

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Lekli István

**Növényi eredetű biológiailag aktív molekulastruktúrák
hatásai iszkémia/reperfúzió-indukálta szívizom
károsodásokkal szemben.**



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Tartalomjegyzék:

Az értekezés során felhasznált rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	5
Célkitűzések	14
Anyagok és módszerek	15
Eredmények	23
Eredmények megbeszélése	46
Összefoglalás	55
Summary	56
Irodalomjegyzék	57
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	68
Az értekezéshez fel nem használt egyéb közlemények	68
Tárgyszavak	72
Köszönetnyilvánítás	73

Az értekezés során felhasznált rövidítések jegyzéke:

AF: aorta kiáramlás

CF: koronária átáramlás

HR: szív frekvencia

LVDP: kifejlődő bal kamrai nyomás

LVdP/dt: kifejlődő bal kamrai nyomás

VF: kamrai fibrilláció

VT: kamrai tachikardia

HO-1: hemoxigenáz

ROS: reactive oxygen species (szabad gyökök)

COX: ciklooxygenáz

NOS: nitrogénoxid szintáz

ET-1: endothelin-1

Glut-4: glükóz transzporter-4

LC3: microtubule-associated protein light chain 3

mTOR: mammalian target of rapamycin

I/R: iszkémia/reperfúzió

MPTP: mitochondrial permeability transition pore

CO: szénmonoxid

HO: hemoxigenáz

KO: knock out

ET: endotelin

AMPK: AMP-activated protein kinase

Beclin-1: coiled-coil, moesin-like BCL2 interacting protein

Trx-1: thioredoxin-1

MAP kinázok: mitogen-activated protein kinasés

NF- κ B: Nuclear Factor-Kappa B

AP1: activator protein 1

Egr1: Early growth response factor 1

sICAM-1: soluble intracellular adhesion molecule-1

sE-Selectin: endothelial leukocyte adhesion molecule-1

sVCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

hsc 73: heat shock cognate protein

Lamp2a: lysosomal- associated membrane protein-2a

GABARAP: γ -aminobutyric acid type A receptor associated protein

GATE-16: Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa

UVRAG: UV irradiation resistance-associated gene

Ambra-1: activating molecule in Bec1-regulated autophagy

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

Atg: autophagy-related proteins

Bevezetés:

A szív és érrendszeri megbetegedések következtében bekövetkező elhalálozások száma napjainkban is vezeti a halálozási statisztikákat a fejlett országokban. Magyarországon az elhalálozások több mint felének háttérében valamilyen kardiovaszkuláris megbetegedés áll. Az elmúlt néhány évtizedben számtalan tanulmány foglalkozott az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások patomechanizmusának feltárásával, valamint a rizikófaktorok vizsgálatával, melyek között szerepel a dohányzás, elhízás, cukorbetegség, magas vérnyomás, mozgásszegény életmód, túlzott alkoholfogyasztás, valamint a telítetlen zsírokban és koleszterinben gazdag táplálkozás. Ennek ellenére az iszkémiás betegek terápiás kezelése még ma sem megoldott, és a betegségek incidenciája nem csökken, sőt növekszik és egyre fiatalabb korcsoportokat érint. Ezek a tények teszik indokolttá a témakör további vizsgálatát, hogy mélyebben megismerjük az ok-okozati összefüggéseket és célzottabb terápiás alternatívákat biztosítsunk a betegek, illetve a magas rizikójú beteg csoportok számára.

A betegségek kezelésében egyre fontosabb szerepet tulajdonítanak a megelőzésnek és a különböző rizikótényezők csökkentésének. A rizikótényezők közül a dohányzás abbahagyása, illetve a mértéktelen alkoholfogyasztás csökkentése tűnik egyszerűbb feladatnak. A helyes táplálkozási szokások kialakítása, illetve idősebb betegekben a már meglévő szokások megváltoztatása ennél nehezebb, sok esetben lehetetlen feladat. A táplálkozási szokások kialakításakor sokszor nem is a mennyiségi, hanem a minőségi változtatások megtanítása a nehéz feladat. Ezért egyre fontosabb szerepet töltenek be a növényi eredetű étrendkiegészítők, amelyek a betegek kezelésében, mint adjuváns szerek jöhetnek számításba. Továbbá a magas rizikójú csoportokban késleltethetik a betegségek kialakulását.

