

CAPTOPRIL ÉS MELATONIN HATÁSA A BALKAMRA-REMODELLÁCIÓRA L-NAME-, ILLETVE ÁLLANDÓ FÉNY ÁLTAL INDUKÁLT HIPERTÓNIABAN

Baka Tamás¹, Krajcovicova Kristina¹, Pechanova Olga², Pelouch Vaclav³, Celec Péter⁴, Pálffy Roland¹, Repova Kristina¹, Vrankova Stanislava², Adamcova Michaela⁵, Paulis Ludovit⁶, Simko Fedor⁷

¹Kóréletani Intézet, Orvostudományi Kar, Comenius Egyetem, Pozsony, Szlovákia

²Élettani és Kóréletani Intézet, Szlovák Tudományos Akadémia, Comenius Egyetem, Pozsony, Szlovákia

³Orvosi Kémiai és Biokémiai Intézet, II. sz. Orvostudományi Kar, Károly Egyetem, Prága, Csehország; Cardiovascularis Kutatási Centrum

⁴Kóréletani Intézet és Molekuláris Biomedicina Intézet, Orvostudományi Kar, Comenius Egyetem, Pozsony, Szlovákia

⁵Élettani Intézet, Orvostudományi Kar, Károly Egyetem, Hradec Králové, Csehország

⁶Kóréletani Intézet, Orvostudományi Kar, Comenius Egyetem, Pozsony, Szlovákia; Élettani és Kóréletani Intézet, Szlovák Tudományos Akadémia, Pozsony, Szlovákia

⁷Kóréletani Intézet és III. sz. Belgyógyászati Klinika, Orvostudományi Kar, Comenius Egyetem, Pozsony, Szlovákia; Experimentális Endokrinológiai Intézet, BMC, Szlovák Tudományos Akadémia, Pozsony, Szlovákia

Kulcsszavak: L-NAME- és állandó fény által indukált hipertónia, bal kamra remodeláció, captopril, melatonin

Bevezetés: Az állandó fény által indukált vérnyomás-emelkedés egy attraktív – bár gyéren vizsgált – experimentális hipertónia modellt képez. Kutatásunk célja megvizsgálni, hogy az állandó fénynek (24 óra/nap) való exponálás és a hosszan tartó N-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) kezelés kombinációja előidéző-e bal kamra (BK) remodelációt, illetve az módosítható-e captoprillel vagy melatoninnal.

Anyag és módszer: 3 hónapos hím Wistar-patkányokat 6 csoportra osztottunk (n=9), majd 6 hétig kezeltük: kontroll, L-NAME (40 mg/kg/nap), állandó fény, L-NAME kezelés+állandó fény (L24), L24 patkányok kezelése captoprillel (100 mg/kg/nap) vagy melatoninnal (10 mg/kg/24 óra). Méréseink tárgyát az alábbiak képezték: a szisztolés vérnyomás, a BK relatív tömege, az endothelialis NO-szintáz (eNOS) és az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) szöveti expressziója, a malondialdehid és az előrehaladott proteinoxidációs termékek plazma koncentrációja, valamint az egyes kollagén frakciók hidroxiprolin szintje.

Eredmények: Az állandó fénynek való exponálás és az L-NAME kezelés hipertóniát, balkamra-hipertrofiát (BKH) és fibrózist idézett elő. A szisztolés vérnyomás emelkedését captopril teljesen, míg melatonin részben gátolta az L24 csoportban. Mindkét adagolt gyógyszer csökkentette az oxidatív károsodás mértékét, továbbá az ACE fokozott expresszióját a myocardiumban. Egyik gyógyszer sem gátolta meg a kombinált hipertónia modellben tapasztalt eNOS-expresszió mérséklődését. Egyedül captopril akadályozta meg a BKH kialakulását az L24 patkányoknál. A BK-ban mért szolubilis és inszolubilis kollagén hidroxiprolin koncentrációját captopril és melatonin is redukálta. A hidroxiprolin összkoncentrációt kizárólag melatonin csökkentette.

Következtetés: Az L-NAME és állandó fény kombinációja által indukált hipertóniában a patológiás BK-remodeláció kialakulását melatonin és captopril is gátolta, bár különböző módon.

Támogatta: VEGA 1/0187/09 és 2/0178/09, APVV-0538-07 és MSM0021620820.

