A poli (ADP-ribóz) polimeráz 1 szerepe a krónikus kardiovaszkuláris betegségek patogenezisében

Doktori tézisek

Benkő Rita

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Szabó Csaba

Hivatalos bírálók: Dr. Radák Zsolt
Dr. Antus Balázs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti László
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ivanics Tamás
Dr. Dézsi László

Budapest
2008.

BEVEZETÉS

A PARP 1 legfőbb funkciója a DNS-sérülések érzékelése és a nukleinsav töréseinek helyén a környező fehérjéknek, hisztonoknak és magának a PARP automodifikációs doménjeinek PAR-ációja. A hosszú, elágazó ADP-ribóz polimerek nagy negatív töltést visznek a sérült DNS-szakasz környezetére, ezzel megváltoztatják annak szerkezetét, hozzáférhetővé téve a törött szakaszokat a javító enzimek számára, illetve elősegítik a kromatinszerkezet átalakítását és a transzkripció regulációját is. Nagyszámú transzkripciós faktorról, DNS replikációban részt vevő fehérjéről és szignálmolekuláról bizonyosodott be, hogy a PARP 1 PAR-álja ezeket. A PARP 1 szabályozó működése ezeken a fehérjéken nemkovalens protein-protein interakciók szintjén vagy kovalens PAR-ációval valósul meg. Maga a PAR-ció egy igen gyors dinamikájú folyamat, a polimer féléletideje rövid (<1 perc), két enzim végzi a bontását (PARG és ADP-ribozil protein liáz).

A legutóbbi időkig úgy tartották, hogy a PARP szabályozása elsősorban a DNS-törések szintjén történik, azok lennének az elsődleges aktivátorai a PAR-ációnak A sejtmagban található poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) a DNS egyszálú töréseit ismeri fel, és erre aktiválódik. Ilyen típusú sérülések oxidatív és nitrozatív stresszben jelennek meg. A szuperoxid és a nitrogén-monoxid, két reaktív szabadgyök, könnyen reakcióba lépnek egymással, és peroxinitritet ($ONOO^-$) képeznek, ami szintén erős oxidáns. A peroxinitrit különböző biomolekulákat támad, és azokat oxidálja és nitrálja.

Az aktivált PARP NAD^+-t hasít nikotinamid (NA) és ADP-ribóz (ADPr) egységekre. A NA szabadon távozik, az ADPr elemeket pedig hozzákapcsolja a fehérjéhez, majd innen kiindulva hosszú, akár 200-400 monomerből álló, gyakran elágazó láncokat fűz adapter fehérjéihez Maga az aktív PARP dimer, és a dimer tagjai egymásra is hasonló PAR-láncokat kapcsolnak, az automodifikációs doménen. Az autoPAR-ció gátolja az enzimet.

A PARP fontos szerepet tölt be a genom integritásának megőrzésében, és a DNS-javításnak is segítségére van. Nemcsak a stressz indukálja a PAR-ciót, alapállapotban a PARP-család több szabályozási folyamatban is részt vesz, egyes géntermékek átírására nagy hatással van, és jelenléte a magzat fejlődéséhez esszenciális

Mivel aktív állapotában a PARP sok NAD^+-t bont el, működése a mitokondriális légzési lánctól elvonja a NAD^+-t, ezzel energetikailag hátrányos helyzetbe hozva a sejtet. Ha ezt megnövekedett oxidatív és nitrozatív stressz állapotában teszi, a sejtek károsodása irreverzibilissé válik. Az apoptózis energiaigényesebb folyamat, mint a nekrózis, ATP-depléció esetén ezért az utóbbi felé tolódik el a sejthalál mechanizmusa. A nekrotikus folyamatok gyulladáshoz vezetnek, tovább fokozva a szabadgyökök károsító hatását.

A PARP gátlása ischémia-reperfúzió állatmodellben szignifikánsan csökkenti a nekrotikus területet. A szabadgyökök okozta akut sérülés eseteiben is a PARP gátlása gyorsította a funkcionális javulást. Ezek a felismerések vezettek egy újabb, ultrapotens PARP-gátló farmakoncsoport kifejlesztéséhez. Ezen gyógyszerkészítmények közül néhány, mint például az általunk is használt izoindolinon szerkezetű INO-1001 jelenleg klinikai kipróbálás alatt áll olyan betegek terápiájában, akik szívrohamon vagy kardiopulmonális bypass műtéten esnek át.

