

# A parthanatos szerepe az endotél diszfunkció és a szívelégtelenség patomechanizmusában

Doktori tézisek

**Dr. Bárány Tamás**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Horváth Eszter Mária, Ph.D., egyetemi adjunktus

Konzulens: Dr. Zima Endre, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Horváth Viktor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Verzár Zsófia, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Péntes István, MTA doktora, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

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

Dr. Bálint Hajnalka, Ph.D., főorvos

Budapest

2019

# 1. BEVEZETÉS

A poli (ADP-ribóz) polimeráz-1 enzim (PARP) egy enzimes család legjelentősebb, sejtmagban található tagja, ami számos regulációs mechanizmusban játszik szerepet. Miután a DNS egyszálú sérülése során aktiválódik, a  $\text{NAD}^+$ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, az utóbbiból ADP-ribóz polimereket szintetizál és azokat nukleáris fehérjékhez köti (PARiláció). A PARP fiziológiai és patofiziológiai hatásait két fő mechanizmuson keresztül fejt ki. Egyrészt a PARiláció célfehérjéin (hisztonok, transzkripciós faktorok) keresztül közreműködik a DNR *repair* mechanizmusokban, befolyásolja a gén expressziót és részt vesz számos proinflammatorikus mediátor képződésének transzkripciós szintű szabályozásában. Másrészt az oxidatív és nitratív stressz által indukált PARP túlaktivációja során  $\text{NAD}^+$  és ATP depléción alakul ki, ami a sejt diszfunkciójához, végül a sejt nekrotikus halálához vezethet. Az oxidatív-nitratív stressz által okozott DNS-károsodás esetén kimutatható poli-ADP-ribosziláció további sejthalál formák kialakulásában is szerepet vállalhat. Az apoptózis során az aktív kaszpázok a PARP-1 enzimet fragmentumokra hasítják, ezzel megakadályozva a  $\text{NAD}^+$  készlet további csökkenését és megfelelő energiát biztosítanak az apoptotikus folyamatoknak. Továbbá a PAR felhalmozódása egy olyan kaszpáz-független sejthalál formát alakíthat ki, amelyben a mitokondriális faktorok, kifejezetten az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációja figyelhető meg. Feltehetően a PAR polimerek a sejtmagból a mitokondriumba jutva váltják ki az AIF transzlokációját, ami elősegíti a kromatin kondenzációját és a DNS degradációját. Ez a sejtmag és mitokondium közötti kapcsolat jellemzi azt a speciális sejthalál formát, amit parthanatosnak nevezünk.

A cukorbetegség vaszkuláris szövődményeinek kialakulásában és a szívelégtelenség hátterében a reaktív szabadgyökök központi szerepet játszanak, ami következményes poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációt eredményezhet. A hiperglikémia hatására az endotélsejtekben reaktív szabadgyökök szabadulnak fel, melyek a vaszkuláris diszfunkció kialakulását segítik elő. A reaktív gyökök interakcióba lépnek a NO-al és csökkentik a biológiai hozzáférhetőségét, ami hozzájárul az endotél diszfunkcióhoz. Bár a permanens hiperglikémia szerepét számos tanulmányban vizsgálták, a vércukor ingadozás hatásai kevésbé ismertek a diabétesz mellitusz vaszkuláris szövődményeinek kialakulásában.

A reaktív gyököknek a szívelégtelenség patomechanizmusában is kiemelkedő szerepet feltételeznek. A megtartott ejekciós frakciójú szívelégtelenség esetén az endoteliális szabadgyökök játszanak központi szerepet a miokardiális diszfunkció hátterében. A csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenségben az oxidatív-nitratív stressz kialakulása a szívizomsejtek sérüléséhez köthető, amit iszkémia, toxikus vagy infekciós ágensek okozhatnak. Bár egyre több experimentális kísérlet igazolta, hogy a szabadgyökök által kiváltott PARP aktiváció közreműködik a kardiális diszfunkció kialakulásában, azon humán vizsgálatok száma elenyésző, ahol a PARP aktiváció szívelégtelenségben betöltött szerepét tanulmányozták.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

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

### 2.1 Endotél diszfunkció és parthanatos ingadozó vércukorszintben

Vizsgáltuk, hogy:

1. az ingadozó vércukor szintek befolyásolják-e az endotél függő relaxációt.
2. a különböző vércukorszint profilok esetén láthatóak-e a lokális és szisztémás oxidatív-nitratív stressz változásai.
3. kimutatható-e az ingadozó vércukor szint mellett fokozott PARP aktivitás.

