

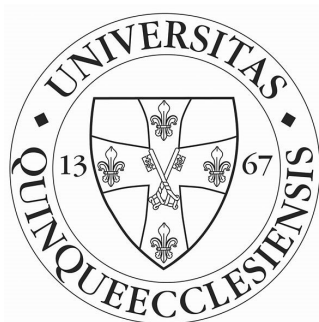
A PARP-1 enzim farmakológiai gátlása a hipertenzív célszerv károsodás ellenében

Ph.D. Tézis

Szerző: Erős Krisztián, MSc.

Programvezető: Prof. Tóth Kálmán, M.D., DSc.

Projektvezető: Halmosi Róbert, M.D., Ph.D.



1.sz. Belgyógyászati Klinika
Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar
Magyarország

2017

1. Bevezetés

1.1. A hipertenzió és kapcsolódó komplikációi

Az artériás hipertenzió az egyik legelterjedtebb kardiovaszkuláris kórkép, mely a felnőtt lakosság több mint egynegyedét, majd 1 milliárd embert érint a Földön. Lefolyása későbbi szakaszaig tünetmentes állapot, azonban a kórkép hosszú távú következményeként adott szervek fokozódó károsodása jelenik meg. Komplex biokémiai, humorális és hemodinamikai mechanizmusok képezik ezen elváltozások alapját - melyet hipertenzív célszerv károsodásként nevezünk -, a közös nevező azonban a reaktív oxigén speciesz/ROS fokozott keletkezése, melyek mindamellet, hogy intracelluláris jelátviteli rendszereket modulálnak, közvetlen károsító hatással is bírnak a biomolekulák tekintetében. Az érfalban található valamennyi sejtfeleség részt vesz ezen oxigén intermedierek képződésében, mint az endothel-, simaizom-, kötőszöveti-, valamint aktivált immunsejtek.

Míg a különböző reaktív oxigén gyökök az érfunkciók fiziológiai szabályzásában is részt vesznek, addig a keletkezésükben és semlegesítésükben felboruló egyensúly egyes patológiai kórképekben – melyet oxidatív stresszként nevezünk – permanens funkcionális és strukturális elváltozásokhoz vezetnek a kardiovaszkuláris rendszerben és az ellátott szövetekben egyaránt. A fokozott ROS produkció fő enzimatis forrásai a NADPH oxidáz, xantin oxidáz valamint a mitokondriális elektrontranszfer lánc/ETC. Az oxidatív stresszelt érrendszerben a potens értágító nitrogén monoxid/NO gyorsan elreagál a szuperoxid anionnal/ O_2^- , az erősen reaktív peroxinitritet/ $ONOO^-$ képezve. Ezen reakció amellet, hogy csökkenti a rendelkezésre álló NO szintjét, elősegíti az endotheliális nitrogén monoxid szintáz/eNOS szétkapcsolását is, mely az értónus szabályzásának zavarát eredményezi. A keletkezett $ONOO^-$, nitrotirozin adduktumok kialakítása révén potenciálisan módosítja a lipoproteineket, illetve DNS sérülést is indukál, mely a nukleáris poli(ADP-ribóz)polimeráz-1/PARP-1 enzim fokozott aktivitásához vezet. Ez utóbbi egy a DNS károsodását észlelő fehérje, mely központi szerepet tölt be a celluláris stresszválaszban.

1.2. A krónikus magasvérnyomás előidézte szív-érrendszeri átépülés és szöveti sérülés folyamatai, valamint a spontán hipertenzív patkány modell

A spontán hipertenzív patkány/SHR törzset az 1960-as években Kyuzo Aoki professzor és munkatársai hozták létre, állandósult emelkedett vérnyomással bíró Wistar-Kyoto/WKY patkányok szelektív beltenyésztése révén. Azóta a kísérletes kardiológia egyik legintenzívebben kutatott organizmusává lépett elő, melynek patológiai elváltozásai az humán elsődleges hipertónia folyamatait idézik.

Krónikus hipertenzió során a hemodinamikai tényezők, a megváltozott neurohumorális aktivitás és a vazodilatátor, illetve -konstriktor erők közti felborult egyensúly eredőjeként az érrendszer adaptív átépülésen esik át, mely hatással van az érátmérőre valamint a vazomotoros válaszra az érfal strukturális átépülését követően. Különböző szignalizációs utak által mediált az ereket érintő remodeláció folyamatai, melyek közül az angiotenzin II előidézte ROS-függő jelátvitel, a mitogén aktiválta protein kináz/MAPK rendszer aktivitása, valamint az NF- κ B vezérelte gyulladás folyamatai döntő szereppel bírnak.

Az idült magasvérnyomás talaján kialakult központi idegrendszeri elváltozásokat elsődlegesen az oxidatív sérülés, továbbá inflammáció által előidézett agyérrendszeri elváltozások és vér-agy gát funkcióromlás indukálja. A cerebrális érrendszer progresszív átépülése agyi hipoperfúziót eredményez, mely tekintetben a hippocampusz egy különösen érzékeny terület az ischemiás történésekre és korai jelzője az elégtelen vérellátás vagy a vér-agy gát diszfunkció következtében fellépő agysérülésnek. Habár a hippocampuszban lezajló neurodegeneratív folyamatokat főként akut ischemia-reperfúzió során tanulmányozzák, az SHR törzs egy krónikus állatmodellt jelenthet a magas vérnyomáshoz köthető agyi patológiai elváltozások kapcsán.

A szív tekintetében a hipertóniával kapcsolatos remodeláció elsődlegesen a miokardium hipertrófikus válaszára vezethető vissza, mely a szívteljesítmény és a szöveti oxigénellátás fenntartását szolgálja az emelkedett perifériás ellenállással szemben. Egy bizonyos határ felett az előrehaladott falvastagodás patológiai elváltozásokat indukál az elégtelen oxigénellátás és a szívizomsejtek módosult metabolizmusa okán, mely a szívfal kötőszöveti felhalmozódással és sejthalállal kísért szerkezeti átépülését eredményezi. Az elégtelen bioenergetikai adaptáció és a mitokondriális minőségkontrol zavarai -mely magába foglalja azok hasadását, összeolvadását, valamint szelektív eliminációjukat (mitofágia)-, mind kulcsfontosságú tényezők a folytonosan dolgozó, masszív energiaigényű miokardium patológiás remodelációja során.

1.3. A nukleáris PARP-1 enzim fiziológiai funkciói és szerepe stressz során

A PARP-1 egy DNS károsodást érzékelő fehérje, mely alacsony vagy enyhe genotoxikus stressz során részt vesz a DNS javító komplex felépülésében és működésében. Továbbá, egyéb nukleáris proteinekkal – mint a transzkripciós faktorok és hiszton szabályzó fehérjék- interakcióban, képes kromatin-dependens módon nagymérvű transzkripciós programokat szabályozni. A stressz indukált PARP-1 aktivitás bizonyítottan interakcióban áll olyan létfontosságú intracelluláris szignalizációs utakkal, melyek a gyulladás folyamatait (NF- κ B koaktiváció), továbbá a sejtek stressz-adaptációját, illetve túlélését szabályozzák. Hosszan tartó vagy kiterjedt genotoxikus stressz során a PARP-1 enzim hiperaktivációja lép fel, mellyel kimeríti a nukleáris NAD⁺ készletet. Ekképpen, túlzott aktivitása limitálja egyéb NAD⁺-dependens nukleáris enzim, mint a szirtuinok funkcióját, valamint a sejtet metabolikus összeomlás felé vezeti a gyengült glikolitikus folyamatok és fokozott ATP felhasználás révén. Eredetileg, e mechanizmusokat tekintették a kaspáz-független szabályozott nekrozis (Parthanatos) fő kiváltójának. PARP-1 mediált nekroptózis során a mitokondrium kulcsfontosságú szabályozási pontot képviselhet. Oxidatív stresszelt celluláris modellben a Parthanatos folyamatát nagymérvű mitokondriális depolarizáció, szekunder O₂⁻ produkció és emelkedett intracelluláris Ca⁺⁺ szint kísérte. A megduzzadt mitokondriumok súlyosan sérült ultrastruktúrát mutattak, mely elváltozásokat a PARP-1 enzim hiánya vagy farmakológiai gátlása kivédte.