Vizsgálataim során a poli (ADP-ribozil)áció mértékét követtem krónikus oxidatív, illetve nitrózatív stresszel járó kardiovaszkuláris kórállapotokban, illetve a fiziológiás öregedés folyamán. Az eddigi megfigyelések arra mutatnak, hogy a korral megnő a szervezet érzékenysége az oxidatív stresszel szemben. A korosodást általában különböző hibák felhalmozódásával magyarázzák, amelyek jelentős részét visszavezethetjük a sejteket ért szabadgyök eredetű sérülésekre. Részben ez az oka az idős korban kialakuló, a metabolikus X szindrómára is jellemző krónikus szív- és érrendszeri elváltozásoknak. Idős korban csökken a glukóztolerancia, mivel az inzulinrezisztencia növekszik, és ha az emelkedett glukózszint idős embereknél hosszasan fennmarad, vagy túlnő egy adott értéken, akkor az inzulinszekréció a fiatalokhoz képest elmarad, illetve a glukózclearance öregkorban csökkenhet.

Mivel a cukorbetegségre jellemző az oxidatív és nitrózatív stressz, amelyek már inzulinrezisztens illetve glukóz-intoleráns állapotokban megjelennek. A hiperglikémia káros hatásai a mitokondriális elektrontranszport-lánc fokozott szuperoxid-termelésére vezethetőek vissza. A hiperglikémia következményeképpen a cukorbetegekben jellegzetes mikrovaszkuláris elváltozások jelennek meg, pl. a retinában, a veseglomerulusokban és a perifériás idegekben. A cukorbetegség gyorsan progrediáló érelmeszesedéshez is vezet azokban a nagyobb artériákban, amelyek érintik a szív, az agy és az alsó végtagok vérellátását.

IAz érelmeszesedés az egész szervezetet érintő folyamat, amely magába foglalja az immunrendszer aktivációját, és gyulladásos reakciókhoz vezet. Az ateroszklerózis gyakori probléma a korosodó népességben, és a diabéteszes betegek közül is sokakat érint. Az érelmeszesedéses betegekben az intravaszkuláris szabadgyökök mennyisége emelkedett, ami tovább rontja a magas vércukorszint kiváltotta angiopátiát. Nemrégiben ismerték fel azt a tényt, hogy a kettes típusú diabétesz, hiperinzulinémia, diszlipidémia, ateroszklerózis, elhízás, öregedés, és egyéb, az életmódból fakadó tényezők (dohányzás, mozgásszegény életmód) valójában egy homogén metabolikus szindróma.

Az ateroszklerózis az artériák intimájának jellegzetes elváltozása, amelynek során a lipidek érfalba történő lerakódása, kötőszöveti elemek és véralkotó részek felhalmozódása következik be. A plakképződés érszűkületet von maga után, ennek következtében a mögöttes érszakasz vérellátása zavart szenved, az ischémiás területek megjelenése pedig számos súlyos, akár végzetes problémát szülhet. Az érelmeszesedés kialakulását leíró egyik elmélet a „válasz a sérülésre“ mechanizmuson alapszik. E szerint az érfalat ért traumák (tipikus modellje az angioplasztika, de sérülést okoz a vérnyomás emelkedése, a dohányfüst szén-monoxid tartalma, a koleszterin vagy a szabadgyökök megjelenése nagyobb mennyiségben – olyannyira, hogy beszélhetünk ma már önálló szabadgyök-elméletről) indítják be azokat a folyamatokat, amelyek miatt végeredményben az LDL nagyobb affinitást mutat a lerakódásra az érfalban.

Doktori munkám során azon vizsgálatokba kapcsolódtam be, amelyek az öregedés, diabéteszes komplikációk, ateroszklerózis,, magas vérnyomás és a PARP-1 aktiváció közötti összefüggések felderítésén dolgoztak.

CÉLKITŰZÉS

- A korosodással együtt járó kardiovaszkuláris funkcióromlás enyhíthető-e a PARP gátlásával?

- Kisrágcsáló modelleken hogyan követhető nyomon az emelkedett vércukorszint kiváltotta kardiovaszkuláris funkcióromlás?

- Az atheroszklerotikus szív és érrendszeri zavarok kialakulásában a szabadgyökök és a poli(ADP-riboziláció) mekkora szerepet játszik?

- A nitrózatív stressz csökkentésével befolyásolható-e a neointima képződés illetve a sértett érszakasz funkcionális állapota resztenózis modellben?