### 3.2 Szívelégtelenséget jellemző paraméterek és parthanatos

Vizsgáltuk, hogy:

1. kimutatható-e humán, szívelégtelen mintákon az oxidatív-nitratív stressz, a következményes PARP aktiváció és az AIF transzlokáció, melyek a parthanatos celluláris jellemzőit jelentik.
2. mutatnak-e összefüggést a szívelégtelenség paraméterei és a klinikai jellemzők a parthanatos markereivel.

### **3. MÓDSZEREK**

#### **3.1 Diabéteszes állatmodell**

Tizenkilenc, azonos életkorú, 380-480 g testsúlyú hím Wistar patkányban (Toxicoop, Budapest, Magyarország) streptozotocin (STZ) kezeléssel (iv. 70 mg/kg STZ, citrát puffer, Sigma-Aldrich, Németország) inzulin hiányos állapotot hoztunk létre. A 14. naptól a diabéteszes állatok egyik csoportjának (n=6) vércukorszintjét 24 óránkénti lente inzulin (s.c. 60 U/kg, Sanofi Aventis, Párizs, Franciaország) adásával normalizáltuk (kezelt DM csoport). A cukorbeteg állatok másik csoportjában (n=7) ingadozó vércukorszintet hoztunk létre 48 óránkénti ultralente inzulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánia) injektálásával (s.c. 60 U/kg) (Ingadozó VC csoport). 6 cukorbeteg állatot nem kezeltünk (DM csoport). Hét állat csak a streptozotocin oldószerét kapta (kontroll csoport). Tíz napos inzulinkezelést követően minden csoportban 48 órán keresztül ellenőriztük a vércukor szintet a farokvégből vett vérvétel során, az első vérvételt közvetlenül az inzulin beadása előtt végeztük és 6 óránként ismételtük. 2 hét inzulin terápia után az állatokat intraperitoneális tiopentállal elaltattuk. A további mérésekhez mellkasi aorta, vér és csontvelő mintákat gyűjtöttük.

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

#### **3.2 Humán, krónikus szívelégtelenség**

A vizsgálatban a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinika gondozása alatt álló, stabil kardiopulmonális állapotú (NYHA: II-III) szívelégtelen páciensek (n=20) vettek részt. Kivizsgálásuk és kezelésük

megfelelt az aktuális Európai Kardiológiai Társaság ajánlásának. A krónikus szívelégtelen (HF) csoportba 40% alatti EF esetén választottuk be a pácienseket. Kontroll csoportnak normál szisztolés funkciójú önkénteseket választottunk (n=15). A kontroll csoport életkorban, test-tömeg index és a szív és érrendszeri rizikóstatusz (dohányzás, cukorbetegség, magasvérnyomás, iszkémiás szívbetegség) alapján megegyezett a szívelégtelen csoporttal.

A vizsgálatot a Helsinki Deklarációban foglaltak alapján, a szükséges etikai engedéllyel (Semmelweis Egyetem – 7268-0/2011-EKU) és megfelelő írásbeli, szóbeli tájékoztatást követő írásbeli beleegyezés után végeztük.

### **3.3 Vaszkuláris funkció az ingadozó vércukorszintben**

A mellkasi aortát megtisztítottuk a periadventiciális zsírszövetől és 2-3 mm-s érgyűrűket vágunk le. Az állatkísérlet során kipreparált mellkasi aortát 37°C-ra előmelegített 5% CO<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub> keverékével buborékoltatott Krebs oldatos szervkádba helyeztük, aminek az összetétele NaCl 130mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,9 mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,6 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,17 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, EDTA 0,026 mM, glukóz 11 mM volt. Az érgyűrűket izometriás erőmérőre helyeztük és az előfeszítést 1 g-nak megfelelő erővel végeztük. Egy órás ekvilibráció után a funkcionális integritás tesztelésére K<sup>+</sup>-ban gazdag Krebs oldatot használtunk mint depolarizáló oldatot. Növekvő fenilefrin koncentráció mellett mértük az érgyűrűk kontrakciós kapacitását (10<sup>-8</sup>–3×10<sup>-5</sup> mol/l-es koncentráció tartományban). Ezután az érgyűrűk kontrakcióját 10<sup>-6</sup> mol/l fenilefrinnel váltottuk ki, majd acetilkolin (1×10<sup>-8</sup>–3×10<sup>-5</sup> mol/l) növekvő koncentrációja által indukált relaxációs görbét vettünk fel. Növekvő dózissú nátrium nitroprussidot (1×10<sup>-8</sup>–1×10<sup>-5</sup> mol/l) használtunk a simaizom NO iránti érzékenység ellenőrzésére. Minden