Hagyományosan, a túlzott PARP-1 aktivitás káros következményeit olyan akut, oxidatív DNS károsodással járó események során vizsgálták, mint szöveti iszkémia-reperfúzió vagy modellekben, ahol a DNS károsítást alkiláló ágensekkel vagy besugárzással érték el. A későbbiekben felfedték a PARP-1 szöveti sérülésben játszott szerepét is olyan emelkedett ROS termeléssel jellemezhető krónikus betegségekben is, mint a magas vérnyomás vagy a diabétesz.

2. Célkitűzések

Az oxidatív stressz jeleinek megfigyelését tűztük ki célul SHR állatok különböző szöveteiben, valamint felfedni olyan mechanizmusokat, melyek révén az hozzájárul a krónikus magasvérnyomás indukálta célszervkárosodás kialakulásához. Különös tekintettel a PARP-1 aktiváció szerepére ezen folyamatok során.

Célkitűzés I.: A krónikus magasvérnyomás indukálta érártépülés vizsgálata SHR állatokban a karotis artériák szintjén, a PARP-1 enzim hosszú-távú farmakológiai gátlása tükrében.

Az SHR törzsben már leírt, különböző érszégmenseket érintő szerkezeti és funkcionális remodelláció magába foglalja az endothel réteg sérülését és diszfunkcióját, az érártméroó változásait és az érfal kötőszöveti felhalmozódással kísért megvastagodását. Ezen célkitűzésben, a karotis artériák szintjén megfigyeljük ezen folyamatokat, melyek szorosán kapcsolhatók e törzs érrendszerében az emelkedett oxidatív stressz jelenlétéhez. Mindamellert, hogy oxidatív DNS károsodás során sejthalál folyamatokat indukálhat, a PARP-1 enzim aktivitásának intracelluláris szignalizációs utakkal való kölcsönhatása propagálhatja a stresszelt érszakasz fenotipikus elváltozásait. Ezért, megvizsgáljuk a sejten belüli szintet és megoszlást a sejthalál, a gyulladás folyamatainak, valamint a MAPK rendszer aktivitásának szabályzóit tekintetében.

Célkitűzés II.: Az SHR törzsben a dorzális hippocampusz területén a krónikus magas vérnyomáshoz köthető elváltozások felfedése fókuszban az oxidatív stressz mértékével, illetve sejthalál folyamatokkal.

A magasvérnyomás indukálta érártépülés egyik legkárosabb velejárója az ellátott szövetek elégtelen perfúziója. Miként az agy egy nagy energia igényű szerv, amely alacsony ischemiás toleranciával bír, krónikus hipertenzió során az erek elváltozásainak mérséklése vélhetően jótékony hatású a demenciák különböző formáiban. Továbbá, az idegszövet védelme a vér-agy gát szerkezetén alapul, melynek integritása romlik idült magas vérnyomás során a gyulladás folyamatai és endothel sérülés révén. Ezen célkitűzésben, a PARP-1 aktivitás farmakológiai modulációjával kapcsolatban specifikusan az oxidatív stresszhez kapcsolható szöveti sérülésre és sejtvesztésre fókuszálunk a dorzális hippocampuszban, mint a hipertenzív célszerv károsodás agyi modellterületében az SHR állatokban.

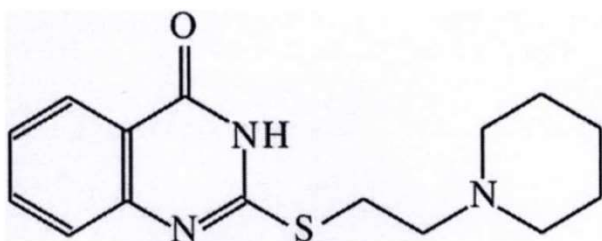
Célkitűzés III.: A PARP-1 gátlás mitokondriális protektív hatásának vizsgálata szívizomban.

Idült magasvérnyomásban a szívizom hipertrófiával alkalmazkodik az emelkedett munkaterheléshez. E kompenzatórikus fázisban, a szívfunkció fenntartásához alapvető a kardiális mitokondriumok adaptációs képessége metabolikus folyamataik tekintetében. A mitokondriális minőségkontroll zavarai és a celluláris anyagcsere hanyatlása elősegíti a kardiális funkcióromlást és a szívizomsejt vesztést, mely szívelégtelenség kialakulásához vezethet. A mitokondriumok rendkívül dinamikusan változó organellek, melyek a megváltozott körülményekhez fúziós és hasadási folyamataik egyensúlyának eltolódásával reagálnak. E célkitűzésben minőségi megállapításokat kísérünk tenni az ultrastruktúra szintjén, valamint számszerűsíteni a mitokondriumok fúziós és hasadási folyamatainak aktuális állapotát a hipertrofizált szívizomban. Továbbá, a hosszú idejű L-2286 PARP-1 gátló szer kezelés hatása kerül megállapításra a DRP1 és OPA1 szintjére teljes sejt lizátumban és szubcelluláris frakciókban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kezelőanyag

A vízdékony PARP-1 gátló vegyület, 2-[(2-Piperidine-1-ylethyl)thio]quinazolin-4(3H)-one (L-2286) (1. ábra) a Szerves- és Gyógyszerészeti Kémiai Intézetből, Hideg Kálmán és Kálai Tamás professzor urak nagylelkű felajánlása volt. A vegyület egy csoport kísérleti 4-kinazolin származékból került kiválasztásra, melyek szintézise a PARP-1 enzim katalitikus doménjének kristályszerkezete alapján történt. In vitro mérések alapján e vegyület IC_{50} értéke $2.6 \mu M$ az izolált human PARP-1 enzimmel szemben.



Ábra 1.: Az L-2286 (2-[(2-Piperidine-1-ylethyl) thio] quinazolin-4 (3H)-one) kémiai szerkezete

3.2. Kezelés

A 10 hetes hím SHR patkányok és koregyeztetett normotenzív kontrollként WKY állatok a Charles River Laboratories-tól kerültek beszerzésre. Az állatok egyenként lettek elhelyezve műanyag tárolókban, tartásuk 12 órás fény/sötétség cikluson, állandó 24 °C-on történt. Az ultrahangos vizsgálatokat követően - mely egyben arra is szolgált, hogy az esetlegesen karotisz artéria abnormalitással rendelkező állatokat kizárjuk a kísérletből -, mindkét törzs egyedeit két csoportba randomizáltuk (15 állat/csoport), melyek ivóvízzel történő, 5mg/ttkg/nap L-2286 kezelésben részesültek (WKY-L, SHR-L csoportok) vagy nem (WKY-C és SHR-C csoportok), 32 héten át.

3.3. Vérnyomás mérés

A kezelés kezdetétől fogva minden 4. héten nem-invazív vérnyomásmérést végeztünk fark mandzsettás készülékkel. A normothermia fenntartása, illetve a farkartériák konstrikiójának megakadályozása érdekében fűtőpadot alkalmaztunk. Minden egyes időpontban, állatonként 3 mérés került átlagolásra.

3.4. A karotisz artériák intima-media vastagságának (IMT) megállapítása, in vivo

2D ultrahangos vizsgálatot végeztünk a kezelés kezdetén, illetve utolsó hetében inhalációs altatás alatt. A karotisz artériák falvastagságának mérése, egy 40 MHz transzducerrel ellátott VEVO 770 nagy felbontású ultrahang képalkotó segítségével történt.

3.5. Karotisz artériák vazomotoros készségének izometriás mérése

Az eljárást a standard protokollt követve végeztük csoportonként négy állat izolált karotisz artériáján. Az izometrikus kontraktilis erő mérése szervfürdőben, oxigenizált

fiziológiás Krebs oldatban történt. Az artéria gyűrűket előfeszítettük majd hagytuk kiegyenlítődni 60 percig, míg azok standard nyugalmi feszülésüket elérték. Az érrelaxáció mértéke a 60 mM KCl oldattal elért kontrakció %-os arányában került ábrázolásra. A karotisz gyűrűk vazomotoros kumulatív válaszgörbéjét vettük fel nitroprusszid-nátrium/SNP vagy acetilkolin/ACh emelkedő dózisainak (10^{-9} - 10^{-5} M) jelenlétében. Azon karotisz gyűrűket tekintettük intakt endotheliummal rendelkezőnek, melyek ACh-ra adott relaxációs válasza meghaladta a 30%-ot. A kísérlet végeztével, a karotisz gyűrűk funkcióképességének megállapítása újonnan 60 mM KCl oldat adagolásával történt. Minden mérés külön állatból származó izolált artériagyűrűkön történt.