- A renin-angiotenzin rendszer túlműködése okozta hipertónia kiváltja-e a PARP aktivációt?

MÓDSZEREK

A vizsgálatokat a “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” U.S. National Institutes of Health 1996-os kiadásának megfelelően (NIH Publication 85-23 javított változat, 1996), a Helyi Állatvédelmi Bizottság engedélyével végeztük..

Millar rendszer: az intrakardiális nyomás- és térfogatváltozás regisztrációja in vivo

Kísérleteinkhez felhasználtuk a bal kamrai nyomás követését *in vivo* altatott patkányban. (Anesztéziát 60mg/ttkg pentobarbitál oldat intraperitoneális adagolásával értünk el.) A méréshez az ún. Millar rendszert használtuk, amelynek lényege egy mikrokatéter, végében piezoelektromos kristállyal. Ezt a jobb oldali a. carotis communison keresztül vezettük be a bal kamrába, ahol a nyomásváltozások a kristályt deformálták, és az az alakváltozással arányos elektromos jelet adott. Az így generált jelet a Millar rendszer saját jelátalakító-erősítő rendszerére vezette a katéter, amit végül Macintosh számítógépre vittünk és értékeltünk ki. Az így nyert adatokat további feldolgozásra Excel táblázatba vittük át. Kalibráció a Millar átalakító belső 100 Hgmm-es jelével történt.

A Millar katéter újabb, továbbfejlesztett változata már nem csak a nyomásváltozások regisztrálására alkalmas, hanem a vezetőképességet is méri, ennek változása a környezetében található elektrolit-oldat mennyiségének és összetételének függvénye. A bal kamra telődésekor a konduktancia megnő, ürülésekor csökken. A nyomás és a vezetőképesség együttes mérésével felrajzolható a nyomás-térfogat függvény minden egyes szívciklusban. Kalibráláshoz 1,5%-os NaCl-oldatot használtunk.

A nyomás-térfogat függvény önmagában is informatív, de a bal kamrai telődés csökkentésével további adatok nyerhetők a szív állapotáról. A v. cava caudalis gradiális occlusiojával, majd felengedésével elérhető a venás visszaáramlás változtatása. Az occlusiot legegyszerűbben a hátulsó üresvénára helyezett majd lassan leszorított fültisztító pálcával érhetjük el egérben. (Altatás ketamin-xylazin keverék i.p. adásával.)

A mellkasi aorta kontraktilitásának és relaxációs készségének vizsgálata

Anesztézia alatt a hasüreg hátsó felében felkerestem a hasi aortát, átvágtam, és kivéreztettem az állatot. A mellkast megnyitottam, a szívet és a tüdőt előre, a fej felé húztam, majd a nyelőcső átvágása után kiemeltem a mellkasból. A thoracalis aortát a rekesz fölött átvágtam, az azt befogadó kötőszövetet mikrocsipesszel megfogtam és felfelé emelve kivágtam az aortaívig, úgy, hogy magát az aortát nem érintettem semmilyen fémeszközzel. A kiemelt főütőeret szervkádba, 37°C-ra előmelegített 5% CO_2 és 95%O_2 keverékével (carbogen) buborékoltatott Krebs oldatba helyeztem, aminek az összetétele NaCl 130mM, $NaHCO_3$ 14.9mM, KCl 4.7mM, $CaCl_2$ 1.6mM, $MgSO_4$ 1.17mM, KH2PO4 1.18mM, EDTA 0.026mM, Glucose 11mM volt. (A sókat a Sigma vállalattól vásároltuk.) Itt megtisztítottam a kötőszövettől és a véralvadéktól, majd 3 mm-es gyűrűket vágtam belőle és ezeket izometriás erőmérőre helyeztem (Kent Scientific), szintén carbogennel buborékoltatott 37°C-os Krebs oldatban.