csoportban 8-10 érgyűrűn megismételtük a fenti méréseket. A fenilefrin által kiváltott kontrakciós választ a  $K^+$  indukálta összehúzódáshoz viszonyított %-os értékben fejeztük ki. A relaxációt a fenilefrin által kiváltott előfeszítéshez képest vizsgáltuk.

### **3.4 Parthanatos vizsgálata**

#### **3.4.1 Biokémia**

A humán vizsgálat során éhomi vérmintákat gyűjtöttünk a C-reaktív protein (CRP), N-terminális B-típusú nátriuretikus peptid (NT-proBNP), az oxidatív-nitratív stressz, a PARP aktiváció és az AIF transzlokáció meghatározására

A totál peroxid szint (plazma peroxidáció: PRX) felmérésére Oxystat vizsgálatot végeztünk a gyártó cég instrukciói alapján. Továbbá meghatároztuk a teljes antioxidáns kapacitást (TAC, OxiSelect™ TAC kit). A kialakuló színreakciókat Bio Tek Powerwave XS spektrofotométerrel értékeltük. Az oxidatív stressz indexet (OSI) a totál peroxid és a TAC arányából számítottuk ki.

#### **3.4.2 Immunhisztokémia**

Az állatmodellből mellkasi aorta és csontvelő mintákat használtunk fel az immunológiai festésekre. A humán vizsgálat során grádiens centrifugálással izoláltuk (Histopaque-1077, Sigma) a keringő mononukleáris leukocitákat A tirozin nitráció kimutatására nitrotirozin elleni poliklonális antitestet (nyúl, 1:80, 4°C, egy éjszakán keresztül) használtunk. A lipid peroxidáció mértékét a 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) elleni poliklonális antitesttel (nyúl, 1:200, 4°C, egy éjszakán keresztül) határoztuk meg. A PARP aktivitás vizsgálatára az enzimreakció végtermékét, a PAR-t festettük meg (monoklonális egér antitest, 1:100 - 1:500, 4°C, egy éjszakán

keresztül). Az AIF jelölésére poliklonális antitestet (nyúl, 1:100, 4 °C, egy éjszakán keresztül) használtunk. Másodlagos jelölésre biotinizált egér és nyúl antitesteket tettünk a kenetekre (30 perc). A specifikus jelzés vizualizálására a barna festődésű diaminobenzidin (DAB) komplexet és a fekete festődésű nikkeltartalmú DAB-ot adtuk az avidin-tormaperoxidáz mellé. Kék hematoxylin és piros festődésű Nuclear Fast Red háttérfestést használtunk.

### 3.4.3 Western blot analízis

Az állatok aorta szöveteiből fehérjét izoláltunk, melyet a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) protokollja szerint 10-15% nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) alapján szeparáltunk. Ezt követően a szeparált fehérjéket polivinilidén fluorid (PVDF) membránra blottoltuk (Xcell II blott Invitrogen). A PAR-ot jelölt fehérjék megjelölését PAR elleni primer, monoklonális antitesttel végeztük (1:2000, 4°C, egy éjszakán keresztül). Majd tormaperoxidázzal konjugált egér elleni szekunder antitestet adtunk hozzá (1:2000, egy óra, szobahőmérséklet). A jelölődést kemilumineszcens reagens segítségével vizualizáltuk. A denzitometriás értékeléshez ImageJ software-t (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) használtunk.

### 3.4.4 Áramlásos citometria

A keringő leukocitákat grádiens centrifugálással izoláltuk a gyártó (Histopaque-1083, Sigma) instrukciói alapján. Fixációt és permeabilizációt (Cytotfix/ Cytoperm Fixation/ Permeabilization Solution Kit) követően PAR elleni monoklonális, primer antitesteket (egér, 30 min, 4°C;) használtunk. A primer antitest izotípus kontrollja tisztított IgG3κ anti-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) antitest volt.