3.6. Konfokális pásztázó fluoreszcens mikroszkópia

Csoportonként négy állat bal oldali karotisz artériáját a kivételt követően közvetlenül 4%-os pufferelt paraformaldehid/PFA oldatban fixáltuk egy éjszakán át $+4^{\circ}\text{C}$ -on. 5 μm vastag metszetek kerültek feldolgozásra az alábbi antitestekkel való immunjelöléshez: apoptózis indukáló faktor/AIF, NF- κB , mitogén aktivált protein kináz foszfatáz 1/MKP-1. Hoechst magfestést követően a metszetek vizsgálata Olympus Fluoview 1000 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal történt. A Rhodamine RedTM-X jel felvételét követően a magfestés képalkotása történt.

3.7. Hisztokémiai vizsgálatok

3.7.1. Karotisz erek

Paraffinba ágyazott karotisz metszeteken az intersticiális fibrózis vizsgálata Masson trikróm festéssel történt, melynek mérése az ImageJ program 'color-deconvolution' beépülő modulja segítségével történt, ami elválasztotta a kék kollagén festés csatornáját. A méréseket a szövettel borított területre normalizáltuk, ábrázolásuk területszázalékban történt. Minden preparátumon három, át nem fedő terület mérése került átlagolásra a tunica media területéről.

3.7.2. Dorzális hippokampusz

Ketamin/xylazine mélyaltatást és thorakotómiát követően az aortagyököt kanüláltuk és a jobb femorális artériát átmetsztük, hogy megfelelő utat nyissunk az elfolyáshoz. Az állatokat elsőként fiziológias sóoldattal perfundáltuk, hogy a vért megfelelően kimossuk az érrendszerből, melyet PFA követett a perfúziós fixálás érdekében. Dekapitációt követően az agyakat eltávolítottuk, majd a féltekék elválasztását követően éjszakán át tartó utófixálást végeztünk PFA oldatban, +4°C-on. Paraffinba ágyazott blokkokból koronális metszeteket vettünk, megközelítőleg a bregma pozícióhoz viszonyított (-4,3) – (-3,8) koordináták közt (Paxinos&Watson). A metszeteket perjódsvav-Schiff-reakcióval/PAS, illetve Cresyl-ibolya festéssel dolgoztuk fel. A hippokampális piramissejtek számának megállapítása a CA1-CA2 határ, illetve CA1-entorhinális kéreg átmenetének legalacsonyabb pontja közti szakaszon végeztük Cresyl-ibolya festett metszeteken. A TUNEL jelölést beágyazott agymetszeteken hajtottuk végre a gyártó ajánlását követve. Minden hisztológiai minta feldolgozása és kiértékelése kettős-vak módszerrel történt.

3.8. Immunhisztokémia

3.8.1. Karotisz artériák

Karotisz artéria metszeteket nitrotirozin/NT immunhisztokémiára dolgoztunk fel. A jelet biotinilált tormaperoxidáz konjugált szekunder antitesttel tettük láthatóvá avidin-biotin-peroxidáz erősítéssel, 3,3'-diaminobenzidin/DAB-ot használva, mint kromogén.

3.8.2. Dorzális hippokampusz

Agymetszeteket immunhisztokémiai jelölésre készítettük elő, az alábbi epitópotokat felismerő antitestekkel: NT, 4-hidroxynonenal/4-HNE, anti-poly(ADP-ribóz)polymer/PAR, 8-

oxoguanin/8-OxG és gliális fibrilláris savas fehérje/GFAP. Az immunjelölést univerzális Vectastain ABC elit kit segítségével tettük láthatóvá, DAB-ot használva kromogénként.

3.9. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Ketamin/xylazine mélyaltatást és thorakotómiát követően, a szíveket az aortagyökön keresztül retrográd módon perfundáltuk foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal/PBS, hogy a vért eltávolítsuk az érpályából, amit módosított Karnovsky-fixáló követett (2% PFA, 2,5% glutáraldehid, 0.1 M Na-kakodilát puffer, pH 7,4 kiegészítve 3 mM CaCl₂-dal). Ezt követően 1 mm vastagságú mintákat vettünk a bal szívkamra szabad falából. A dehidratált blokkokat Durcupan gyantába merítettük, majd Durcupan tartalmú zselatin kapszulákba ágyasztuk. 1 µm félvékony, illetve 70 nm-es ultravékony metszeteket vettünk Leica ultramikrotóm segítségével, melyeket hálós, vagy kolloidin-borított egynyílású réz gridekre vittük fel. További kontrasztosításhoz uranil-acetát, illetve ólom-acetát oldatot használtunk. A preparátumokat egy JEOL1200EX-II elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A nyert képeken a rostközi mitokondriumok területének mérése ImageJ programban történt szabadkezes kijelöléssel (n~500/csoport), ahol a hosszanti tengely mérete és a kriszta membránok száma is megállapításra került.

3.10. Western blot

3.10.1. Teljes-sejt preparátum

50 mg bal kamrai szívszövetet jéghideg izolációs oldatban homogenizáltuk, majd 750 g-n centrifugáltuk 12 percig. A felülúszót 2X-es SDS-poliakrilamid gélelektroforézis pufferben vettük fel, ezt követően 5 percig denaturáltuk 95 °C-on.

3.10.2. Szubcelluláris frakciók

A szívsvövetet jéghideg izolációs pufferben daraboltuk, majd jégen tartva Turrax segítségével feltártuk, ezt követően Potter-Elvehjem homogenizálóval dolgoztuk fel. 12 perc 750 g-n történő centrifugálás után a citoszólikus és mitokondriális frakciókat tartalmazó felülúszót leszívtuk a nukleáris fehérjéket tartalmazó üledékről. A felülúszót 12 percig centrifugáltuk 11000 g-n, így a felülúszóban citoszólikus, míg az üledékben a mitokondriális frakciót nyertük ki, melyeket külön vettünk fel 2X-es SDS-poliakrilamid gélelektroforézis pufferben, majd 5 percig denaturáltuk 95 °C-on.

3.10.3. Elektroforézis és immunoblot eljárás

A fehérjéket 7% vagy 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránon rögzítettük. Blokkolást követően a membránokat egy éjszakán át, +4°C-on inkubáltuk az alábbi antigéneket felismerő primer antitestekkel: dynamin related protein 1/DRP1, optikus atrófia protein 1/OPA1 és anti-PAR. Töltési kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz valamint piruvát dehidrogenáz komplex elleni antitestet alkalmaztunk a teljes sejt preparátumok és a citoszólikus frakciók esetében, valamint a mitokondriális frakcióhoz, rendre. Mosási ciklusokat követően a membránokat 2 órán át, szobahőn inkubáltuk az adekvát kecske anti-nyúl/anti-egér tormaperoxidáz konjugált szekunder antitestekkel. Az antigén-antitest komplexeket kemilumineszcencia segítségével mutattuk ki. A kapott eredmények számszerűsítése a NIH ImageJ programban történt. A sávok denzitását a megfelelő töltési kontrollra normalizáltuk.

3.11. Statisztikai kiértékelés

A csoportok adatainak normál eloszlását Shapiro-Wilk teszt segítségével ellenőriztük. A kezelés kezdetén a törzsek összehasonlítása páratlan mintás t-tesztel történt. A karotisz artériákon és dorzális hippokampuszban folytatott mérések kiértékelésére törzs X kezelés 2-utas ANOVA-t alkalmaztunk a faktorok két szintje mellett, melyet azok szignifikáns

interakciója esetén független mintás t-teszt követett. A mitokondriális adatok összehasonlítására 1-utas ANOVA tesztet használtunk Welch korrekcióval, melyet Dunnett *post hoc* teszt követett, hogy megállapítsuk a csoportok közti különbség szignifikanciáját az SHR-C csoporthoz viszonyítva. Az adatok nem normál eloszlása okán a mitokondriális terület és hosszanti tengely mérési eredményét Kruskal-Wallis teszttel analizáltuk, melyet *post hoc* páronkénti összehasonlítás követett az SPSS program 21-es verziójában. Az adatok átlag±S.E.M formátumban kerültek ábrázolásra, a $p < 0,05$ értéket tekintettük a szignifikancia kritikus határának.