Az iszkémia kiváltó oka általában valamilyen szervi eredetű érelzáródás, illetve érszűkület vagy koronárispazmus lehet, mely révén az adott szövetrész perfúziója lecsökken, illetve teljes elzáródás esetén meg is szűnik, ezáltal zavar áll be az adott szívizomrész oxigén és tápanyagellátásában. Az iszkémia okozta zavar a szubsztrát, illetve oxigén ellátásban káros anyagcseretermékek felszaporodását eredményezi, melynek következtében kezdetben funkciózavar jön létre, majd a sejtek elhalása

következik be, nekrozis vagy apoptózis útján. A folyamat háttérében az egyik kiváltó ok a csökkent oxigén kínálat miatt a glükóz aerob metabolizmusának leállása. Iszkémia során az aerob glikolízist felváltja az anaerob glikolízis, mely viszont nem képes a sejtek ATP igényét fedezni. Az iszkémia kezdetén a szervezet a kreatin-foszfát szint csökkentése révén fenntartja az ATP szintet, ezt követően azonban az ATP szint csökkenni kezd. A másik fontos következménye az anaerob glikolízisnek, hogy felszaporodik a sejtekben a tejsav, amely csökkenti az intracelluláris pH-t, s a pH csökkenésével a miofilamentumok kalcium érzékenysége lecsökken. Ez a jelenség lehet a magyarázata annak, hogy az iszkémia kezdetén az ATP szint még csak kis mértékben csökkent és a Ca^{++} szint is megfelelő, azonban a miofilamentumok csökkent Ca^{++} érzékenysége miatt a pumpafunkciók hirtelen leállása következik be(20). A csökkenő pH fokozza a Na^+/H^+ antiporter aktivitását emelve az intracelluláris Na^+ szintet, ez csökkenti a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ cserét, ami fokozza a kalcium felhalmozódást a sejtekben. A lecsökkent ATP szint következtében zavart szenved a kalcium sejtplazmából történő eltávolítása, valamint az ATP-szenzitív K^+ csatornák megnyitása miatt csökken az intracelluláris kálium szint(6).

Az iszkémia során a sejtek illetve az érintett miokardium túlélésében elengedhetetlen feltétel a reperfúzió, azonban ez sem veszélytelen. A sejtek elhalása történhet a plazmamembrán szakadásával vagy programozott sejthalál, apoptózis útján. Általában a sejtek elhalásában akár nekrozis, akár apoptózis útján történik több tényező játszik szerepet, és a körülményektől függ, melyik van túlsúlyban(36). Általánosan elmondható, hogy legtöbb esetben az iszkémia/reperfúzió-indukálta másodlagos sejtelhalások a reperfúzió első perceiben történnek és a szarkolemma feldarabolódásával járnak(79, 85).

A reperfúzió kezdetén a megindult véráram következtében az érintett miokardium telítődik „friss” vérrel és helyreáll az oxigén, illetve a tápanyag kínálat. A reperfúzió kezdetén a nagymértékben redukálódott mitokondriális elektrontranszport lánc komponensei és a helyreállt oxigén ellátás miatt hirtelen nagy mennyiségű ROS (reactive oxygen species) termelődik, amelyet a meggyengült védekező antioxidáns rendszerek nem képesek semlegesíteni. A reperfúzió során további ROS forrás lehet a xantin oxidáz, NADPH oxidáz. A fokozott ROS (OH^\cdot , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$) termelődés, és a meggyengült

védekező rendszerek miatt alakul ki az oxidatív stressz, ami további károsodásokhoz vezethet. A keletkező ROS károsítja a lipideket (lipid peroxidáció), amely károsítja a citoplazma, illetve a különböző sejtorganellumok membránját, a fehérje láncok károsodása különböző kulcsfontosságú enzimek, illetve proteinstruktúrák funkcióvesztéséhez vezethet. Továbbá az oxidatív stressz károsíthatja mind a genomiális mind a mitokondriális DNS-t, ami különböző mutációkhoz, illetve a DNS töréséhez is vezethet. Mindezen károsodások a sejtek sérüléséhez, illetve elhalásához vezethetnek(76).