Másodlagos jelölésre fluoreszcens (FITC konjugált) egér elleni poliklonális antitestet (30 perc, 4°C) alkalmaztunk.

### **3.5 Statisztika**

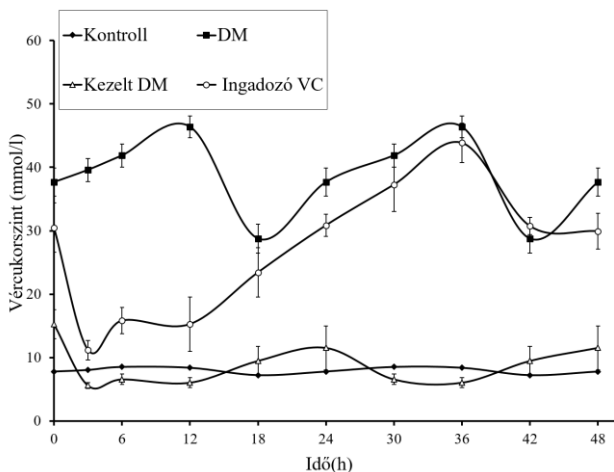
Normál eloszlás esetén átlag, szórás vagy standard error értékeket, illetve nem normál eloszlású változók ábrázolásakor medián és kvartiliseket használtunk. A statisztikai modellek használata előtt logaritmizáltuk a nem normál eloszlást mutató paramétereket. Több kísérleti csoport összehasonlítására egy illetve két-utas ismétléses ANOVA-t (érfunkciós vizsgálatok), valamint Tukey és Bonferroni-féle post hoc tesztet végeztünk. A vizsgálati alanyok jellemzőit 2 mintás Student féle t-próba segítségével hasonlítottuk össze. A kategorikus változók eloszlását Khi-négyzet próbával értékeltük. A klinikai paraméterek és a parthanatos jelei közötti összefüggést Pearson-féle korrelációval és lineáris regressziós modell használatával jellemeztük, továbbá a szívelégtelenség csoporton belül több változós regressziós módszert is alkalmaztunk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Endotél diszfunkció ingadozó vércukorszintben

#### 4.1.1 Vércukorszint ingadozások az állatmodellben

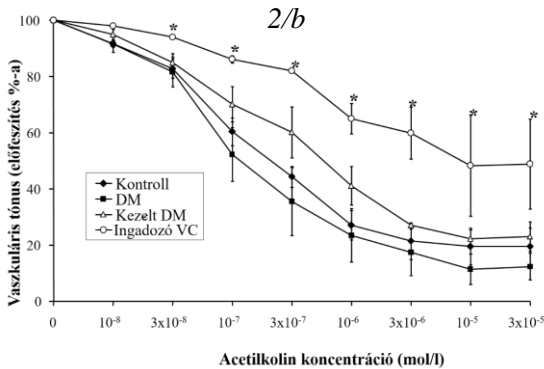
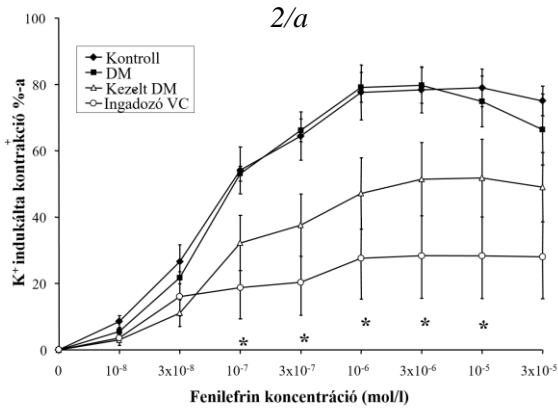
A kontroll csoport vércukor szintje minimális cirkadián ingadozást mutatott  $7,2\pm 0,8$  mmol/l és  $8,5\pm 0,3$  mmol/l között. A terápiában nem részesülő cukorbeteg állatmodell vércukor szintje markánsan fluktuált  $28,8\pm 5,6$  mmol/l és  $46,4\pm 4,2$  mmol/l között. A kezelt DM állatmodell vércukor profiljában, hasonlóan a kontroll csoporthoz, csekély változásokat mértünk  $5,6\pm 1,1$  mmol/l és  $11,5\pm 8,4$  mmol/l között. Bár ez a fluktuáció az inzulin adagolásának volt köszönhető, és nem követte az egészséges modellben tapasztalt cirkadián ritmust. Az ingadozó vércukorszintű modellben  $11,3\pm 1,5$  és  $43,4\pm 3,1$  mmol/l közötti értékeket tapasztaltunk (1. ábra).