EFFECT OF CAPTOPRIL AND MELATONIN ON LEFT VENTRICULAR REMODELLING IN CONTINUOUS LIGHT AND L-NAME-INDUCED HYPERTENSION

Tamás Baka¹, Kristina Krajcovicova¹, Olga Pechanova², Vaclav Pelouch³, Peter Celec⁴, Roland Pálffy¹, Kristina Repova¹, Stanislava Vrankova², Michaela Adamcova⁵, Ludovit Paulis⁶, Fedor Simko⁷

¹Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

²Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

³Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

⁴Institute of Pathophysiology and Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

⁵Institute of Physiology, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

⁶Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic; Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

⁷Institute of Pathophysiology and 3rd Clinic of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic; Institute of Experimental Endocrinology, BMC, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Keywords: continuous light and L-NAME-induced hypertension, left ventricular remodeling, captopril, melatonin

Introduction: Blood pressure enhancement induced by continuous light exposure represents an attractive but rarely investigated model of experimental hypertension. The aim of this study was to show whether the combination of continuous light (24 h/day) exposure and chronic N-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) treatment induces remodeling of the left ventricle (LV) and whether captopril or melatonin can modify these potential alterations.

Materials and methods: Six groups of 3-month-old male Wistar rats (n=9) were treated for 6 weeks: control, L-NAME (40 mg/kg/day), exposed to continuous light, L-NAME treated and exposed to continuous light (L24), L24 rats treated with either captopril 100 mg/kg/day, or melatonin (10 mg/kg/24 h). Systolic blood pressure (SBP), relative weights of the LV, endothelial NO-synthase (eNOS) and angiotensin-converting enzyme (ACE) expression in tissues, malondialdehyde and advanced oxidation protein products concentrations in the plasma and hydroxyproline levels in collagenous protein fractions were measured.

Results: The continuous light and L-NAME treatment led to hypertension, left ventricular hypertrophy (LVH) and fibrosis. An increase in SBP was completely prevented by captopril and partly by melatonin in the L24 group. Both drugs reduced oxidative damage and attenuated enhanced expression of ACE in the myocardium. Neither of the drugs prevented the attenuation of eNOS expression in the combined hypertensive model. Only captopril reduced LVH development in L24, whereas captopril and melatonin reduced left ventricular hydroxyproline concentrations in soluble and insoluble collagen, respectively. The total hydroxyproline concentration was reduced only by melatonin.

Conclusion: In hypertension induced by a combination of continuous light and L-NAME treatment, melatonin and captopril protect the heart against pathological LV remodeling differently.

Supported by grants VEGA 1/0187/09 and 2/0178/09, APVV-0538-07 and MSM0021620820.

RÉGI ISMERŐS EGY ÚJ KÖNTÖSBEN – HOL TERMELŐDIK TULAJDONKÉPPEN AZ ACE?

Bánhegyi Viktor¹, Fagyas Miklós¹, Mányiné Siket Ivetta¹, Enyedi Attila², Takács István², Végh Tamás³, Papp Zoltán¹, Tóth Attila¹

¹DE ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Debrecen

²DE ÁOK, Mellkassebészeti Osztály, Debrecen

³DE, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Tanszék, Debrecen

Kulcsszavak: ACE, termelődés, genetika, gátlás

Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) kitértetett szereppel bír a kardiovaszkuláris- és pulmonalis rendszerekben mind élettani, mind kóréletani szempontból. A tudományos szakirodalom az ACE elsődleges termelőési helyének a tüdőszövetet, azon belül is annak endothelsejtjeit tekinti. Munkám célja ezen alaptétel megvizsgálása egy klinikai kutatás keretében, kitérve az ACE endogén gátlásának helyi mechanizmusára. Vizsgálatainkhoz a Debreceni Egyetem Mellkassebészeti Tanszékén műtéten átesett páciensek (n=71) tüdő-, illetve vérmintáit vontuk be, azokból ACE-enzim aktivitást és genotípus szerinti besorolást végeztünk valamint rögzítettük a páciensek klinikai adatait.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a RAAS-rendszer funkcionális polimorfizmusai (II, ID, DD genotípus) meghatározó szereppel bírnak a keringő ACE mennyiségét illetően. Vizsgált beteganyagunk szűrőmintáinak elemzése során szignifikáns ACE aktivitásemelkedést tapasztalunk II (6,966±0,5166 U/ml, n=9) genotípusú betegeket összevetve ID (9,645±0,4223 U/ml, n=36, p=0,0043) és DD (11,20±0,6203 U/ml, n=26, p=0,0005) genotípusú betegek csoportjaival. Meglehető módon nem találtunk összefüggést a tüdőszöveti ACE aktivitások között, rendre az II (2,833±0,3179 U/ml n=9) genotípusú csoportot összevetve az ID és DD genotípusú betegcsoportokkal (3,034±0,1996 U/ml, n=36, p=0,6421; 2,709±0,2495 U/ml, n=26, p=0,7920). Az ACE endogén inhibíciójára vo-