Az erőmérőn az ereket előfeszítettem, a patkányból származó mintákat 1,5 g.nak megfelelő erővel, az egér aortagyűrűket pedig 1 g-nak megfelelő erővel. Egy órás ekvilibráció után (amely idő alatt 15 percenként cseréltem a szervkádakban a Krebs oldatot, és folyamatosan utánaállítottam az előfeszítést,) epinephrinnel kimértem az érgyűrűk kontraktilitását. (10^{-10} mol/l-től $3*10^{-6}$ mol/l-es koncentrációtartományban.) Ezután a gyűrűk környezetéből kimostam az epinephrint kétszeri oldatcserével, majd újabb egy óra ekvilibráció következett. Ha az aortagyűrűk a kezdeti előfeszítésnél jobban relaxáltak, akkor a feszítést utánaállítottam. Ezután az érgyűrűket összehúztam, az egerekből származókat 10^{-7} mol/l-es, a patkányokból származókat $3*10^{-7}$ mol/l-es koncentrációjú epinephrinnel. Amikor a kontrakció maximális volt, a relaxációt acetil-cholin adagolásával határoztam meg (10^{-9} mol/l – $3*10^{-4}$ mol/l koncentrációtartományban).

A kontraktilitást abszolút értékben, grammokban megadva számoltam, az általam beállított alapvonalhoz képest; a relaxációt %-ban fejeztem ki, az (adott acetil-cholin koncentrációnál mért kontrakció/epinephrines prekontrakció az alapvonal fölött)*100 képlettel.

Kísérleti állatmodellek

Fiatal felnőtt (3 hónapos) és öreg (24 hónapos) hím Fisher patkányokat használtunk a korosodás modellezésére. Mindkét korosztályból az állatok felét izoindolinon szerkezetű PARP-gátlóval, INO-1001-gyel kezeltük, napi 30 mg/kg-t kaptak orálisan, míg a többi patkány vehikulumot kapott. A patkányokat kettesével vagy hármasával tartottuk, standard laboratóriumi táppal etettük és itattuk ad libitum, 12 órás sötét/világos ciklust állítottunk be.

Hím db/db egereket 5 hetes koruktól INO-1001 kezelésnek vetettünk alá. Aszpartámmal (NutraSweet) édesített steril vízben 4,8 g/l INO-1001-t oldottunk fel, és ezt adtuk ivóvízként. Vehikulum kontrollunk a NutraSweet-tel ízesített steril ivóvíz volt. Negatív kontrollként db/m heterozigóta egereket használtunk, amelyeket ugyanezen oldatokkal itattunk. Átlagosan az állatok 60 mg/kg PARP-gátlót fogyasztottak. Az egereket 17-21 hetes koruk között áldoztuk fel. A mellkasi aortát kimetszettem, és vizsgáltam az érgyűrűk funkcionális állapotát.

10 hetes apolipoprotein E deficiens egereket és azonos korú kontrollokat (C57Bl6 törzs) aterogenetikus diétán tartottunk, és 12 héten keresztül kezeltük őket 30mg/kg/nap INO-1001-gyel, amit az ivóvízben oldottunk fel. Az érfunkciós vizsgálatok során *in vitro* az érgyűrűk felét 3μM INO-1001-t tartalmazó szervfürdőben inkubáltuk.

Pentobarbitál anesztéziában 400-500 g közötti hím Sprague-Dawley patkányok jobb oldali közös fejartériáját felkerestük, annak külső és belső fejverőérre szétágazásánál. A külső fejverőér oldalról permanens ligatúrát helyeztünk fel (7-0 selyemvarratot használtunk ehhez), a belső fejverőeret csak a műtét idejére zártuk le. A külső fejverőéren 2F Fogarty katétert (Baxter) vezettünk be, a mellkas bejáratáig. A katéter ballonját fiziológiás sóoldattal töltöttük fel annyira, hogy mozgatásakor ellenállást érezzünk, majd a katétert hat alkalommal kihúztuk a külső fejverőér felé, és visszatoltuk a mellkas bejáratáig. Ezt követően a külső fejverőeret újra ligáltuk, hogy az arteriotómia mindkét oldalról ki legyen zárva a keringésből, és a belső fejverőeret megnyitottuk a

véráramlásnak. A nyak középvonalában ejtett sebet ezután zártuk, a bőrt 4-0 selyemfonállal varrtuk össze.
Az állatokat két csoportra osztottuk: egy részük a műtét után, illetve az azt követő 14 napon kétszer 1 mg/kg WW85 kezelést kapott s.c. A másik csoport ugyanezen időpontokban azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatott kapott s.c. (Ez a csoport szolgált pozitív kontrollként.) Negatív kontrollnak áloperált patkányokat használtunk.
A műtétet követő 28.-31. napon a patkányokat túlaltattuk, majd izoláltuk a sértett artériát, és a mellkasi aortával azonos módon vizsgáltuk azok funkcionális állapotát.