1. ábra: Vércukor profilok ábrázolása (értékek átlag $\pm$ standard error formában ábrázolva)

#### 4.1.2 Endotél függő relaxáció és az ingadozó vércukorszint

Az ingadozó vércukorszint esetében jelentős csökkenést találtunk mind a fenilefrin által kiváltott kontrakcióban, mind az endotél függő relaxációban. A NO donorként szolgáló



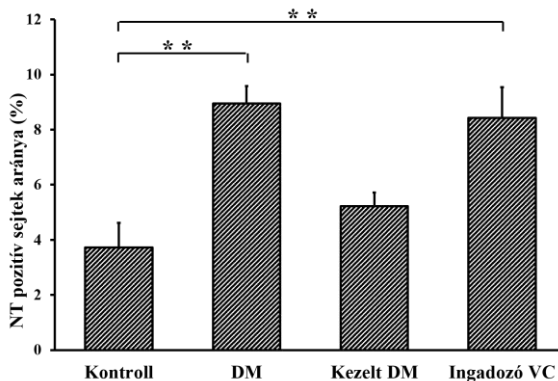
nitroprusszid adásával a relaxáció megtartott volt. Ezáltal a relaxáció károsodása az endotél diszfunkció okozta NO csökkent termelésével magyarázható és nem a vaszkuláris simaizom NO-ra adott csökkent relaxációs képességével (2/a, 2/b ábra).

2. ábra: Vaszkuláris kontrakció (2/a) és endotél függő relaxáció (2/b) az ingadozó vércukorszintben (értékek átlag±standard error formában ábrázolva, \* $p < 0,05$  ingadozó VC vs. kontroll)

#### 4.1.3 Oxidatív-nitratív stressz jelei a vércukor ingadozásában

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

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



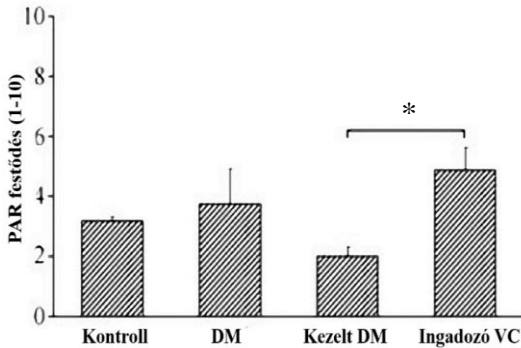
3. ábra: Csontvelő nitrotirozin festődése (értékek átlag±standard error formában ábrázolva,  $***p<0,01$ )

#### 4.1.4 PARP aktiváció szövetekben és keringő leukocitákban

A csontvelő PAR festése során a legjelentősebb aktivációt a DM csoportban tapasztaltuk. A kezelt DM állatmodellben a PAR pozitívítás szignifikánsan csökkent a kezeletlen DM csoporthoz képest. Ugyanakkor az ingadozó VC

mintái között a DM csoporthoz hasonló PAR pozitivitást találtunk, de a kontrollhoz képest a szignifikancia határát nem érte el.

Az endotél festése során az ingadozó vércukor csoportban volt a legkifejezettebb a PARP aktivitás, ami a kezelt DM csoporthoz képest szignifikánsan erősebb volt. ( $4,8 \pm 0,7$  vs.



kezelt cukorbeteg:  $2,0 \pm 0,3$   $p < 0,01$ )