Reperfúzió során a pH, illetve az ATP szint visszaáll a normál közelébe ám az intracelluláris kalcium szint magas, ezt tovább fokozza a nátrium túltelítődés következtében a reperfúzió első periódusában „fordított” módon működő $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ antiporter. A sejtek anyagcseréjének rendeződése folyamán a Ca^{++} túltelítődés átmegegy a Ca^{++} oszcillációjában a sejtplazma és sarcoplazmatiucus reticulum között. A folyamat következtében magas Ca^{++} csúcsok alakulnak ki egymást követően a sejtekben(46). A reperfúzió kezdetén a Ca^{++} túltelítődés egy fokozott kontraktilis állapot idéz elő, továbbá növeli az aritmiák kialakulásának valószínűségét(79). A reperfúzió kezdetén mikor a pH rendeződik különböző kalciumfüggő proteolitikus folyamatok indulnak el, amelyek iszkémia alatt az alacsony pH miatt gátoltak. Ezek a folyamatok a kalpainokhoz kapcsolhatóak(27). Feltehetően a magas ROS koncentráció, illetve ezek a kalcium-függő proteolitikus folyamatok állnak az iszkémia/reperfúzió után esetlegesen kialakult csökkent kamrafunkció hátterében (stunned myocardium)(26).

Az elmúlt évtizedben egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a mitokondriumok diszfunkciójának illetve működésképtelenségének a reperfúzió indukálta károsodásokban. Az MPTP (mitochondrial permeability transition pore) megnyílása előidézi a mitokondriumok depolarizációját, felfúvódását majd külső mitokondrium membrán szakadását, amely hozzájárulhat mind az apoptózis mind a nekrozis kialakulásához. Az MPTP iszkémia alatt zárva van az alacsony pH miatt, majd a reperfúzió kezdetén „ideális” körülmények adódnak a megnyitáshoz. Ezen körülmények között szerepel a Ca^{++} túltelítettség, a pH normalizálódása, valamint az oxidatív stressz (36).

Az oxidatív stressz megváltoztatja a kardiomiociták metabolizmusát, a különböző szignáltranszdukciós utakat, illetve bizonyos gének expresszióját(41). Ez a megváltozott redox környezet tehát nagy szerepet játszik az I/R-indukálta károsodások kialakulásában. Ismeretes az a tény hogy a szabadgyökfogó tulajdonsággal rendelkező molekulák rendelkeznek kardioprotektív hatással. A sejtek fel vannak szerelve különböző védekező antioxidáns rendszerekkel, amelyek normál esetben képesek a keletkező ROS semlegesítésére. Ez lehet enzimatis, mint pl.: a kataláz, szuperoxid-diszmutáz (MnSOD, Cu/ZnSOD), thioredoxin-reduktáz, vagy a glutathion-peroxidáz, vagy nem enzimatis mint pl.: a thioredoxin, glutaredoxin, glutathion, vitaminok (A, E, C) coenzim Q, omega-3-zsírsavak, továbbá az extracelluláris folyadékban található albumin, ceruloplazmin, transferrin(13). Ezek mellet jó néhány növényi származék is rendelkezik szabadgyökfogó tulajdonsággal, illetve kardioprotektív hatással. A Közép- és Dél-Amerikában őshonos farkascseresznye (*Withania somnifera*) megvédi a szívizmot mind az I/R mind az izoprenalin-indukálta károsodásokkal szemben (32, 68). Hasonlóan a farkascseresznyéhez a Dél-Ázsiában honos bengáli-birs is védelmet nyújtott az izoprenalin-indukálta károsodásokkal szemben(80). Ezek mellett számos más növényi kivonatról, illetve növényi származékról mutatták már ki, hogy rendelkeznek kardioprotektív hatásokkal. A növények kardioprotektív hatásaiban nagy szerepet játszanak a flavonoidok, antocianidok, polifenolok, szabad telítetlen zsírsavak, a magas rosttartalom és egyéb más biológiailag aktív komponensek(37, 73, 108).