4. Eredmények

4.1. Célkitűzés I.: A krónikus magasvérnyomás indukálta érátépülés vizsgálata SHR állatokban a karotisz artériák szintjén, a PARP-1 enzim hosszú-távú farmakológiai gátlása tükrében.

4.1.1. **A hosszú távú L-2286 kezelés mérsékelte a karotisz artériák strukturális és funkcionális átépülését a hipertenzív patkányokban**

A szisztolés vérnyomásérték emelkedése az SHR csoportokban mindvégig szignifikáns volt, az alkalmazott kezelés nem gyakorolt jelentős hatást e paraméterre.

42 hetes korban az SHR állatok karotisz artériái jelentős eltérést mutattak a normotenzív kontrollhoz viszonyítva az érfalvastagság majd kétszeres növekedésével. Habár az alkalmazott kezelés mérsékelte e magasvérnyomáshoz köthető folyamatot, normotenzív állatokban nem gyakorolt hatást az érfal vastagságára. A kollagén tartalom vizsgálata Masson trikróm festett metszeteken nagymérvű felhalmozódást mutatott a 42 hetes SHR-C állatok karotisz artériáiban. A kezelt hipertenzív patkányokban az érfal visszafogott vastagodását a kollagéntartalom nagymérvű csökkenése kísérte.

A hipertenzió patogenezise során az érrendszerben való fokozott O_2^- termelődés a potens vazodilatátor NO-dal reagálva ONOO⁻ képződéshez, valamint vazomotoros zavarokhoz vezet. A karotisz artériák ONOO⁻ módosított lipoprotein tartalmának jelölése nagymértékű nitrált

tirozin felhalmozódást mutatott az SHR-C állatokban. A hosszú idejű L-2286 kezelés csökkentette a NT formálódást mindkét törzs ereiben.

A következőkben feltettük a kérdést, vajon a PARP-1 gátlás jótékony hatása a karotisz érfalak oxidatív sérülésére és szerkezeti átépülésére megjelenik-e funkcionális szinten is. Megvizsgáltuk izolált karotisz artériák vazomotoros készségét 60 mM KCl előfeszítéssel szemben ACh és SNP emelkedő dózisainak jelenlétében. A 32 hetes L-2286 kezelés elősegítette az SHR-L csoport karotisz gyűrűiben az endothel-függő relaxációs képesség megőrzését ACh adagolásra. Az SNP egy NO donor molekula, melynek hatása a vaszkuláris simaizomsejt funkción nyugszik. Az anyag jelenlétében a hipertenzív állatok izolált karotisz gyűrűi fokozott reaktivitást mutattak, már az alacsony dózistartományban is. Az L-2286 kezelés némileg módosította az SHR-L állatok karotisz gyűrűinek SNP-re adott vazomotoros válaszát, ez a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

4.1.2. A hosszú idejű PARP-1 gátlás szignalizációs kölcsönhatásai karotisz artériákban.

A fokozott PARP-1 aktivitás indukálta sejthalál egyik alapvető jellemzője az AIF kiszabadulása a mitokondriális membrán-közi térből majd transzlokációja a magba, mely a DNS nagymérvű fragmentálódását kezdeményezi. Karotisz artériákban konfokális mikroszkópia segítségével a fluorofór jelölt AIF kolokalizációja a magfestéssel csak a kontrol hipertenzív állatok sejteinek egy részében volt megfigyelhető, míg L-2286 kezelt SHR állatok, illetve a normotenzív patkányok esetében nem.

Az egyes érszakaszok hipertenzió indukálta fenotipikus elváltozásait javarészt az NF- κ B funkcióhoz köthető gyulladás folyamatai és az ér celluláris komponenseinek megváltozott fiziológiája vezérli, mely az oxidatív és mechanikus stressz okozta MAPK rendszer aktivitásváltozására is visszavezethető. Az MKP-1 immunfluoreszcens jelölése felfedte annak emelkedett expresszióját a kontrol hipertenzív patkányok karotisz artériáiban a WKY csoportokhoz viszonyítva, mely emelkedést az L-2286 kezelés az SHR állatokban tovább fokozott.

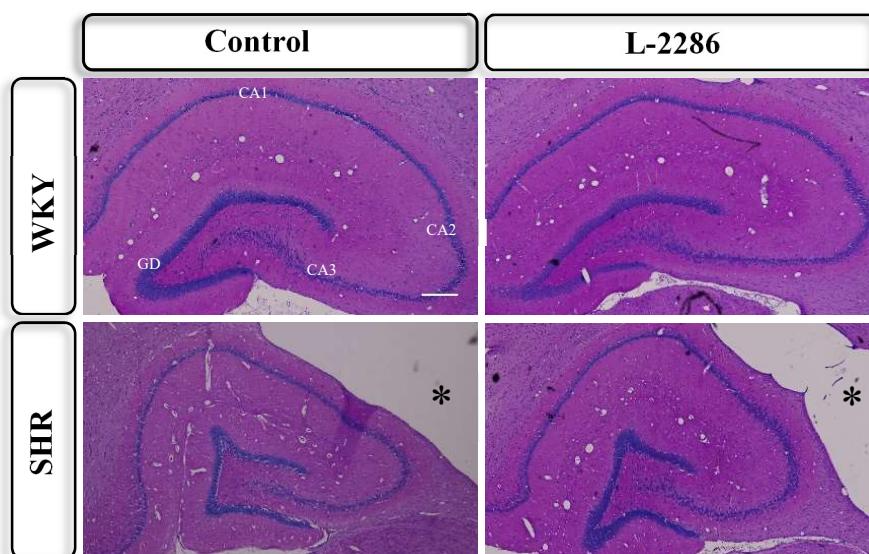
A kontroll magasvérnyomásos csoport karotisz ereiben fokozott NF- κ B aktiváció és nukleáris transzlokáció volt megfigyelhető a WKY állatokhoz képest, ahol konfokális mikroszkópia révén az többnyire az extranukleáris kompartmentekben volt megtalálható. Fenti folyamatot a hosszú távú L-2286 kezelés nagymértékben visszafogta az SHR állatok esetében.

4.2. Célkitűzés II.: SHR törzsben a dorzális hippocampusz területén a krónikus magas vérnyomáshoz köthető elváltozások felderítése, fókuszban az oxidatív stressz mértékével, illetve a sejthalál folyamatokkal.

4.2.1. A dorzális hippocampusz szerkezeti elváltozásai hipertenzív patkánymodellben

A szisztémás L-2286 adminisztráció hosszú távú hatásait kívántuk megfigyelni a hipertenzív célszervkárosodásra SHR modellben, külön fókuszálva az oxidatív stressz jeleire és károsító következményeire az idegszövetben. E célra a dorzális hippocampusz területe alkalmas modellnek mutatkozott.

Makroszkóposan a krónikus hipertenzív patkányokban az agykamrák nagymérvű tágulata mutatkozott. Valószínűsíthetően az így kifejtett nyomás eredményezte a hippocampális szerkezet deformitását, mely a mediolaterális tengely rövidülésében és a gyrus dentatus csúcsi részének ellapulásában mutatkozott meg (2. ábra). Jóllehet a hosszú távú PARP-1 gátlás nem bírt szembetűnő hatással ezen elváltozásokra a kezelt magasvérnyomásos patkányokban, a hippocampális területet ellátó transzverzális erek szerkezete jobban megőrzöttnek mutatkozott a kontroll SHR állatokban megfigyelhető szabálytalan érlumen formákhoz képest. Az erek környezetében a fehérállomány lacunáris károsodása volt elszórta megfigyelhető az SHR állatokban, mely a kezelt magasvérnyomásos patkányokban alacsonyabb előfordulással, míg a WKY állatokban nem volt fellelhető.



Ábra 2.: A patkány dorzális hippocampusz krónikus magasvérnyomáshoz köthető strukturális elváltozásai. A dorzális hippocampusz szerkezete adott csoportokban PAS festett metszeteken. (skála: 200 μ m). GD, gyrus dentatus; CA1, cornu ammonis 1; CA2, cornu ammonis 2; CA3, cornu ammonis 3; * jelöli a laterális agykamra üregét.