(4. ábra). Az aorta

fal western blot

analízise során a

legkifejezettebb

fehérje PARiláció

a kezeletlen

cukorbeteg

állatokban volt

látható és az

inzulin kezelés

módjától

függetlenül

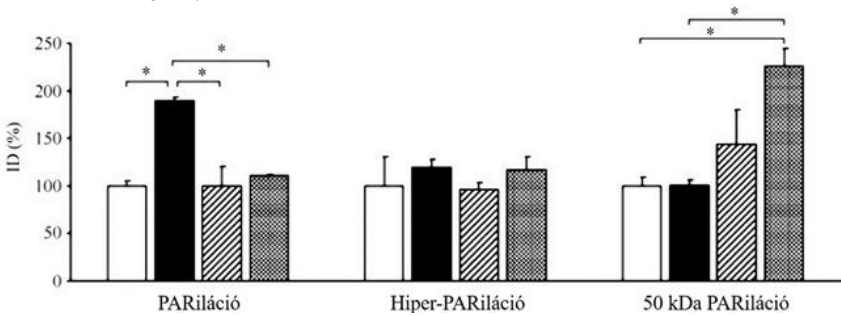
szignifikánsan

4. ábra: Aorta fal PAR festődése (értékek átlag+standard error formában ábrázolva,  $*p < 0,01$ )

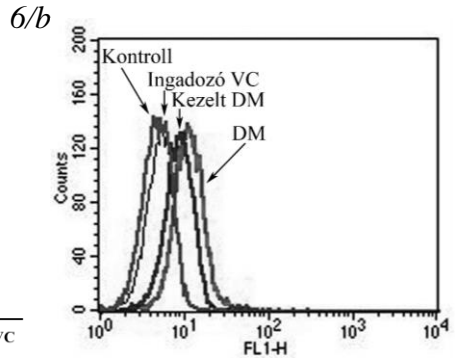
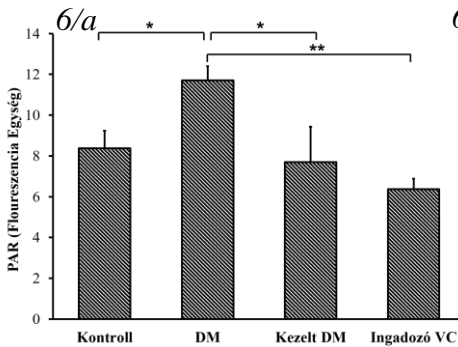
alacsonyabb PARilációt tapasztaltunk mind a kezelt DM csoportban, mind az ingadozó VC csoportban. A hiperPARiláció szintjében mindegyik csoportban hasonló értékeket kaptunk, de egy 50 kDa poliADPribozilált sávban az ingadozó VC csoport jelentősen erősebb aktivitást mutatott (5. ábra).

Az áramlásos citometria mérései alapján a kezeletlen cukorbetegek keringő leukocitáiban volt a legkifejezettebb PARP aktivitás (6/a, 6/b ábra). Az inzulin terápia viszont csökkentette a PARP aktivitását függetlenül a terápia módjától,

vagyis hogy jól kezelt DM-et vagy ingadozó vércukorszintet alakított-e ki.



5. ábra: Aorta fal Western blott analízisének denzitometriás kiértékelése. ID: relatív denzitás, amiben 100 %-nak a kontroll csoportot tekintettük, fehér oszlop: kontroll csoport, fekete oszlop: DM, vonalas oszlop: kezelt DM, szürke oszlop: ingadozó VC, értékek átlag+standard error formában ábrázoltuk, \* $p < 0,05$



6/a. ábra: Keringő leukociták áramlósos citometria mérései (értékek átlag+standard error formában ábrázolva, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

6/b. ábra PAR jelzésű leukociták reprezentatív ábrázolása FL1-H mutatja a fluoreszcencia intenzitását, „Counts” pedig a jelzést mutató sejtek számát jelenti.

## 4.2 Szívelégtelenség paraméterei és parthanatos

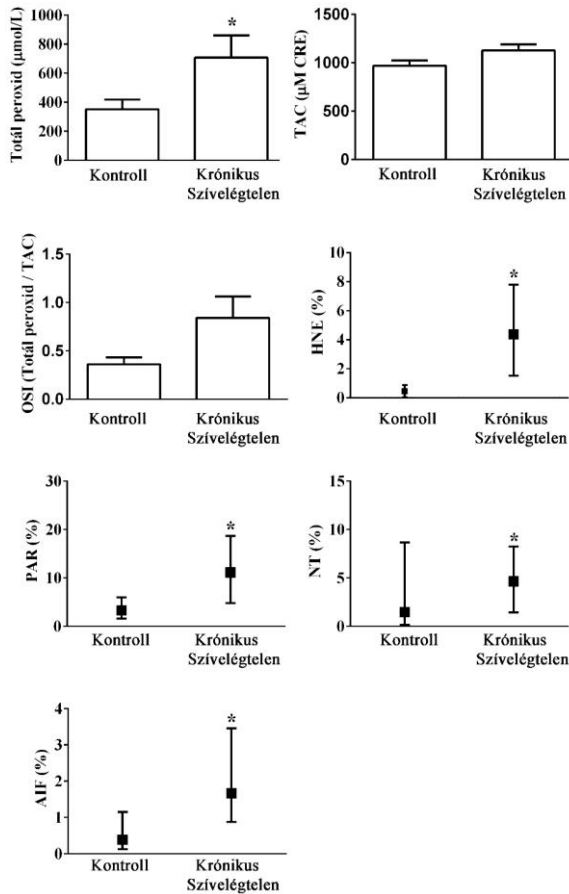
### 4.2.1 Klinikai paraméterek és anamnesztikus adatok

