították, hogy a DOX kezelés megelőzte a ROS okozta mitokondriális fragmentációt és a mitokondriális membrán potenciál összeomlását.

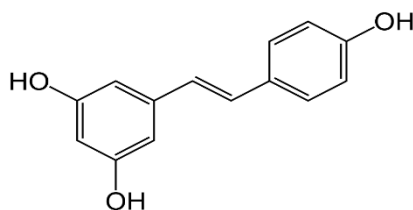
Ezt követően állatkísérletes modellben vizsgáltuk azoknak a GTPázoknak aktivitását, amelyek részt vesznek a mitokondriális dinamika szabályozásában. A Mfn-2 biztosítja az összeköttetést az endoplazmatikus retikulum (ER) és a mitokondriumok között, ezzel szabályozza a Ca<sup>2+</sup> beáramlását az ER felől. ISO modellünkben a DOX kedvezően befolyásolta a mitokondriális fúziót elősegítő OPA-1, és a fragmentációt okozó Drp-1 és Mfn-2 sejten belüli aktivitását.

Eredményeink azt mutatják, hogy a posztinfarktusos szívelégtelenség progressziója csökkenthető DOX kezeléssel. Bizonyítottuk, hogy az eddig ismert szívizomhipertrofiát csökkentő hatásán túl, csökkenti a szabadgyök termelődést és kedvező irányba billenti a mitokondriális dinamika egyensúlyi állapotát.

## Rezveratrol hatásainak vizsgálata poszt-infarctusos szívelégtelenség modellben

A szőlőben, magvakban és elsősorban bogyós növényekben is megtalálható természetes polifenol resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) (RES) (Fig 7.) jótékony hatását már számos kardiiovaszkuláris megbetegedéssel kapcsolatban bizonyították. Ezen hatások háttérében többféle mechanizmust feltételeztek. Jelen kísérletünk célja, hogy a RES-t egy isoproterenollal létrehozott posztinfarctusos modellben, a szívelégtelenség későbbi fázisában is megvizsgáljuk, melynek során vizsgáltuk a bal kamra funkciót, bal kamra hipertrófiát, hegszövet kialakulását, ROS termelődést és intracelluláris jelátviteli utakra gyakorolt hatásait.

A doxiciklinnel végzett kísérlethez hasonlóan, miokardiális infarktust (MI) 80 mg/kg ISO subcutan adásával idéztük elő (két egymást követő napon adva), míg a kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak (1ml/kg). 24 órával a második ISO injekció után, a túlélő patkányokat véletlenszerűen 2 csoportra osztottuk, az egyik csoport 15 mg/kg/nap RES-t (ISO+RES csoport) kapott ivóvízben feloldva, a másik nem kapott további kezelést (ISO). A másik két csoport kortárs kontroll (C), illetve a csak resveratrol kezelt (RES) csoportok voltak.



7. **Ábra:** A rezveratrol (RES) molekulaképlete.

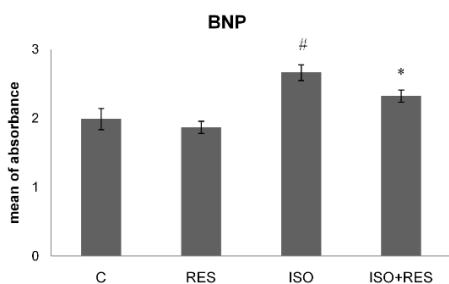
## Eredmények

*Rezveratrol kezelés hatására javultak a gravimetriás paraméterek az ISO-kezelt állatokban*

Csoport	Kontroll	RES	ISO	ISO+RES
Testtömeg (g)	595.86±15.15	596.00±21.30	544.50±11.63	593.86±18.41
Kamratömeg (g)	1.33±0.01	1.31±0.01	1.53±0.02#	1.35±0.01*
Tibia hossz (mm)	51.43±0.72	51.57±0.72	50.86±0.55	49.86±0.35
Kamratömeg / Testtömeg (mg/g)	2.25±0.06	2.21±0.08	2.81±0.06#	2.29±0.09*
Kamratömeg / Tibia hossz (mg/mm)	26.03±0.47	25.33±0.33	29.96±0.28#	27.02±0.13*

4. **Táblázat:** 8 héttel az ISO-kiváltotta infarctus után, testtömeg, kamratömeg és tibiahossz méréseket végeztünk. Kamratömeg / Testtömeg (mg/g) és Kamratömeg / Tibia hossz (mg/mm) arányokat mértünk ±S.E.M. #P<0.05 vs. Control. \*P<0.05 vs. ISO.