8 hetes hím spontán hipertenzív patkányokat (SHR) 8 héten keresztül 20 mg/kg/nap enalapril-maleáttal kezeltünk, amit az ivóvízben oldottunk fel. Pozitív kontrollként vehikulummal kezelt SHR állatokat használtunk, negatív kontrolljaink pedig azonos korú Wistar-Kyoto (WKY) patkányok voltak. A kezelés végén mértük a szív hemodinamikai teljesítményét (Anne Vaslin végezte a mérést), érfunkciós vizsgálatokat végeztünk *in vitro*, majd a szívből, veséből és a mellkasi aortából mintát vettünk immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Korábbi kísérleteimben meggyőződtem arról, hogy a PARP-gátlók és az angiotenzin-rendszer között nincs közvetlen kapcsolat, sem *in vivo*, sem *in vitro* (nem közölt adat.).

EREDMÉNYEK

Öreg Fisher patkányoknál a szív átépülése a korosodással együtt járt, a bal pitvar és kamra szignifikáns tömegnövekedése, de a jobb szívfél tömege nem változott. A tüdő tömege is jelentősen megnőtt. Az INO-1001 kezelés a bal szívfél és a tüdő tömegének változását nem befolyásolta Szívfunkció: az öregedés az artériás középnyomás, bal kamrai végdiasztolés nyomás, a szisztolés nyomásnövekedés maximális meredeksége, a diasztolés nyomásesés legnagyobb meredeksége, ejekciós frakció, verőtérfogat, térfogati munka index, és pulzusszám csökkenésével volt jellemezhető. Ezzel ellentétben a bal kamrai végdiasztolés nyomás és a bal kamrai nyomásesés időkonstansa a diasztolés diszfunkció indikátoraként emelkedett az öreg állatokban. A teljes perifériás ellenállás index szintén növekedett az idős patkányokban.

Az INO-1001 kezelés hatására szignifikánsan növekedett a verőtérfogat, szívindex és a térfogati munka indexe, és csökkent a bal kamrai végdiasztolés nyomás, és a bal kamrai nyomásesés időkonstansa is. A teljes perifériás ellenállás is csökkent, és a bal kamrai szisztolés nyomás és a középartériás nyomás is kis mértékben emelkedett a PARP-gátló hatására öreg állatokban. Ezzel együtt a dP/dt_{max} illetve a $–dP/dt_{max}$ is javulási tendenciát mutatot, Ezzel szemben fiatal felnőtt patkányoknál az INO-1001 kezelés nem volt hatással egyik hemodinamikai paraméterre sem. Megfigyelhető az öreg állatokban a szisztolés nyomás maximumának és a meredekségének csökkenése, ami jelzi a szívizom kontraktilitásának csökkenését és a szívelégtelenséget. Az INO-1001 kezelés hatására a kontraktilitást kis mértékben növekedett.

Több, korábbi vizsgálathoz hasonlóan, a mi ex vivo méréseink is alátámasztották azt a megállapítást, hogy az életkor előrehaladtával patkányokban az endotélfunkció károsodik, amely jellemezhető a mellkasi aortából kimetszett gyűrűk acetilkolinra adott maximális relaxációs válaszának csökkenésével, és a dózis-hatás görbe jobbra tolódásával a fiatal kontrollokhoz képest. A PARP farmakológiai gátlása INO-1001-gyel szignifikánsan javította az acetilkolinra adott választ az öreg állatokban, ugyanakkor nem volt hatással az egészséges, fiatal felnőtt patkányok endotélfunkciójára.

A diabéteszes rágcsáló modellből származó eredményeink arra mutatnak, hogy a korábbi megfigyeléseknek megfelelően a diabéteszes relaxációs zavar a db/db

egerekben kialakult. A db/m állatoknál a relaxációs készség szignifikánsan jobb volt, mint a cukorbeteg állatokban. PARP-gátló kezelés hatására a db/m állatokból izolált mellkasi aorta relaxációs készsége nem változott, de a db/db egerekben szignifikáns javulást találtunk.

Apolipoprotein E deficiens egerek esetén a 3 hónapos INO-1001 kezelés szignifikánsan javította az endotéliumfüggő relaxációs képességet. Az izolált aortagyűrűk PARP inhibítoros kezelése *in vitro* 1 órán át a szervfürdőben részben visszaállította az endotélfunkciót. A PARP farmakológiai gátlása nem befolyásolta az egészséges kontroll állatokban mérhető relaxációt.