natkozóan kimutattuk, hogy szérumban az ACE több mint 95%-a gátlás alá kerül a humán szérum albumin által. Ezzel összhangban, tüdőszövetben is kimutattunk egy totum (gátlás mértéke legalább: 69%), humán szérum albumintól eltérő reverzibilis inhibitor. Eredményeink tükrében elmondható, hogy az ACE tüdőben való elsődleges termelődése revidéálandó kérdés. Az endogén gátlás jelen aspektusai egy új irányt nyithatnak, amely alapján kardiovaszkuláris kóreléttani folyamatok kiindulása szintje az ACE endogén diszregulációja az emberi szervezetben.

OLD STORY IN A NEW COAT – WHERE DOES THE ACE COME FROM?

Viktor Bánhegyi¹, Miklós Fagyas¹, Ivetta Mányiné Siket¹, Attila Enyedi², István Takács², Tamás Végh³, Zoltán Papp¹, Attila Tóth¹

¹Division of Clinical Physiology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen

²Department of Thoracic Surgery, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen

³Department of Anesthesiology and Intensive Care, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen

Keywords: ACE, production, genetic, inhibition

The angiotensin converting enzyme (ACE) has a crucial role in the cardiovascular- and pulmonary physiology and pathology. Textbooks are in agreement that the ACE is produced in the lung tissue especially in the lung endothelium. The goal of my work was to investigate this fact and to investigate the potential endogenous regulation of the ACE in a clinical study. Lung tissue- and blood samples were collected from patients with lung surgery at the Department of Thoracic Surgery, University of Debrecen (n=71). We performed ACE activity measurement, determined the ACE genotype and recorded the medical history.

The circulating (serum) ACE activity is determined by an insertion-deletion polymorphism (II, ID, DD genotypes) in the ACE gene. We found a significantly elevated ACE activity in genotype groups ID (9.645±0.4223 U/ml, n=36, p=0.0043) and DD (11.20±0.6203 U/ml, n=26, p=0.0005) when compared to II (6.966±0.5166 U/ml, n=9) group. Surprisingly, we did not find any genotype difference among the ACE activities in the lung tissue (ID: 3.034±0.1996 U/ml, n=36, p=0.6421; DD: 2.709±0.2495 U/ml, n=26, p=0.7920) when compared to the II (2.833±0.3179 U/ml, n=9) patient group. Furthermore, signs for endogenous ACE inhibition were found. In general, ACE activity in the sera is inhibited more than 95% by the human serum albumin. Moreover, this endogenous ACE inhibition was also present in the lung tissue (inhibition level at least 69%). This tissue inhibitor was reversible and different from the human sera albumin. Our data suggests that a genotype dependent source of ACE significantly contributes to the circulating ACE, which is different from the lung. The endogenous inhibition of ACE suggests that ACE activity is endogenously regulated in vivo, and that dysregulation of this process may contribute to cardiovascular disease development.

MÁTRIX-METALLOPROTEINÁZ-2-GÁTLÓK FEJLESZTÉSE AKUT MIOKARDIÁLIS INFARKTUS KEZELÉSÉRE

Bencsik Péter¹, Kupai Krisztina¹, Görbe Anikó², Varga V. Zoltán³, Pálóczi János², Hajdú István⁴, Cseh Sándor⁴, Dormán György⁴, Ferdinandy Péter⁵

¹SZTE ÁOK, Biokémiai Intézet, Szeged

²SZTE ÁOK, Biokémiai Intézet és Pharmahungary Csoport, Szeged

³SE ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Budapest

⁴Targetex Kft.

⁵SE ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Pharmahungary Csoport, Szeged

Kulcsszavak: mátrix-metalloproteináz-2, gyógyszerfejlesztés, akut miokardiális infarktus

Bevezetés: Ismert, hogy a mátrix-metalloproteináz-2 (MMP-2) akut aktivációja hozzájárul a miokardiális diszfunkció kialakulásához akut miokardiális infarktus (AMI) során. Az MMP-2 gátlása ezért hatékony eszköz lehet AMI kezelésére. Az ígéretes preklinikai adatok ellenére azonban az MMP-gátlók nem szelektív és nem megfelelő alkalmazása a klinikai vizsgálatok sikertelenségét eredményezte. Ezért célunk egy új, szelektív MMP-2-gátló kifejlesztése és preklinikai tesztelése volt AMI indikációval.