A rezveratrol kezelés csökkentette a plazma BNP szintet



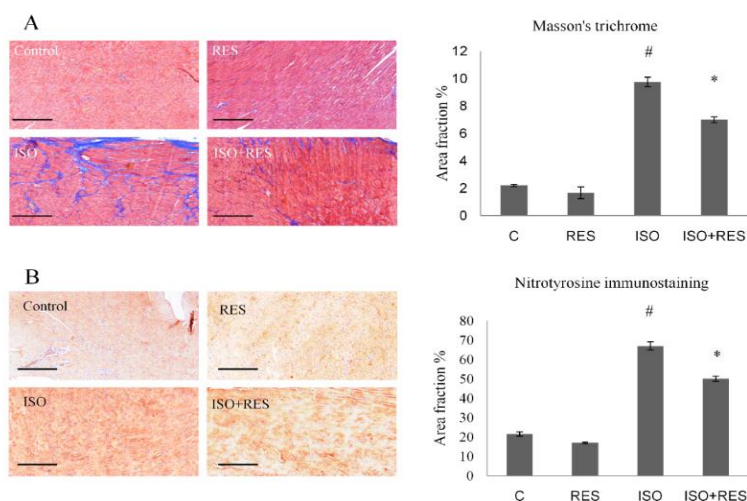
**8. Ábra:** Plazma B-típusú Natriuretikus Peptid szintet határoztunk meg ELISA segítségével. Control csoport (C) (n=5); doxiciklin csoport (DOX) (n=6); izoproterenol csoport (ISO) (n=7); ISO+ doxiciklin csoport (ISO+DOX) (n=7). <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO.

Az ISO kezelt állatokban RES hatására javult a balkamra funkció és csökkent a hipertrofia

	Kiindulás	C	RES	ISO	ISO+RES
EF (%)	75.62±0.87	71.70±1.61	72.47±1.69	56.96±1.43 <sup>#</sup>	67.49±1.14 <sup>*</sup>
Septum (mm)	1.63±0.05	1.65±0.10	1.61±0.03	1.82±0.03 <sup>#</sup>	1.70±0.02 <sup>*</sup>
PW (mm)	1.57±0.03	1.59±0.07	1.59±0.03	1.81±0.06 <sup>#</sup>	1.60±0.02 <sup>*</sup>
LVIDd (mm)	8.19±0.11	8.44±0.22	8.43±0.17	7.88±0.12	8.41±0.23
LVIDs (mm)	4.42±0.08	4.85±0.09	4.69±0.19	5.70±0.2 <sup>#</sup>	4.90±0.12 <sup>*</sup>
LVEDV (μl)	364.23±10.38	393.36±19.32	386.40±16.82	365.54±6.64	401.59±18.63
LVESV (μl)	88.83±4.40	109.9±4.53	106.14±7.26	157.71±7.29 <sup>#</sup>	130.27±6.69 <sup>*</sup>
LV mass (mg)	994.1±21.8	1035.31±59.79	1038.38±44.44	1239.14±76.5 <sup>#</sup>	1041.85±35.50 <sup>*</sup>

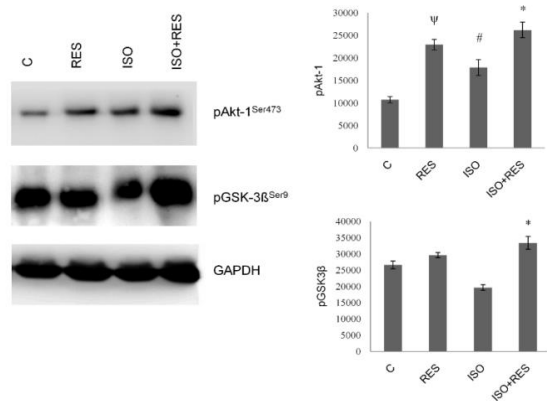
**5. Táblázat:** kontroll csoport (C); rezveratrol csoport (RES); izoproterenol-kezelt csoport: (ISO); ISO+ rezveratrol csoport (ISO+RES). EF: ejekciós frakció, FS: frakcionális rövidülés, PW: hátsó fal, LVIDd: a bal kamra vég-diasztolés belső átmérője, LVIDs: a bal kamra vég-szisztolés belső átmérője, LVEDV: a bal kamra vég-diasztolés térfogata, LVESV: a bal kamra vég-szisztolés térfogata, LV mass: számított bal kamrai tömeg. . <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Kontroll, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO.