A ballonkatéteres sértés súlyos vaszkuláris sérülést okozott, amelyet a nagymértékű neointima formációval karakterizálhattunk. A $ONOO^-$-lebontást katalizáló WW85 a neointima formációt csökkentette. A morfometrikus analízist számítógépre kapcsolt mikroszkópos planimetria eljárással végeztük, így határoztuk meg az intima/média arányt. Az intima/média arány a WW85 kezelés hatására mintegy 40%-kal csökkent a kezeletlen kontrollokhoz képest.

Az izolált érgyűrűkön végzett méréseink is azt igazolták, hogy a sértést követően az erek relaxációs készsége jelentősen romlott az endotélium-dependens vazodilatátor acetilkolinnal szemben. A peroxinitrit farmakológiai semlegesítése WW85-tel szignifikánsan javította az érgyűrűk funkcionális állapotát.

A hipetrenzió vizsgálatában a három csoport (negatív kontroll Wistar Kyoto, SHR és enalapril-kezelt SHR patkányok) testtömegében nem volt szignifikáns különbség. Az SHR patkányok artériás vérnyomása közel kétszerese volt a negatív kontrollokénak. Az enalapril-kezelés a vérnyomást szignifikánsan csökkentette. A bal kamrai szisztolés nyomás szintén erősen emelkedett a spontán hipertenzív állatoknál, amelyet az ACE-gátló alkalmazása normalizált. Ezzel együtt a $+dP/dt_{max}$ érték is emelkedett a magas vérnyomású csoportban, és enalapril kezelésre visszatért a kontroll értékre.

A mellkasi aorta endotélfüggő relaxációs készségét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a hipertóniás csoportban szignifikánsan rosszabb volt az acetilkolin érzékenység, mind a kontrollokhoz, mind pedig az ACE-gátlóval kezelt csoprthoz mérten. Utóbbiak endotélfüggő relaxációs készsége nem különbözött a kontroll Wistar-Kyoto patkányokétól. Korábbi tanulmányok arra mutatnak, hogy a PARP farmakológiai

gátlása szintén normalizálja a magas vérnyomás következtében kialakuló endotéldiszfunkciót (Pacher et al., 2002e) .

A poli (ADP-ribóz) szintézisre utaló bizonyítékokat immunhisztokémiai módszerekkel kerestük a szívizomban, a mellkasi aorta rétegeiben és a veseglomerulusokban. Az immunhisztokémiai módszerrel jelölt PAR mennyiségét csökkenti az általunk használt enalapril-kezelés.

A kontroll metszetekben nem volt detektálható mennyiségű PAR. A PAR felhalmozódás az SHR állatok szöveteiben sötét intranukleáris jelölésként látszott a szív izomsejtjeiben, az érbelhártya sejtjeiben és az ér simaizom-rétegeiben és a vese tubulusaiban, illetve a glomerulusokban. Enalapril-kezelés hatására a PARP aktiváció észrevehetően csökkent ezekben a szövetekben.

KÖVETKEZTETÉSEK

Adatainkból levonhatjuk azt a következtetést, hogy a PARP farmakológiai gátlása szignifikánsan javítja a szív szisztolés és diasztolés működését az általunk használt időskori szívelégtelenség modellben. Ez a megfigyelés összhangban van az öregedés szabadgyök-elméletével. E mellett a PARP gátlása jelentősen javította az endothelium funkcionális állapotát is. Elképzelhető, hogy az endoteliális PAR-áció és az öregkori kardiomiopátia között ok-okozati kapcsolat áll fenn, mivel az érbelhártya sérülése a szívizomszövet kiterjedt vagy lokális vérellátási zavarához vezethet, ami rontja a szív teljesítményét.

In vitro és in vivo mérések alapján munkacsoportunk bemutatta kettes típusú cukorbetegség modellben (Leprdb/db egerek), hogy a PARP aktivációja lényeges szerepet játszik a diabéteszes endotéldiszfunkció kialakulásában, és részben ennek következtében, a glomerulopátia megjelenésében is. Ismeretes, hogy a diabéteszes szövetekben (szívizom, aorta, vese) emelkedett mennyiségben van jelen a PAR. Az orálisan adagolható PARP-gátló farmakon hatására az endothelium funkcionális állapota javult, ezzel együtt a glomeruláris expanzió és albuminuria is csökkent.