4.2.2. Az L-2286 szisztémás adása SHR állatokban mérsékelte a dorzális hippocampusz területén az oxidatív sérülés mértékét.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a lipoproteinek és lipidek oxidatív károsodásának mértékét, metszeteken NT és 4-HNE immunhisztokémiát végeztünk, rendre. Ezen vizsgálatok során, a magasvérnyomáshoz köthető nitrotirozin felhalmozódást, valamint fokozott lipidperoxidáció jeleit találtunk SHR állatokban a hippocampális formáció sejtes elemeiben és rostjaiban. A csökkent ROS képződés jeleként a hosszú távú L-2286 kezelés visszاسzorította a NT és 4-HNE termékek felhalmozódását ezen területen a magasvérnyomásos patkányokban. A CA1 terület piramissejtjeiben vizsgáltuk a DNS oxidáns indukálta bázismódosulatait, a 8-oxoG termékek vizualizációjával. E területen, SHR-C állatokban a magok nagyobb hányada mutatott pozitívítást a normotenzív csoportokhoz viszonyítva. Az alkalmazott kezelés az SHR állatokban visszafogta a DNS oxidatív károsodását. Összefoglalva, a krónikusan magasvérnyomásos állatokban jelentősen magasabb volt az oxidatív stressz mértéke a dorzális hippocampusz területén, ami az idegszövet magasvérnyomáshoz köthető károsodásának egyik modell régiója. SHR állatokban e folyamat, illetve a következményes sérülés mértéke jelentősen visszafogottabb volt a PARP-1 enzim farmakológiai gátlásának folyamánként.

4.2.3. A hosszú idejű L-2286 kezelés SHR állatokban csökkentette a piramissejt vesztést a CA1 régióban

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az emelkedett oxidatív stressz és a kapcsolódó DNS károsodás fokozott PARP-1 aktivációt okoz-e az SHR állatok CA1 régiójában. A 8-oxoG megfigyelésekkel párhuzamban, a normotenzív csoportokhoz viszonyítva fokozott PARP-1 aktivációt találtunk az SHR állatok CA1 piramissejtjeinek magjaiban jellemzően széli jelöléssel. A hosszú idejű PARP-1 gátlás L-2286 kezelés révén csökkentette a PAR jelölést a kezelt állatokban. Feltételeztük, hogy a megfigyelt fokozott PARP-1 aktivitás sejthalál folyamatokat indukálhat, ezért Cresyl ibolya festett metszeteken számszerűsítettük a CA1 piramissejt tartalmát. Az eredmények kifejezett atrófiát mutattak a szignifikáns mértékben csökkent piramissejt számokkal az SHR állatokban. A PARP-1 aktivitás farmakológiai

modulációja a magasvérnyomásos patkányokban elősegítette a CA1 régió sejtszámának megőrzését.

Annak érdekében, hogy felfedjük az éppen lezajló sejthalál folyamatokat, TUNEL tesztet alkalmaztunk az agymetszeteken, hogy a fragmentált DNS tartalommal rendelkező magokat vizualizáljuk. Eme vizsgálatokban a hipertenzív patkányok csökkent CA1 piramissejtszámát a TUNEL pozitív sejtek nagyobb aránya kísérte. Míg a 32 hetes L-2286 kezelés nem bírt nagymérvű hatással a CA1 területének sejtszámára, illetve a lezajló sejthalál folyamatok előfordulására Wistar állatokban, a kezelt SHR patkányok e tekintetben jóval megőrzöttebb képet mutattak.

Az asztrogliaktiváció az idegszövetben a zavart mikro környezet indikátora, melyre a gliasejtek méretük (hipertrófia) vagy számuk (hiperplázia) növelésével reagálnak, hogy támogassák a neuronok, illetve a vér-agy gátat alkotó endothel sejtek funkcióját. A hippokampális területen nem találtunk számottevő eltérést az asztrociták számában a törzsek közt, jóllehet a hipertenzív patkányokban méretbeli eltérés és kifejezett perivaszkuláris immunreaktivitás volt megfigyelhető. A 32 hetes L-2286 kezelés mindkét törzsből csökkentette a reaktív asztrogliaszámot, míg SHR patkányokban azok reaktív hipertrófiájára csekély hatást fejtett ki.

4.3. Célkitűzés III.: A PARP-1 gátlás mitokondriális protektív hatásának vizsgálata szívizomban.

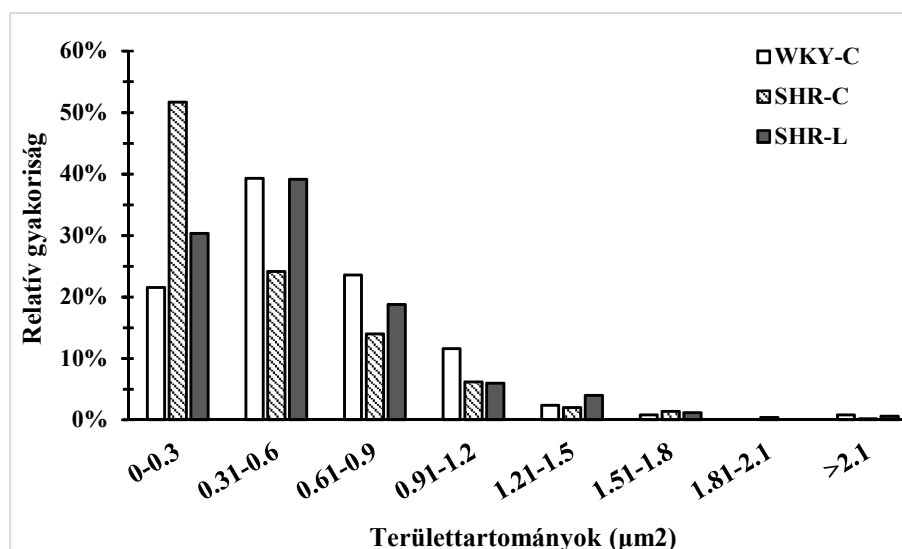
4.3.1. Ultrastrukturális megfigyelések a szívizom rostközi mitokondrium populációján

Hosszanti metszeteket vettünk 42 hetes SHR állatok bal kamrai szívizmából, hogy feltérképezzük a rostközi mitokondriumok aktuális állapotát L-2286 kezelés jelenlétében vagy anélkül. Az SHR-C csoportban egy morfológiailag heterogénebb populációt láthattunk, a mitokondriális mátrix elektrondenzitásának részleges csökkenésével jellemezve. Ezen csoportban a mitokondriumok jóval rendezetlenebb képet mutattak a WKY szívizomhoz képest, lazán elhelyezkedve a kontraktilis elemek közt. A mitokondriális belső membránszerkezetet megvizsgálva a normotenzív állatokban láthattuk, hogy a kriszta lemezek

sűrűn elhelyezkedve szabályos, tűrt formákat képeznek. Ezzel szemben hipertenzív patkányokban a belső membrán rétegek számában való csökkenés, továbbá a kriszta terek és kapcsolatok tágulata volt szembeutó. Az L-2286 kezelt SHR patkányok esetében egy köztes fenotípust találtunk regionális heterogenitással, mégis jobban megőrzött állapotban a belsőszerkezet valamint a kriszta szám tekintetében.

4.3.2. A mitokondriális dinamika aktuális állapotának számszerűsítése

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a fúziós és hasadási folyamatok aktuális egyensúlyába, elektronmikroszkópos felvételeken megmértük az egyes mitokondriumok területét és a hosszanti tengely méretét (~500 mitokondrium/csoport). Az SHR-C csoportban a mitokondriumok terület átlagának nagymérvű csökkenését találtuk a hosszanti tengelyek rövidülésével egyetemben a WKY állatokhoz viszonyítva, fragmentált fenotípust jelezve hipertenzív patkányok esetében a rostközti mitokondrium populációban. Az L-2286 kezelt SHR állatok ezen értékei szignifikáns mértékben eltértek a kontroll hipertenzív patkányokétól mind az átlagterület, mind a hosszanti tengely méretének tekintetében. Ezt követően megállapítottuk a mért mitokondriális területek relatív előfordulását önkényesen választott, $0.3 \mu\text{m}^2$ -es mérettartományokban (3. ábra). Az SHR-C állatok miokardiumában lényeges eltolódást tapasztaltunk az alacsonyabb méretek felé, ahol is a mért mitokondriális területek több mint fele esett a $0.3 \mu\text{m}^2$ alatti tartományba.