20 krónikus szívelégtelen (HF) páciens mellé életkorban és test/tömeg indexben megfelelő 15 kontroll alanyt választottunk be a vizsgálatunkba. A csoportok nemi megoszlása hasonló volt. Magasvérnyomás betegség, iszkémiás szívbetegség, cukorbetegség (2-es típusú diabétesz mellitusz) és dohányzási szokások tekintetében szignifikáns különbséget nem találtunk a két csoport között. Az aspecifikus gyulladási marker (CRP) vizsgálatában sem volt szignifikáns különbség. Az ejekciós frakció szignifikánsan alacsonyabb volt ( $60,0 \pm 5,3$  % vs.  $24,9 \pm 5,9$  %,  $p < 0,01$ ), a bal kamra végszisztolés ( $31,4 \pm 5,1$  mm vs.  $54,0 \pm 10,6$  mm,  $p < 0,01$ ) és végdiasztolés diaméter ( $48,2 \pm 4,6$  mm vs.  $63,0 \pm 11,1$  mm,  $p < 0,01$ ) jelentősen nagyobb volt a szívelégtelen csoportban. A pro-BNP szignifikánsan magasabb volt a szívelégtelenség csoportban ( $148,4$  [47,9; 178,0] pg/mL vs  $2338,5$  [1475,6; 4597,5] pg/mL,  $p < 0,01$ ).

### 4.2.2 Oxidatív-nitratív stressz, PARP aktiváció és AIF transzlokáció a véralkotókban

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

Ezenfelül a HF csoportban az AIF pozitív sejtek száma is jelentősen nagyobb volt (7 ábra).



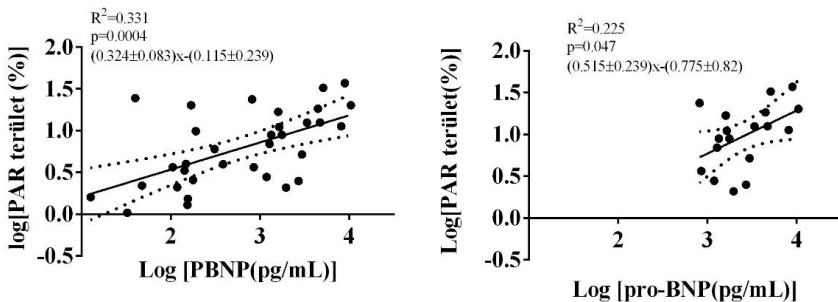
7. ábra: Parthanatos a véralkotókban (normál eloszlás esetén értékeket átlag+standard error formában ábrázolva, nem normál eloszlás esetén -HNE, NT, PAR, és AIF- értékek medián±kvartilis terjedelem formában ábrázolva, \*p<0,05)



#### 4.2.3 Szívelégtelenség és klinika paraméterek összefüggései a parthanatos mértékével

A teljes vizsgálati csoportban a pro-BNP szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a PRX értékkel, OSI-el, fehérvérsejt HNE festéssel, tirozin nitrációval, PARP aktivitással és az AIF transzlokációjával. Ugyanezen paraméterek az EF vizsgálata során pedig negatív korrelációt mutattak. A szívelégtelen csoporton belül a pro-BNP csak a PRX-el, OSI-el és a PARP aktivitással mutatott pozitív korrelációt (8. ábra).