Azt is bemutattuk, hogy az Apolipoprotein B hiányában a koleszterin metabolizmusa zavart szenved, és ennek következtében emelkedik a szabadgyök-termelés és a PARP aktivitása is. Ennek a folyamatnak nagy jelentősége lehet az ateroszklerotikus elváltozások kialakulásában.

Az angioplasztikát követő resztenózis egy igen összetett patofiziológiai folyamat, amely jól jellemezhető az artériafal átépülésével és a neointima hiperpláziájával a ballon okozta sérülés helyén. Klinikai tapasztalatok és kísérleti megközelítések egyaránt arra mutatnak, hogy a fellépő oxidatív stressz (a ROI széles skálája) az egyik lényeges vonása a resztenózisnak.

Korábbi tanulmányok már bemutatták, hogy a különböző eredetű érsérülések helyén peroxinitrit képződik. Eredményeink a már közölt adatoknak megfelelnek, és sikerült azt is bemutatnunk, hogy a peroxinitrit keletkezése még a sértést követő 28. napon is folytatódott patkány modellünkben. A nitrotirozin akkumulációja az endotél rétegben konzisztenciát mutat a jelenleg elfogadott „válasz a sérülésre” resztenózis modellel. A

ballonkatéter okozta sérülés modellen végzett vizsgálataink arra mutatnak, hogy a peroxinitritnek jelentős szerepe van a resztenózis patogenezisében, és egy új terápiás célpont lehet a betegség megelőzésére.

A peroxinitrit-bontó katalizátor erekre gyakorolt védő hatása nemcsak a neointima formáció csökkentésén és a PARP aktiváció mérséklésén keresztül vált nyilvánvalóvá, hanem az endotélium funkcionális állapotát is szignifikánsan javította. A WW85 ezen hatása feltételezhetően nem közvetlen, mivel a sértetlen erekre szinte semmilyen hatást nem gyakorolt, hanem az érbelhártya azon sérüléseit védi ki, amelyeket egyébként a peroxinitrit-képződés és ennek következményeként a PARP-aktiváció okozna.

Azt a következtetést vonhattuk le ebből a kísérletsorozatból, hogy a $ONOO^-$ korábban leírt patogenetikus tulajdonságai megfigyelhetőek ballonkatéteres sértést követően. A peroxinitrit semlegesítése protektív hatású a sértett érszakaszra, aminek oka lehet a fehérjék nitrációjának kivédése és a kevesebb kromatinsérülés miatt a PARP aktiváció csökkenése az endotéliumban. A peroxinitrit farmakológiai semlegesítése ezért az angioplasztika terápiás megközelítésében is egy új lehetőséget jelenthet.

Az SHR állatokon kapott eredményeink konzisztensek az általunk felállított hipotézissel. Enalapril adásával nemcsak a magas vérnyomást tudtuk rendezni, hanem gátoltuk a PARP aktivációját is. Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy az angiotenzin nemcsak kísérletesen adagolva, hanem endogén forrásból származva is képes aktiválni a PARP-t az érrendszerben. Feltehetjük azt a kérdést, hogy vajon a PARP aktivációja a spontán hipertenzív patkányok esetében közvetlen következménye-e az angiotenzin II oxidatív és nitrózatív folyamatokat indukáló hatásának, vagy közvetve, a megnövekedett terhelés miatt alakul-e ki. A magas vérnyomás elméletileg fokozhatja az érbelhártya oxidáns- és szabadgyök-termelését a megnövekedett nyíróerő miatt. Az a felismerés, amely szerint az Ang II már szubpresszor dózisban is képes a PARP működését fokozni *in vitro* és *in vivo* egyaránt, közvetlen hatásra enged következtetni. Megállapítottuk, hogy az angiotenzin II okozta endotéldiszfunkció, legalábbis részben, a PARP aktivációra vezethető vissza. Hozzátéve, hogy elsőként írtuk le, hogy a magas vérnyomás betegségben aktiválódik a PARP, illetve hogy az ACE-gátlók protektív hatása kapcsolatban áll a PARP-aktiváció gátlásával SHR modellben.