Ábra 3.: A rostközti mitokondriumok hipertenzióhoz köthető fragmentálódása az SHR miokardiumban. A mért mitokondriális területek relatív gyakorisága önkényesen választott, $0.3 \mu\text{m}^2$ -es területtartományokban.

4.3.3. Az L-2286 kezelés hatása a fúziós és hasadási folyamatok szabályzóinak szintjére, illetve szubcelluláris eloszlására.

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a kezelt SHR állatokban tapasztalt alacsonyabb mérvű hasadási folyamatok és a megőrzöttebb mitokondriális belső struktúra molekuláris hátterébe, meghatároztuk az OPA1, illetve a hasadás mediátor DRP1 szintjét teljes és frakcionált Western blot mintákban.

Megvizsgáltuk az L-2286 kezelés PAR-polimer képződésre kifejtett hatását teljes sejt lizátumban. A legmagasabb PARylációt a kontroll hipertenzív csoportban tapasztaltuk a WKY állatok alacsony jeléhez képest. Az L-2286 kezelés nagymértékben csökkentette a PARP-1 aktivitást az SHR-L állatokban. A DRP1 sejten belüli szintjének tekintetében nem találtunk számottevő eltérést a csoportok közt, azonban a frakcionált mintákat vizsgálva jelentősen nagyobb hányad volt található az SHR-C állatok esetében a mitokondriális frakcióban a Wistar állatokhoz képest, a külső membránon való rögzülés lehetséges jeleként. Hipertenzív patkányokban a hosszú idejű L-2286 kezelés eredményeként a DRP1 nagyobb arányban volt megtalálható a citoszolikus frakcióban. A belső membránok fúzióját és integritását szabályzó OPA1 celluláris szintje szignifikáns mértékben alacsonyabbnak bizonyult a hipertenzív állatok miokardiumában, mely csökkenésre az alkalmazott kezelés csak enyhe hatást gyakorolt, mely statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak.

5. Megbeszélés

A 42 hetes korban nyert eredmények nagyfokú eltérést mutattak a krónikus magasvérnyomásos patkányokban a normotenzív állatokhoz viszonyítva a karotisz artériák strukturális elváltozása, illetőleg a vizsgált szövetekben az oxidatív biomarkerek felhalmozódása tekintetében. Habár az alkalmazott L-2286 kezelés nem gyakorolt jelentős hatást az SHR állatok emelkedett vérnyomására, mint indukáló tényezőre, mérsékelte a karotisz artériákat érintő funkcionális és strukturális elváltozásokat, valamint a vizsgált szövetekben csökkentette az oxidatív károsodás mértékét. A fokozott ONOO⁻ képződés következtében megjelenő tirozin nitrációs termékeket immunhosztokémia révén vizsgáltuk a karotisz erek, valamint a dorzális hippokampusz szintjén. Ez utóbbi területen az SHR állatokban megfigyeléseink a lipid membránok fokozott peroxidációját támasztották alá 4-HNE

immunhisztokémia alapján, valamint a CA1 régió piramissejtjeiben a DNS fokozott oxidatív károsodását és PAR polimer formálódást. Az SHR állatok szívműködésében a rostközti mitokondriumok fokozott fragmentálódását, illetve magasabb PAR-polimer képződést mutattunk ki, mint a fokozott oxidatív stressz indirekt jele. Ezen eredmények is mutatják, az SHR törzsben a magasvérnyomáshoz köthető oxidatív stressz miként vezérelheti a hipertenzív célszervkárosodás patológiai folyamatait.

Az elégtelen antioxidáns védelem mellett fellépő celluláris oxidatív stressz a fokozott ROS képződés eredménye, mely különböző enzimszerekkel származhat, köztük a mitokondriális elektron transzfer láncból. Ez káros hatásokat közvetít, amennyiben a fokozott ONOO⁻ képződés révén csökkenti a potenciális NO biológiai elérhetőségét, mely az értónus elégtelen szabályzásához vezet. Ennek következményeként, a magasvérnyomásos patkányokból izolált karotisz erek alacsonyabb relaxációs készséget mutattak ACh jelenlétében, az endothel réteg diszfunkciójának jeleként. Habár SHR állatokban a hosszú idejű L-2286 kezelés nem gyakorolt szignifikáns mértékű hatást az SNP-re adott hiperreaktivitás tekintetében, az izolált karotisz artériák endothel függő relaxációs képessége megőrzött volt. Az érrendszer inflamációja hipertenzió során, melyet SHR állatok karotisz ereiben az NF- κ B fokozott magi aktivitása is jelzett, fokozhatja a fenti folyamatot, amennyiben a PARP-1 aktivitás az NF- κ B-vel interakcióban elősegíti a proinflammatorikus mediátorok expresszióját, így növelve a további ONOO⁻ képződést immunológiai folyamatok és iNOS aktivitás révén. E módon a hosszú távú farmakológiai moduláció hozzájárulhatott az oxidatív károsodás csökkentéséhez, illetve az endotheliális protekcióhoz, melyet az L-2286 kezelt hipertenzív állatok karotisz ereiben és a dorzális hippocampus területén figyelhattunk meg. A szakirodalomban egyre több adat mutatja, hogy a PARP-1 enzim gátlása különböző modellekben csillapítja az erek endothel diszfunkciójának mértékét, illetve akár képes visszafordítani is e folyamatot. Jóllehet, tanulmányunkban az SHR-L állatok esetében a megőrzött endothel függő relaxációs képesség nem nyilvánult meg a vérnyomásértékek csökkenésében. Az alkalmazott kezelés nem bírt szembetűnő hatással a hidrocefália meglétére SHR állatokban, az L-2286 adagolás endothel védő hatását jelezte a transzverzális erek megőrzött állapota a hippocampális fissurában, valamint az aktivált asztrocita populáció és a fehérállomány lacunáris károsodásának alacsonyabb perivaszkuláris jelenléte a kezelt hipertenzív állatokban. A fenti eredmények mutatják, hogy a hipertenzív állatmodellben a PARP-1 gátlás védő hatásának hátterében nem elsődlegesen a mechanikus tényezők befolyásolása áll az érfalfeszülés és a szív munka csökkentésére az emelkedett vérnyomással szemben, vagy akár a fokozott CSF termelés ellenében, mely a dorzális hippocampus

strukturális elváltozásához vezetett, hanem leginkább az egyre súlyosbodó celluláris stressz válasz és szöveti inflammáció csillapításán alapszik.

Megfigyeléseink a kezelt hipertenzív állatokban a karotisz artériák visszafogott érfalvastagodásával kapcsolatban tovább hangsúlyozzák a jelátvitelbe való beavatkozás jelentőségét. A MAPK jelátviteli kaszkád különböző tagjainak aktivációja olyan transzkripciós programokat indít, melyek a vaszkuláris simaizomsejtek osztódásához, migrációjához, hipertrófikus válaszához, valamint kollagén felhalmozódáshoz, sejthalál folyamatok beindulásához és a gyulladás fokozódásához vezet a stresszelt szövetekben. Alapesetben az MKP-1 alacsonyán expresszálódik a különböző szövetekben, jóllehet stressz során egy negatív visszacsatolási kör révén, a fokozott MAPK rendszer aktivációja a *DUSP1* gén emelkedett expressziójához vezet. Új keletű adatok rámutattak, hogy a celluláris oxidatív stresszválasz során a PARP-1 enzimaktivitása révén az MKP-1 expresszió negatív regulátora, amennyiben befolyásolja az aktiváló transzkripciós faktor 4/ATF4 DNS kötő képességét. Ennélfogva az L-2286 kezelt SHR patkányok karotisz ereiben megfigyelt facilitált MKP-1 expresszió valószínűsíthetően hozzájárult az ezen ereket érintő kisebb mérvű remodellációhoz a különböző MAPK rendszer tagok negatív szabályozása révén. A fenti adatok is tanúsítják, hogy az érrendszer hipertenzió indukálta fenotipikus elváltozásai jótékonyan befolyásolhatók az NF- κ B és MAPK rendszer aktiváció modulációján keresztül.