Rezveratrol hatására csökkent az intersticiális kollagén és az oxidatív stresszt jelző nitrotirozin mennyisége



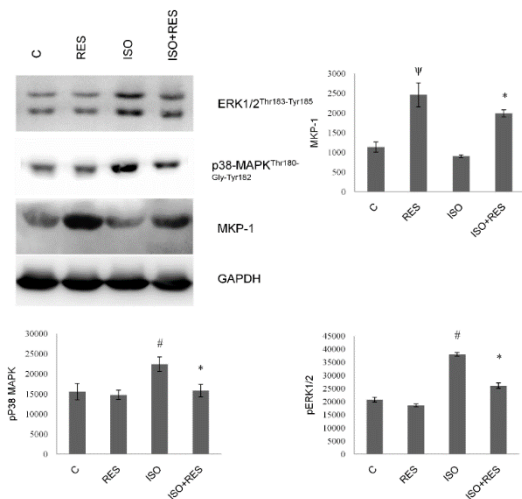
**10.ábra:** Szöveti vizsgálat erőteljes kollagén felhalmozódást és nitrotirozin képződést mutatott ISO kezelést követően (P < 0.05). A RES kezelés szignifikánsan csökkentette ezen károsodásokat (P<0.05). (10A Ábra, 10B Ábra).

A rezveratrol kezelés kedvezően befolyásolta az Akt-1<sup>Ser473</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> foszforilációs állapotát



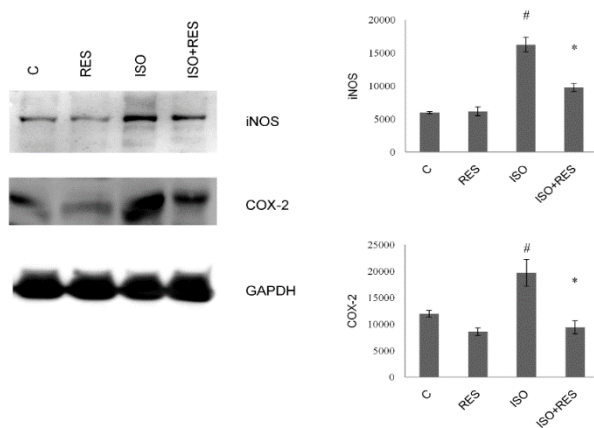
**11. Ábra.** Rezveratrol hatása az Akt-1<sup>Ser473</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> foszforilációra.  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>P < 0.05 vs. Control, <sup>\*</sup>P < 0.05 vs. ISO, <sup>ψ</sup>P < 0.05 C vs. RES.

A rezveratrol csökkentette a p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup>, ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> foszforilációját és növelte az MKP-1 mennyiségét az ISO-kezelt miokardiumban



**12. Ábra.** A rezveratrol hatása a p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup>, ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> foszforilációra és az MKP-1 mennyiségére.  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>P < 0.05 Control vs. ISO, <sup>ψ</sup>P < 0.01 C vs. RES, <sup>\*</sup>P < 0.05 ISO vs. ISO+RES.

A rezveratrol csökkentette a COX-2 és iNOS expresszióját



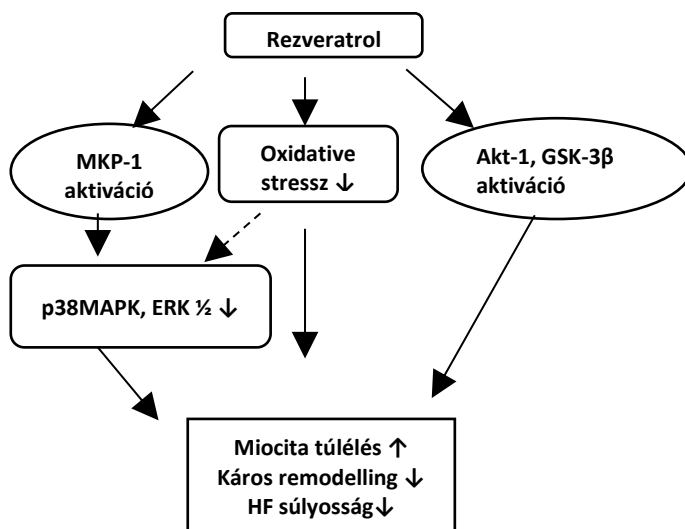
**13. Ábra.** A rezveratrol hatása a COX-2 és az iNOS mennyiségére.  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>P < 0.05 Control vs. ISO, <sup>ψ</sup>P < 0.01 C vs. RES, <sup>\*</sup>P < 0.05 ISO vs. ISO+RES.