Módszerek: Alapvegyületként a régóta ismert MMP-gátló, hidroxámsav típusú molekulákat vettük, azonban in silico vizsgálatokkal azt találtuk, hogy az imidazol- és tiazol-karbonsav alapú molekulákkal magasabb szelektivitás érhető el MMP-2 irányába. In silico screenelést követően a legígéretesebb molekulákat megszintetizáltuk, majd biológiai tesztelés-sorozatnak vetettük alá. Zselatin zimográfiával meghatároztuk a molekulák IC50 értékét MMP-2-re, majd a leghatékonyabb molekulákat szimulált iszkémia/reperfúziós károsodásnak kitett primer cardiomyocytá tenyészeteken teszteltük. Végül a sejtenyészeten legjobb védőhatást kifejtő molekula, az MMPI-1154 kardioprotektív hatását izolált patkányszív AMI-moddellen vizsgáltuk.

Eredmények: Az in silico vizsgálatokat követően 30 molekula szintézise volt kémiai megvalósítható, amelyből 12 molekula mutatott MMP-2-gátlást 100 µM alatti koncentrációban, és amelyek közül 8 molekula fejtett ki 100%-os gátlást az MMP-2-re zselatin zimográfiával vizsgálva. Hat molekula szignifikánsan kardioprotektív hatásának bizonyult a sejtenyészeten végzett kísérletek alkalmával, amelyek közül a leghatékonyabb az MMPI-1154 volt. Az MMPI-1154 1 µM-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét ex vivo patkányszíven a vivőanyaghoz viszonyítva.

Következtetés: In vitro és ex vivo vizsgálataink eredményei alapján az MMPI-1154 ígéretes vezérmolekula-jelölt lehet a gyógyszerfejlesztés további lépéseiben, így in vivo patkány AMI modellben tervezzük további tesztelését.

DEVELOPMENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 INHIBITORS AGAINST ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Péter Bencsik¹, Krisztina Kupai¹, Anikó Görbe², V. Zoltán Varga³, János Pálóczi², István Hajdú⁴, Sándor Cseh⁴, György Dormán⁴, Péter Ferdinandy⁵

¹Cardiovascular Research Group, Department of Biochemistry, University of Szeged, Szeged

²Cardiovascular Research Group, Department of Biochemistry, University of Szeged & Pharmahungary Group, Szeged

³Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, Semmelweis University

⁴Targetex Inc. Hungary

⁵Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest & Pharmahungary Group, Szeged

Keywords: matrix metalloproteinase-2, drug development, acute myocardial infarction

Introduction: Acute activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) during acute myocardial infarction (AMI) has been demonstrated to contribute to myocardial dysfunction. Inhibiting MMP-2 is therefore a potent tool to treat AMI patients. Despite promising preclinical data, adverse events derived from non-selective MMP inhibition have rendered clinical trials unsuccessful. Therefore, the aim of this study was to identify novel selective MMP-2 inhibitors against AMI.

Methods: Hydroxamic acid compounds, as first generation of MMP inhibitors, were taken as basic structures, however, during in silico analyses, we found that imidazole- and thiazole-carboxylic acid compounds exerts higher MMP-2 selectivity. After in silico screening, MMP inhibitor compounds were synthesized and subjected to a biological screening cascade. IC50 values for MMP-2 were determined by gelatin zymography. Then, stimulated ischemia/reperfusion injury on neonatal cardiomyocytes was performed to assess the cardioprotective effects of the most potent compounds. Finally, the compound with the highest cytoprotective effect from cell culture experiments, MMPI-1154, was tested in isolated rat heart model of AMI.

Results: After in silico screening, the synthesis of 30 compounds was available, from that 12 compounds showed significant MMP-2 inhibition under 100 µM concentration. Eight from 12 compounds exhibited 100% inhibition to MMP-2 as examined by gelatin zymography. Six compounds increased cell viability significantly in response to simulated I/R injury. In isolated hearts subjected to global IRI, MMPI-1154 significantly reduced infarct size at 1 µM as compared to the vehicle-treated hearts.

Conclusion: MMPI-1154 can be a promising lead candidate for further steps of drug development since it exhibited high selectivity for MMP-2, and significant cardioprotection in cell culture as well as in an isolated heart model of AMI.