A patológiás PARP-1 aktiváció tekintetében a fokozott ROS termelés fő forrása és egyben célpontja is maga a mitokondrium. Krónikus magasvérnyomásban a vaszkuláris elváltozásokhoz köthető romlás a vérellátás szabályzásában idült ischémiához illetőleg metabolikus elégtelenséghez vezet az ellátott szövetekben, mely azonban további, mitokondriális forrásból származó ROS felszabadulást indít. A rostközti mitokondriumok fragmentálódása és a reaktív asztrogliózissal kísért atrófikus elváltozások a hippokampális kéregben, mint a metabolikusan zavart környezet indikátorai a kontroll SHR állatokban tovább alátámasztják e folyamatokat. A mitokondriális diszfunkció és szekunder ROS produkció már jól leírt folyamatok különböző kórképekben, melyek az oxidatív stresszhez köthető PARP-1 aktivációval jellemezhetők. Azon folyamatok döntő többsége melyek a sejtek sorsát meghatározzák, a mitokondriumokban futnak össze direkt vagy indirekt módon. Tanulmányunkban a kontroll hipertenzív állatok karotisz ereiben konfokális mikroszkópiával megfigyelt AIF nukleáris transzlokációja, valamint a fragmentált DNS-sel rendelkező piramissejtek nagyobb aránya ezen állatok esetében a dorzális hippokampuszban jelzi az oxidatív DNS károsodás vezérelte “éppen lezajló” sejthalál folyamatokat, melyeket a farmakológiai PARP-1 gátlás nagymértékben visszaszorított ezen szövetekben.

A krónikus hipertenzív patkánymodellben minőségi és mennyiségi megállapításokat kívántunk tenni ultrastruktúra szintjén a szív rostközti mitokondriumainak aktuális állapotáról. Az elektronmikroszkópos felvételeken csupán egy "pillanatképet" nyertünk ezen rendkívül dinamikus folyamatokról, melyek meghatározzák a mitokondriális hálózat struktúráját. Az egyedi mitokondriális területek számszerűsítése robusztus eltérést fedett fel az SHR állatok hipertrofizált szívmájában, mely magában foglalta a fragmentált fenotípus felé történő eltolódást, amelyet a hasadást mediáló DRP1 fokozott jelenléte kísért a mitokondriális frakcióban. A csökkent OPA1 szinttel kapcsolatos megfigyelésünk a hipertrofizált miokardiumban mitokondriális károsodásra utal, egybehangzóan más tanulmányokkal, melyek különböző szívizombetegségekben a fúziós és hasadási mediátorok megváltozott szintjeit fedték fel. Habár az L-2286 kezelés hatása az OPA1 szintjére az SHR-C állatokhoz képest magasabb trendet eredményezett, ez a hatás nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak, ekképpen más mechanizmusok is hozzájárulhattak a belső membránrendszer megőrzöttebb állapotához.

Összefoglalva, a krónikusan hipertenzív patkány modellben a hosszú idejű PARP-1 gátlás a szisztémás L-2286 adagolás révén az artériás vérnyomás változtatása nélkül, alapvetően moderálta a hipertenzív célszervkárosodást az oxidatív stressz csökkentése által, mely az SHR állatokban vizsgált szövetekben a patológiai elváltozásokat kíséri. Ez a hatás elsődlegesen a mitokondriális védelmen alapuló metabolikus stabilitás, csillapított celluláris stresszválasz valamint a jelátviteli interferencia révén. Ez a vizsgált szövetek jobban megtartott állapotához vezetett a celluláris komponensek védelmével egyetemben.

6. Összefoglalás

- A hosszú-idejű L-2286 adagolás SHR állatokban moderálta a hipertenzió indukálta karotisz artéria remodellációt a falvastagodás és fibrotikus felhalmozódás tekintetében, a vérnyomásértékek csökkentése nélkül.
- Az alkalmazott kezelés a hipertenzív patkányokban csökkentette a NT akkumulációt a karotisz artériákban és megőrizte azok endothel dependens relaxációs képességét a csillapított funkcionális remodelláció jeleként.
- SHR állatokban a PARP-1 enzim gátlása modulálta az NF- κ B és MAPK rendszer aktivációját, mely a vaszkuláris protektív hatás molekuláris alapját adhatta a karotisz artériák valamint a hippokampális formációt ellátó erek esetében.
- Az SHR állatok idegszövetében a biomolekulák fokozott oxidatív károsodását jelezte a NT, 4-HNE és 8-oxoG felhalmozódás, melyet a PARP-1 enzim gátlása moderált, valószínűsíthetően a mitokondriális eredetű szekunder ROS produkció csillapítása révén.
- SHR patkányokban a DNS károsodáshoz köthető PARP-1 aktiváció indukált sejthalál folyamatokat az alkalmazott kezelés az AIF gátolt nukleáris transzlokációja alapján visszaszorította, továbbá elősegítette a celluláris tartalom védelmét a dorzális hippokampuszban, melyet a CA1 régióban a TUNEL pozitív sejtek alacsonyabb előfordulása jelzett.
- Az aktivált asztrogliá populáció csökkent perivaszkuláris jelenléte alapján a vér-agy gát funkciója, illetve a cerebrális vérellátás javult az alkalmazott kezelés által.

- A rostközti mitokondriumok dinamikájának eltolódását a fragmentált fenotípus irányába, jótékonyan befolyásolta a hosszú idejű PARP-1 gátlás, a hasadási mediátor DRP-1 csökkent mitokondriális transzlokációjával kísérve.
- SHR állatok miokardiumában a rostközti mitokondriumok belső membránszerkezete megőrzöttebbnek bizonyult a kezelés hatására, jóllehet annak hatása az OPA1 celluláris szintjére nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak hipertenzív állatokban.

7. Publikációk

(Kumulatív impaktfaktor: 30.622)

7.1. Releváns publikációk:

Krisztian Eros, Klara Magyar, Laszlo Deres, Arpad Skazel, Adam Riba, Zoltan Vamos, Tamas Kalai, Ferenc Gallyas Jr, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Chronic PARP-1 Inhibition Reduces Carotid Vessel Remodeling and Oxidative Damage of the Dorsal Hippocampus in Spontaneously Hypertensive Rats.

PLOS ONE 12:(3) Paper e0174401. 18 p. (2017)

IF: 2.806

Klara Magyar, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Kitti Bruszt, Laszlo Seress, Janos Hamar, Kalman Hideg, Andras Balogh, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

A Quinazoline-derivative Compound with PARP Inhibitory Effect Suppresses Hypertension-induced Vascular Alterations in Spontaneously Hypertensive Rats.

Biochim Biophys Acta. 2014 Jul;1842(7):935-44

IF:4.882

7.2. Egyéb publikációk:

Agnes Kemeny, Katalin Cseko, Istvan Szitter, Zoltan Varga, Peter Bencsik, Krisztina Kiss, Robert Halmosi, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Aniko Perkecz, Laszlo Kereskai, Laszlo Terezia, Tamas Kiss, Peter Ferdinandy, Zsuzsanna Helyes:

Integrative characterization of chronic cigarette smoke-induced cardiopulmonary comorbidities in a mouse model

ENVIRON POLLUT. pii: S0269-7491(16)31444-0 (2017)

IF:5.099

Eniko Hocsak, Viktor Szabo, Nikoletta Kalman, Csenge Antus, Anna Cseh, Katalin Sumegi, **Krisztian Eros**, Zoltan Hegedus, Ferenc Gallyas Jr, Balazs Sumegi, Boglarka Racz: PARP Inhibition Protects Mitochondria and Reduces ROS Production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK Retrograde Pathway.

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 108:770-784 (2017)

IF: 5.606

Adam Riba, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Aliz Szabo, Klara Magyar, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi, Eszter Szabados:

Doxycycline Protects Against ROS-induced Mitochondrial Fragmentation and ISO-Induced Heart Failure

PLOS ONE 12:(4) Paper e0175195. 16 p. (2017)

IF: 2.806

Robert Halmosi, Laszlo Deres, Roland Gal, **Krisztian Eros**, Balazs Sumegi, Kalman Toth:

PARP Inhibition and Postinfarction Myocardial Remodeling.