A teljes vizsgálati csoportban a plazma peroxidáció és az OSI pozitív korrelációt mutatott a koronária betegséggel ( $R=0,587$ ,  $p<0,01$ ;  $R=0,573$ ,  $p<0,01$ ) és a dohányzással ( $R=0,552$ ,  $p<0,01$ ;  $R=0,525$ ,  $p<0,01$ ). A szívelégtelen csoportban a totál peroxid és az OSI szintén pozitív korrelációt mutattak a koronária betegség jelenlétével ( $R=0,676$ ,  $p<0,05$ ;  $R=0,687$ ,  $p<0,05$ ). A többváltozós regresszió analízis során a pro-BNP-t és a koronária betegséget találtuk, mint a PRX független determinánsait, melyek 97,7 %-ban befolyásolják a PRX alakulását.



8. ábra: A pro-BNP és a leukocita PARP aktivitás közötti lineáris regresszió ábrázolása

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az ingadozó vércukor profil mellett szignifikáns endotél függő relaxációs károsodást mutattunk ki. Ez alapján a diabétesz mellitusz szív és érrendszeri szövődményeinek kialakulásában nemcsak a folyamatosan magas vércukor szint, hanem a glukóz ingadozása is szerepet játszhat.
2. Vizsgálatunk során a korábbi irodalmi eredményekkel megegyezően kimutattuk a glukóz oszcilláció hatására kialakuló szabadgyökök jelenlétét. Az ingadozó vércukor jelentős tirozin nitrációt okozott a csontvelőben.
3. Szignifikáns PARP aktivációt találtunk az ingadozó vércukor modell endotél mintáiban. Western blott analízis során fokozott PARilációt a kezeletlen DM csoportban találtunk, bár 50 kDa sávban az ingadozó VC csoport mutatott fokozott PARP aktivitást. Az adekvát inzulin kezelés a csontvelőben, az endotélben és a keringő leukocitákban szignifikánsan csökkentette az enzim aktivációját. Eredményeink alapján a hiperglikémia mellett a vércukor szintek ingadozása is befolyásolhatja a PARP aktivációt.
4. A krónikus szívelégtelenség keringő, humán leukocitáiban kimutattuk az oxidatív-nitratív stressz fokozódását, a következményes PARP aktivációt és az AIF transzlokációt, ami a „parthanatos” folyamatának celluláris sajátosságaira utal.
5. A teljes vizsgálati csoportban a parthanatos mind az ejekciós frakció, mind a pro-BNP mértékével szignifikáns korrelációt mutatott. A szívelégtelen csoporton belül az oxidatív stressz és a PARP aktiváció mutatott szignifikáns összefüggést a pro-BNP értékkel. Vizsgálatunk során a szívelégtelenségben kimutatott oxidatív stressz kialakulásáért felelős faktoroknak a koronária betegséget és a pro-BNP mértékét azonosítottuk.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények listája

1. **Barany T**, Simon A, Szabo G, Benko R, Mezei Z, Molnar L, Becker D, Merkely B, Zima E, Horvath EM. (2017) Oxidative Stress-Related Parthanatos of Circulating Mononuclear Leukocytes in Heart Failure. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 1249614. **IF: 4,936**

2. Horvath EM, Benko R, Kiss L, Muranyi M, Pek T, Fekete K, **Barany T**, Somlai A, Csordas A, Szabo C. (2009) Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 52: 952-961. **IF: 6,551**

### 6.2 Disszertációtól független közlemények listája

1. Toth-Zsamboki E, Horvath E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengeller Z, **Barany T**, Pek T, Fekete K, Kiss RG, Preda I, Lacza Z, Gero D, Szabo C. (2006) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med*, 12: 221-228. **IF:2,708**

2. **Bárány T**, Muk B, Osztheimer I, Szilágyi Sz, Molnár L, Kuttyifa V, Becker D, Gellér L, Merkely B, Zima E. (2011) Pacemaker-implantált betegek telekardiológiai utánkövetése – Hazai tapasztalatok a Home Monitoring rendszerrel. *Card Hu*, 41: 231-238.

3. Boriani G, Da Costa A, Ricci RP, Quesada A, Favale S, Iacopino S, Romeo F, Risi A, Mangoni di S Stefano L, Navarro

X, Biffi M, Santini M, Burri H, MORE-CARE Investigators (**Barany T**). (2013) The MOnitoring Resynchronization dEVICES and CARdiac patiEnts (MORE-CARE) randomized controlled trial: phase 1 results on dynamics of early intervention with remote monitoring. *J Med Internet Res*, 15: e167. **IF: 4,669**

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

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

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

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