A meggy mag hazánkban elsősorban, mint a meggy felhasználásának mellékterméke jelenik meg. Azonban a meggy mag szilárd fázisának analízise során kiderült, hogy a meggy mag szilárd frakciója is tartalmaz több biológiailag aktív komponens, mint pl.: különböző polifenolokat, flavonoidokat, növényi zsírsavakat, pro- és antocianidokat, transz- rezveratrolt, illetve kisebb mennyiségben más biológiailag aktív komponenseket. Szabó és munkatársai kimutatták, hogy a meggy mag kivonattal kezelt állatok retinája ellenállóbb az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben, a protektív hatás hátterében a hemoxigenáz-1 (HO-1) rendszert azonosították be. A tanulmány szerint a meggy mag kivonattal kezelt állatok szemében a HO-1 expresszió I/R után is szignifikánsan magasabb volt, mint a kezeletlen kontroll állatokban, ezzel együtt az endogén CO szint is megemelkedett. Ezek mellett a

meggy-mag-kivonattal történő kezelés megakadályozta I/R után a Ca^{++} és Na^+ ionok intracelluláris felhalmozódását valamint az intracelluláris K^+ ion vesztést (93). Mivel a hemoxigenáz rendszer citoprotektív és kardioprotektív szerepe ismert a kardiovaszkuláris rendszerben(77), valamint az intracelluláris ionok megfelelő szinten tartása nagy jelentőségű az I/R-indukálta károsodások kivédésében(78), ezért döntöttünk amellett, hogy megvizsgáljuk vajon a meggy-mag kivonatának van-e hasonlóan kedvező hatása az iszkémia/reperfúzió indukálta miokardium károsodásokkal szemben.

A megfelelő táplálkozás fontosságának hangsúlyozásában és a különböző növényi eredetű anyagok vizsgálatában fontos tényező volt az úgynevezett „Francia paradox” jelenségének felismerése, és a hátterének vizsgálata. A „Francia paradox” szerint a franciák sem fogyasztanak kevésbé zsíros ételeket, illetve a francia konyhában is megtalálhatóak olyan alapanyagok, amelyeket nem tartanak egészségesnek, azonban átlagosan 4 évvel élnek tovább, mint az amerikaiak. Továbbá a miokardiális infarktus kialakulásának a gyakorisága, illetve a koronária megbetegedések száma is kb. 40 %-kal alacsonyabb, mint az amerikaiaké vagy más hasonlóan fejlett országban élőké(22, 83). A jelenség hátterének vizsgálatából nagyszámú tudományos publikáció született, melyek eredményi alapján kiderült, hogy az antioxidánsokban gazdag ételek, mint pl.: az étcsokoládé, vagy szójatermékek, illetve italok, mint a vörösbor vagy különféle teák, kardioprotektív hatásokkal rendelkeznek(42, 81). A „Francia paradox”-ért legalább részben a polifenolokban gazdag vörösborfogyasztást teszik felelőssé(31, 83). Egy-két pohár vörösbor elfogyasztása csökkenti a kardiovaszkuláris, cerebrovaszkuláris és perifériás vaszkuláris megbetegedések kialakulásának a kockázatát(31, 57). Ezek mellett csökkenti a különböző daganatos megbetegedések kialakulási valószínűségét, illetve lassítja a különböző neurodegeneratív megbetegedések progresszióját(31, 102). A vörösborban megtalálható kb. 500 különböző antioxidáns hatóanyag közül napjainkban a rezveratrolt és a proantocianidineket tartják elsősorban felelősnek a kedvező hatásokért.