INTERNATIONAL J. OF CARDIOLOGY 217:(Suppl.) pp. S52-S59. (2016)

IF: 6.189

Laszlo Deres, Eva Bartha, Anita Palfi, **Krisztian Eros**, Adam Riba, Janos Lantos, Tamas Kalai, Kalman Hideg, Balazs Sumegi, Ferenc Gallyas Jr., Kalman Toth, Robert Halmosi:

PARP-inhibitor Treatment Prevents Hypertension Induced Cardiac Remodelling by Favourable Modulation of Heat Shock Proteins, Akt-1/GSK-3 β and Several PKC Isoforms.

PLoS One. 2014 Jul 11;9(7):e102148 (PMID: 25014216)

IF:3.234

7.3. Absztraktok:

Laszlo Deres, Klara Magyar, Imre Takacs, **Krisztian Eros**, Andras Balogh, Kalman Hideg, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Pharmacological PARP-inhibition Decreases Vascular Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rat Model; *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2012. Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2012; 42:A21*

Laszlo Deres, Zoltan Vamos, **Krisztian Eros**, Robert Matics, Peter Cseplo, Robert Halmosi, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Akos Koller:

Subcellular Aspects of AT1-receptor Mediated Vasomotor Responses in Relation to Age; *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013 Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:B16*

Krisztian Eros, Laszlo Deres, Klara Magyar, Adam Riba, Kalman Hideg, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Effect of PARP-1 Inhibition on the Mitochondrial Fragmentation in an *in vivo* SHR Model. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013. Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:B16*

Zoltan Vamos, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Robert Matics, Ivan Ivic, Andrea Bertalan, Elemer Sipos, Akos Koller, Peter Cseplo:

Age Related Changes of AT1 Receptor Mediated Vasomotor Responses in Isolated Rat Carotid Arteries. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2013. Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:B32*

Krisztian Eros, Laszlo Deres, Klara Magyar, Adam Riba, Kalman Hideg, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Effect of PARP-1 Inhibition on the Mitochondrial Fragmentation in an in vivos SHR Model. *VII. International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G12*

Robert Halmosi, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Klara Magyar, Eva Bartha, Andrea Takacs, Tamas Kalai, Laszlo Seress, Ferenc Gallyas, Balazs Sumegi, Kalman Toth: The Protective Effect of PARP-inhibitors Against Hypertension Induced Myocardial and Vascular Remodeling. *VII. International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G15*

Klara Magyar, Andrea Takacs, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Laszlo Seress, Zoltan Vamos, Kalman Hideg, Tamas Kalai, Andras Balogh, Akos Koller, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Pharmacological Inhibition of PARP-1 Enzyme Prevents Hypertensive Vascular Remodeling. *VII. International Symposium on Myocardial Cytoprotection 2013 Pecs, Hungary. Cardiologia Hungarica 2013; 43:G20*

Krisztian Eros, Eva Bartha, Laszlo Deres, Adam Riba, Tamas Kalai, Kalman Hideg, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Effects of Poly(ADP-ribose)polymerase-1 Inhibition on Myocardial Remodeling in a Chronic Hypertensive Rat Model. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2014. Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2014; 44:E51*

Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Noemi Bencze, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Sandor Farkas, Kalman Toth, Robert Halmosi:

The Effects of a Bradykinin B1 Receptor Antagonist on the Development of Hypertensive Organ Damages in SHR Model. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2014. Balatonfüred, Hungary. Cardiologia Hungarica 2014; 44:E25*

Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Noemi Bencze, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Sandor Farkas, Kalman Toth, Robert Halmosi:

The Effects of a Bradykinin B1 Receptor Antagonist on the Development of Hypertensive Organ Damages in SHR Model. *Congress of the European Society of Cardiology 2014. Barcelona, Spain. European Heart Journal (2014) 35 (Abstract Supplement), 664-665.*

Istvan Szitter, Robert Halmosi, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Krisztina Kiss, Peter Bencsik, Zoltan V. Varga, Peter Ferdinandy, Zsuzsanna Helyes:

Predictive Mouse Model of Chronic Cigarette Smoke-Induced Pulmonary and Cardiac Pathophysiological Alterations. *Joint Meeting of the Federation of European Physiological*

Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society 2014. Budapest, Hungary. Acta Physiol (Oxf) 2014 Aug;211 Suppl 697:1-184, Page 106: P5.10.

Peter Jakus, Nikoletta Kalman, Fruzsina Fonai, Zoltan Hegedus, **Krisztian Eros**, Peter Dombovari, Balazs Sumegi, Balazs Veres:

Cyclophilin D-Dependent mPT Amplifies Inflammatory Response in Septic Shock. *5th World Congress on Targeting Mitochondria, 2014. Berlin, Germany. World Mitochondria Society Abstracts Book, Page 177.*

Adam Riba, Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi, Eszter Szabados:

Protective Effect of Doxycycline Against the Development of Isoproterenol Induced Heart Failure. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2015. Balatonfüred, Hungary. CARDIOLOGIA*

HUNGARICA 45:(Suppl. D) p. D38. (2015)

Laszlo Deres, **Krisztian Eros**, Istvan Szitter, Peter Bencsik, Zoltan Varga, Peter Ferdinandy, Kalman Toth, Zsuzsanna Helyes, Robert Halmosi:

The Effects of Chronic Cigarette Smoke Inhalation on Cardiac and Pulmonary Function in Mice. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2015. Balatonfüred, Hungary. CARDIOLOGIA HUNGARICA 45:(Suppl. D) p. D46. (2015)*

Krisztian Eros, Arpad Skazel, Klara Magyar, Laszlo Deres, Kalman Hideg, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Systemic PARP-1 Inhibition Attenuates Carotid Vessel Remodelling and Have Protective Effects on Dorsal Hippocampus in Spontaneously Hypertensive Rats. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2016. Balatonfüred, Hungary. CARDIOLOGIA HUNGARICA 46:(Suppl. F) Paper F59.*

Adam Riba, Laszlo Deres, Arpad Skazel, **Krisztian Eros**, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Eszter Szabados, Robert Halmosi:

Effects of Resveratrol on Postinfarct Heart Failure in vivo. *Congress of Hungarian Society of Cardiology 2016. Balatonfüred, Hungary. CARDIOLOGIA HUNGARICA 46:(Suppl. F) Paper F43.*

Kalman Toth, Laszlo Deres, Klara Magyar, **Krisztian Eros**, Balazs Sumegi, Robert Halmosi: Myocardial and Vascular Protection by PARP Inhibitors. *3rd European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences,*

October 1-4, 2016, Marseille, France.

CURRENT RESEARCH: CARDIOLOGY - EXPERIMENTAL CLINICAL 3: p. 90. (2016)

Krisztian Eros, Arpad Skazel, Klara Magyar, Laszlo Deres, Tamas Kalai, Laszlo Seress, Balazs Sumegi, Kalman Toth, Robert Halmosi:

Systemic PARP-1 Inhibition Attenuates Carotid Vessel Remodelling and Have Protective Effects on Dorsal Hippocampus in Spontaneously Hypertensive Rats. *3rd European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences, October 1-4, 2016, Marseille, France.*

CURRENT RESEARCH: CARDIOLOGY - EXPERIMENTAL CLINICAL 3: p. 108. (2016)

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálám kifejezni programvezetőmnek, Tóth Kálmán professzornak és projektvezetőmnek, Dr. Halmosi Róbertnek, hogy egyengették tanulmányaimat a kardiovaszkuláris tudományok terén, valamint, hogy megteremtették e munka létrejöttének lehetőségét. Őszinte megbecsülésem nyilvánítom ki Professzor Sümegi Balázs részére, aki mentorálta tanulmányaim és munkámat az utóbbi években, továbbá szélesítette látóköröm a rendszerbiológia területén.

Köszönettel tartozom valamennyi korábbi, illetve jelenlegi munkatársamnak – kiváltképpen Dr. Magyar Klárának és Dr. Deres Lászlónak-, a jelen kutatásban nyújtott segítségükért és közreműködésükért. Hálás vagyok Seress László professzor úrnak a hippocampális megfigyelések terén nyújtott szakmai támogatásért. Továbbá, megemlíteném Dózsa Tímeát és Nyirádi Józsefet, akik szakmai tudásukkal nagymértékben elősegítették e kutatás lefolytatását.

Szeretném hálám kifejezni Dr. Bock-Marquette Ildikó és Mr. Jon E. Marquette részére a bátorító szavakért és mentalitásért ezen időkben.

Legmélyebb hálám illeti családom és közeli barátaim a kimeríthetetlen türelemért és támogatásért e munka elkészülte során.