Ezek a felismerések összhangban állnak olyan korábbi tanulmányokkal, amelyekben leírták a PARP-gátlás pozitív hatását a szívműködésre és az endotél funkcionális

állapotára a szívizom különböző érüléseiben, úgymint akut ischémia-reperfúzió vagy krónikus szívelégtelenség. Minden vizsgált fajban a PARP aktivitása szoros összefüggést mutat a DNS hatékony hibajavításával, és ennek következtében a várható élettartammal is. Mindezek ellenére az általunk használt kísérleti modellekben konzekvensen azt találtuk, hogy a PARP farmakológiai gátlása növeli a túlélést és javítja a kardiovaszkuláris rendszer állapotát. Ez az ellentmondás eszármazhat attól

1. az erőteljes oxidatív és nitrózatív stressztől, aminek az alanyainkat kitettük,
2. hogy a poli(ADP-riboziláció) mértékét a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) szabályozza, amelynek transzkripciója a korral változik: a PARG expressziója 26 éves rézuszmajmok vázizmában csupán 1/2,8-ada a fiatalkorban megfigyeltnek.

Eredményeink alapján a poli(ADP-ribóz) polimeráz farmakológiai gátlása egy újabb megközelítési módot jelent azon oxidatív károsodások kiváltotta súlyos kardiovaszkuláris megbetegedések megelőzésére, melyek gyakran jelennek meg az idősödő népesség körében, akár a korosodás egyik velejárójaként, akár mint a metabolikus szindróma következménye.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A korosodó népességnél kimutatható az oxidatív/nitrózatív stressz fokozott hatása.
2. A PARP gyógyszeres gátlása a kardiovaszkuláris rendszer öregedésének több szimptómáját kivédi.
3. A hiperlipidémiás, atheroszklerotikus vagy hipertenzív állatoknál megfigyeltük a reaktív szabadgyök-termelés növekedését, és a PARP-aktivitás fokozódását is.
4. A magas vérnyomás kezelése illetve az emelkedett koleszterinszint megfelelő értékre állítása csökkentette a PARP aktivitását a kísérleti állatokban.
5. A PARP aktiváció farmakológiai gátlása javította a kardiovaszkuláris rendszer állapotát hipertenzív és atheroszklerotikus modelljeinkben.
6. A kardiovaszkuláris rendszer megbetegedésének nemi dimorfizmusa mögött felismertünk egy olyan lehetséges mechanizmust, amely szerint a PARP aktivitás szabályozása nemhez kötött.
7. In vitro és in vivo eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ösztrogén, ösztrogén receptor α és a PARP a sejtmagban komplexet képez, és ez a kapcsolat akadályozza a PARP-ot abban, hogy a sérült DNS-hez kötődjék.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezésben felhasznált cikkek:

Szabó C., Pacher P., Zsengellér Zs., Vaslin A., Komjáti K., **Benkő R**., Chen M., Mabley JG., Kollai M. Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction: role of poly(ADP-ribose) polimerase activation. *Mol Med* 2004; 10: 28-35

IF: 3,576

Benkő R., Pacher P., Vaslin A., Kollai M., Szabó C. Restoration of the endothelial function in the aortic rings of apolipoprotein E deficient mice by pharmacological inhibition of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. *Life Sci* 2004; 75: 1255-1261

IF: 2,158

Pacher P., Vaslin A., **Benkő R.**, Mabley JG., Liaudet L., Haskó G., Márton A., Bátkai S., Kollai M., Szabó C. A new, potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor improves cardiac and vascular dysfunction associated with advanced aging. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 485-491

IF: 4,335

Szabó C, Biser A, **Benkő R**, Bottinger E, Suszták K. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice. *Diabetes* 2006; 11:3004-12

IF: 8,028

Egyéb nemzetközi publikációk:

Mabley JG., Horváth EM., Murthy KGK., Zsengellér Zs., Vaslin A., **Benkő R**., Kollai M., Szabó C. Gender differences int he endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polimerase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 812-820

IF: 4,033

Csordás A, Pankotai E, Snipes JA, Cselenyák A, Sárszegi Z, Cziráki A, Gaszner B, Papp L, **Benkő R**, Kiss L, Kovács E, Kollai M, Szabó C, Busija DW, Lacza Z. Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. *Life Sci.* 2007; 80(7):633-7

IF: 2,512

Horváth EM, **Benkő R**, Gerő D, Kiss L, Szabó C. Treatment with insulin inhibits poly(ADP-ribose)polymerase activation in a rat model of endotoxemia. *Life Sci.* 2008; 82(3-4):205-9

IF: 2,512

Magyar nyelvű publikációk:

Benkő R., Szabó C. (2005): A diabetes mellitus kardiovaszkuláris szövődményeinek molekuláris mechanizmusa és terápiája PRAXIS 2005. február