A rezveratrol (3,5,4'-trihydroxystillbene) egy polifenol, melynek egyre több kedvező biológiai és egészségmegőrző hatást tulajdonítanak, a kemoprevenziótól a kardioprotekcióig(29). A rezveratrol tömege 228.25 Dalton összegképlete $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$. Cis és transz formában létezik és bár mind a két formájában megtalálható a természetben a transz- rezveratrol hatásai nagyobb mértékben tanulmányozottak. A rezveratrol a

vörösbor mellett megtalálható, a szőlőben, mogyoróban, áfonyában, a meggyban és még több különböző zöldségben és növényben(14). Szintézisét a stilbészintáz végzi egy molekula p-kumaril-CoA és három molekula malonyl-CoA felhasználásával különböző magasabb rendű növényekben. Először 1940-ben Takaoka izolálta a hunyor gyökeréből (*Veratrum grandiflorum*)(95). A figyelem középpontjába 1992-től kezdett kerülni, amikor Siemann és Creasy kimutatták a borban(90), illetve még inkább 1995-ben mikor Bertelli és munkatársai leírták, hogy rendelkezik trombocita aggregáció gátló hatásokkal(7). Ezt követően bizonyítottá vált, hogy rendelkezik daganatellenes hatásokkal is és ezzel egy időben robbanásszerűen növekedett a megjelent tudományos közlemények száma, amelyek a rezveratrol biológiai hatásaival foglalkoznak(47). Igazolták a rezveratrol daganatellenes hatását, valamint hatékonyságát mind az iszkémiás mind más kardiovaszkuláris megbetegedésekben, továbbá kimutatták, hogy megnöveli az élettartamot(2, 5, 8). Számtalan tanulmány választotta célkitűzésének a rezveratrol hatásmechanizmusának vizsgálatát. A rezveratrol képes kötődni az ösztrogén receptorokhoz és azokon keresztül módosítja különböző a DNS szintézishez és a sejt ciklushoz kapcsolódó fehérjéket, mint pl. p53 és Rb/E2F, valamint különböző ciklineket és ciklin-függő kinázokat. Továbbá hatással van a stressz válasz illetve a sejt proliferációban szerepet játszó transzkripciós faktorokra, mint pl. NF- κ B, AP1 és Egr1. Ezen hatások részben különböző MAP kinázokon (mitogen-activated protein kinasés), illetve tirozin kinázokon keresztül mediálódnak és vezetnek a túlélési, illetve apoptotikus faktorok módosulásához (pl. Bcl-2 fehérje család), valamint bizonyos enzimek, úgy mint a ciklooxygenáz (COX), nitrogénoxid szintáz (NOS), továbbá I-II fázisú detoxifikáló enzimek módosításához. Ezek mellett a rezveratrol befolyásolja bizonyos transzkripciós kofaktorok expresszióját, illetve aktivitását is, ilyenek pl. a p300 és a sirtuin-1(21, 91).

A különböző közleményekből, amelyek a rezveratrol hatását vizsgálták az iszkémia/reperfúzió okozta szívkárosodásokra kiderült, hogy több egymás melletti mechanizmus játszik alapvető szerepet a kardioprotektív hatások kialakulásában. Kimutatták, hogy a rezveratrol növeli az i-NOS, e-NOS és az n-NOS szintet, és ellazítják az izolált aorta gyűrűk simaizmát, valamint csökkentik a szívizom károsodását(24, 44). Valószínűleg ez a tulajdonsága is szerepet játszik az *in vivo* antioxidáns sajátosságaiban(82), illetve az hogy képes a kataláz szintjének a megemelésére(25).

Továbbá bizonyították azt is, hogy gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik. Jelentősen csökkentette I/R után a pro-adhéziós molekulák, így a sICAM-1 (soluble intracellular adhesion molecule-1), sE-Selectin (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) és sVCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) szintjét(16). Továbbá prekondicionálja a szíveket az A₁ és az A₃ receptorok aktiválásán keresztül. Az A₁ receptorhoz kapcsolódó hatás a PI3K-Akt-Bcl-2 túlélési útvonal aktiválása, míg az A₃ receptorokhoz köthető a CREB függő Bcl-2 útvonal aktiválása(15). Ezek mellett a rezveratrol módosítja különböző MAP kinázok aktivitását, valamint növeli a HO-1, a Trx-1 (thioredoxin-1) és a VEGF (vascular endothelial growth factor) szintjét elősegítve a neovaszkularizációt az infarktusz területen(49).