## Következtetés

Néhány irodalmi adat áll rendelkezésre a rezveratrol, izoproterenol kiváltotta szívizomhipertrófiában és a remodelling korai fázisában kifejtett védő hatásáról. Kutatócsoportunk korábban megállapította egy vörösbor kivonat jótékony hatását, posztinfarktusos állatmodellben. Ezúttal a RES oxidatív stresszre gyakorolt és a jelátviteli utakra kifejtett hatását vizsgáltuk kifejlődött szívelégtelenség modellben.

Kísérletünkben az Akt-1 és a GSK-3 $\beta$  foszforilációjának emelkedését figyeltük meg minden csoportban. Ennek háttérében az endogén „prosurvival” jelátviteli utak aktiválódása állhat, melyek a RES kezelés hatására tovább növekedtek. A p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> és ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> foszforilációja szignifikánsan csökkent RES kezelés hatására. Ennek háttérében, legalábbis részben, az MKP-1 megnövekedett expressziója állhatott.

A p38-MAPK és ERK1/2 által is aktivált COX-2 szerepe jól ismert a gyulladásos folyamatokban. Hosszú távú COX-2 aktiváció miokardium diszfunkcióhoz, végül szívelégtelenséghez vezet. A RES kezelés csökkentette ezeknek a káros jelátviteli utaknak sejten belüli aktiválódását, valamint az iNOS expressziót, amely szintén káros peroxinitrit szabadgyök képződéshez vezet. Ez utóbbit nitro-tirozin immunhisztokémiai módszerrel is igazoltuk.



**14. Ábra.** A rezveratrol előnyös hatásainak összefoglalója: Akt-1: RAC-alpha serine/threonine-protein kináz, COX: cyclooxygenase, ERK 1/2: extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2, GSK-3 $\beta$ : glikogén szintáz kináz-3 $\beta$ , MAPK: mitogén-aktivált protein kináz, MKP-1: mitogén-aktivált protein (MAP) kináz-foszfátáz-1, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz.

## **Az új eredmények összefoglalása**

### *A DOX kezelés új eredményeinek összefoglalása:*

1. Kutatócsoportunk elsőként bizonyította, hogy a doxiciklin kezelés megállítja a szívelégtelenség későbbi fázisának progresszióját.
2. A ROS okozta mitokondriális fragmentációval és membrán depolarizációval szemben a DOX védő hatásának bizonyult.
3. A mitokondriális dinamikára kifejtett előnyös tulajdonsága háttérében, az OPA-1 megnövekedett, a Mfn-2 csökkent expressziója és a DRP-1 csökkent foszforilációja állhat.

### *A RES kezelés új eredményeinek összefoglalása:*

1. A RES kezelés kivédte az ISO indukálta bal kamra funkció csökkenést, csökkentette a miokardium fibrotikus átalakulását, és lassította a szívelégtelenség progresszióját.
2. A RES védő hatásának háttérében a csökkent oxidatív stressz, és a jelátviteli utakra (Akt-1, GSK-3 $\beta$ , p38-MAPK, ERK1/2, MKP-1, COX-2 és iNOS) gyakorolt előnyös hatása állhat.

## **Köszönetnyilvánítás**

Kísérleteinket az I.sz Belgyógyászati Klinika Szentágothai János Kutató Laboratóriumában és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán 2013 és 2017 között.

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki támogatott és hasznos tanácsokkal látott el. Szintén köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Szabados Eszternek és Dr. Halmosi Róbertnek kitűnő munkájukért, és az echocardiográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom Prof. Sümegei Balázsnak, aki a biokémiai gondolkodásra tanított, segítette munkámat, és zavartalan körülményeket biztosított számomra intézetében.

Hálával tartozok Prof. Gallyas Ferencnek, a kísérleteim kivitelezéséhez és az első tudományos cikkem publikációs folyamatához adott útmutató segítségéért.

Köszönettel tartozom még Erős Krisztiánnak és Dr. Deres Lászlónak a kísérletek során nyújtott segítségükért, és hasznos tanácsaikért.

Hálás vagyok Völgyiné Dózsa Timeának, 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