A diabetes egy nagyon fontos rizikófaktor, mely sok szövődménnyel járhat és súlyosbíthatja az iszkémiás megbetegedéseket. A diabetes ezen tulajdonságaiért több tényező is felelős, ezek közül itt kiemelném a megnövekedett oxidatív stresszt, a növekedett trombozishajlamot, valamint az endoteliális diszfunkciót(1, 28, 52). Kísérletes körülmények között tartósan magas szénhidrát tartalmú táplálék inzulin rezisztenciát okoz normál illetve Zucker Obese állatokban(45), és endoteliális diszfunkció alakul ki(71). Mivel a rezveratrol képes védeni az endoteliális diszfunkciót, valamint az I/R-indukálta károsodásokkal szemben az ép állatok szívében ezért feltételeztük, hogy képes lehet az elhízott állatok szívizomját is védeni az I/R indukálta károsodásokkal szemben. Ezért 5/mg/ttkg rezveratrollal kezelt elhízott állatok szívét vetettük alá 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak külön cukorterheléssel vagy pedig anélkül. Továbbá vizsgáltuk, hogy a rezveratrol hogyan hat a testsúlyra és a vércukorszintre, valamint a posztiszkémiás szívfunkciókra.

Amint azt fentebb említettük az I/R során kialakult funkciózavar következtében a sejtek nekrozis vagy apoptózis útján halnak el. Ezek mellett létezik egy másik típusú nem apoptotikus programozott sejtihalál, az autofágia. A három mechanizmus közül az autofágia szerepe a legkevésbé tisztázott. Az autofágia egy olyan evolúciósan meglehetősen konzerválódott katabolikus folyamat, amelyben a sejt saját részei degradálódnak lizoszómális útvonalon. A jelenség normál sejtekben is megfigyelhető, melynek során a sejt lebontja, majd újra felhasználhatja bizonyos hosszú életű fehérjéit,

makromolekuláit vagy akár egész sejt organellumait, így például mitokondriumokat, riboszómákat, vagy peroxiszómákat.

Az autofágiának három formáját különböztetjük meg: a makroautofágiát, a mikroautofágiát, és a chaperon mediált autofágiát. Mikroautofágia során a lizoszóma membránja direkt beborít bizonyos citoplazma részeket. Chaperon mediált autofágia során különböző módosított fehérjék kerülnek be a lizoszómákba a hsc 73 (heat shock cognate protein) és a Lamp2a (lysosomal- associated membrane protein-2a) segítségével. A makroautofágia a legaktívabb formája az autofágiának, ahol kezdetben egy izolációs membrán formálódik, amely növekszik és kialakul a kettős membrán struktúra amelyet autofagoszómának hívnak. Az autofagoszóma körbevesz citoplazma részeket, bizonyos kóros fehérjéket vagy akár sejtorganellumokat is és ezt követően egyesül egy lizoszómával és kialakul az autofagolizoszóma(112). Fiziológias körülmények között az autofágia fontos szerepet játszik a sejtek homeosztázisában és katabolikus energiaforrásként szolgál éhezés alatt(55). A jelenséget szívizomsejtekben először Sybers és munkatársai írták le 1976-ban(92). A tanulmány szerint a szívizomsejtektől átmenetileg megvonták az oxigén és glükóz ellátást, majd ezt visszaállították és az indukálta az autofágiát. Ezt követően Decker és Wildenthal izolált Langendorff nyúl szíven megfigyelték, hogy az autofágia fokozódása kapcsolatban áll a szív funkcionális felépülésével I/R követően(18). Yan és munkatársai megállapították, hogy a krónikusan iszkémiás miokardiumban az autofagoszómák száma emelkedett az elő szívizomrészeken és alig detektálható az elhalt miokardiumban, valamint az autofágia mértékének emelkedésével csökkent az apoptotikus sejtek száma(111). Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint, mind az iszkémia mind a reperfúzió indukálja az autofágiát. Az iszkémia által indukált autofágia az AMPK függő, ezzel szemben a reperfúzió indukálta autofágia nem függ az AMPK-tól(66). Opiari és munkatársai leírták, hogy a rezveratrol képes indukálni az autofágiát bizonyos daganatos sejtvonalakon(72). Ezek alapján döntöttünk úgy, hogy megvizsgáljuk, vajon a rezveratrol indukálta kardioprotektív hatásokban szerepet játszik-e az autofágia jelensége. A tanulmányban vizsgálni kívántunk egy másik növényi származékot a γ -tokotrienolt(17). A közelmúltban megjelent tanulmányunkban beszámoltunk arról, hogy a γ -tokotrienol képes védelmet nyújtani a szíveknek I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Előző tanulmányainkban a különböző

tokotrienol izomereket hasonlítottuk össze, eredményeink szerint a γ -tokotrienol rendelkezik a legjelentősebb kardioprotektív hatással. Vizsgálatainkban kiderítettük azt is, hogy a γ -tokotrienol aktiválja az Akt túlélési útvonalat(17). Egy másik tanulmány szerint a γ -tokotrienol képes autofágiát indukálni patkány pankreasz stellate sejtekben(84). Mivel mind a két hatóanyag képes autofágiát indukálni és az Akt túlélési útvonalat aktiválni ezért vizsgálni kívántunk, hogy a rezveratrol és a γ -tokotrienol együtt adva rendelkeznek-e valamilyen szinergista hatással.

Az autofágia folyamatának tanulmányozására során két markert választottunk az egyik a Beclin-1 a másik az LC3, továbbá elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a jellegzetes autofagoszómák kimutatása érdekében. Az LC3II az egyik legjobb marker az autofagoszómamembrán komponenseire. Az LC3-at más néven Atg 8, az Atg 4 egy cisztein proteáz hasítja a C-terminális arginint és alakítja át LC3I-é, ezt követően az Atg 7 aktiválja a C-terminális glicint és az Atg 3 segítségével eltávolítja azt, majd foszfatidiletanolaminnal konjugálódik és alakul ki az LC3II. Az LC3II-öt ezt követően az Atg 5 transzferálja az autofagoszóma külső membránjába(65, 96). Az LC3 mellett két másik Atg 8 homológ is létezik a GABARAP (γ -aminobutyric acid type A receptor associated protein) és a GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa)(86, 104).

Az LC3 mellett a Beclin-1-et használtuk markerként. A Beclin-1 először, mint a Bcl-2 kötőpartnere lett azonosítva(59). A Beclin-1 (Atg6) szerkezete és szerepe az autofagoszómák kialakulásában evolúciósan konzervált(51). A Beclin-1 a Vps34 III csoportú foszfatidilinozitol 3 kinase (PI3K) allosztérikus aktivátora(56), emellett a Beclin-1-hez direkt kötődik még az UVRAG és az Ambra-1, amelyek aktiválják az autofágiát és a Bcl-2-öt, amely gátolja az autofágia kialakulását(23, 58, 75). A Beclin-1 teljes deléciója az embrió korai elhalásával jár, s a heterozigóta állatok normál fenotípusúak, de nagyobb arányban alakulnak ki spontán tumorok bennük(113).

Célkitűzések:

A munka során célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk különböző növényi kivonatok illetve vitaminok hatását az iszkémia/reperfúzió-indukálta aritmiák, valamint a posztisztkémiás károsodások ellen izolált szív modellen.

- I. Vizsgáltuk a meggymag szilárd fázisának hatásait a poszt iszkémiás szívfunkciók felépülésére, az iszkémia-reperfúzió indukálta kamrai aritmiák és kamrai fibrilláció kialakulásának csökkentésére, valamint a miokardiális infarktus és apoptózis mérséklésére. Vizsgáltuk, hogy a meggymag szilárd fázisával történő kezelés képes-e csökkenteni a kaszpáz-3 aktivitást a szívszövetben.
- II. Célkitűzéseink közt szerepelt annak vizsgálata, hogy kiderítsük a rezveratrol képes-e javítani a posztisztkémiás szívfunkciókat illetve csökkenteni az infarktusos terület nagyságát és az apoptózis mértékét genetikailag módosított „zucker obese” patkányokban. Valamint, hogy a hatásban milyen fehérjék játszhatnak szerepet.
- III. Vizsgáltuk, a rezveratrol és γ -tokotrienol hatását külön és együtt adagolva a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére, az infarktusos terület nagyságára valamint az apoptózis mértékére. Tanulmányoztuk az autofágia szerepét ezen két molekula szívvédő hatásaiban. Továbbá vizsgáltuk a különböző túlélési fehérjék expresszióját.

Anyagok és módszerek:

Kísérleteink során hím "Zucker obese" és Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Valamennyi állat a „principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelő körülmények között tartottuk és használtuk fel (NIH 85-23, revised 1996).

1. Kezelési protokollok:

A. A meggy mag kivonat készítése és kezelési protokoll:

A meggy magok szárítását követően a csonthéjat eltávolítottuk és a megőröltük, majd n-hexánnal extraháltuk Soxhlet készülékben. Az oldószert vákuumban eltávolítottuk, és egy sárga színű olajos fázist kaptunk (fázis 1), mely tömege 32-36%-a volt az eredeti tömegnek. A visszamaradó szilárd fázist (fázis 2) szárítottuk, és a későbbiekben ezt az olajmentes szilárd fázist használtuk fel a vizsgálatokhoz. A fázisok szétválasztását követően UV-, infravörös-spektroszkópiai, gáz-, folyadék- valamint tömeg- spektrometriás vizsgálatokat végeztünk. Az olajos fázisban triglicerideket, olajsav származékokat, α -tokoferolt, tokotrienolokat, és tokoferol szerű anyagokat találtunk. A szilárd fázisban több bioaktív komponenst azonosítottunk, úgy mint különböző cianidok (2-4%), polifenolok (1-3%), flavonoidok (1-4%), növényi zsírsavak (1-3%), pro- és antocianidok (1-2%), transz- rezveratrol (1%), stilbének (1%), és katechinek (1%).

A tanulmányhoz a hím Sprague-Dawley (280-360g) patkányokat öt csoportba osztottuk, az I-IV. csoportba tartozó állatokat 14 napon át kezeltük különböző dózisé meggy mag kivonattal (1, 5, 10 és 30 mg/ttkg/nap), az ötödik csoport állatai oldószert (0,9%-os NaCl oldatot) kaptak naponta egyszer szájon keresztül.

B. Kezelési protokoll rezveratrollal:

23-24 hetes „zucker obese”, illetve hasonló korú normál patkányokat használtuk a kísérletekhez. Az állatokat hálós ketrecekbe hármával helyeztünk el, és 12-12 órás éjszakai és nappali ciklust tartottunk fenn. A kezelések megkezdése előtt az állatokat 7 napon keresztül tartottuk állatházunkban. Ezt követően az obese állatokat négy csoportba

osztottuk. Az első csoport állatait 14 napon keresztül kezeltük a vivőanyaggal (10 % etanol oldat); a második csoport állatait pedig ugyancsak 14 napon keresztül kezeltük 5 mg/ttkg/nap dózisú rezveratrol oldattal. A harmadik csoport állatai 21 napon keresztül 10 %-os cukoroldatot kaptak és a 8-ik naptól kezdve vivőanyag kezelésben részesültek, míg a negyedik csoport állatai 21 napon keresztül 10 %-os cukoroldat kezelést kaptak és 8-ik naptól fogva 5 mg/ttkg rezveratrol kezelésben is részesültek. Az ötödik csoportban hasonló korú normál állatokat kezeltünk vivőanyaggal 21 napig.

C. Rezveratrol és γ -tokotrienol előkezelés:

A kísérletek kezdetén a 250-300 g tömegű hím Sprague-Dawley patkányokat négy csoportba osztottuk. Az első csoport állatait 15 napon át kezeltük orálisan vivőanyaggal majd újabb 15 napon át 2.5 mg/ttkg rezveratrollal. A második csoport állatai 30 napon át kaptak 0.3 mg/ttkg dózisban γ -tokotrienolt. A harmadik csoport állatait 30 napon keresztül kezeltük γ -tokotrienollal majd a 16-ik naptól rezveratrolt kezelésben részesültek. A negyedik csoport állatait vivőanyaggal kezeltük 30 napon át.

2. Izolált dolgozó patkány szív preparátum:

A kezeléseket követően az állatokat elaltattuk egy intraperitonealis nátrium pentobarbitál (60-80 mg/ttkg) injekcióval. Véralvadásgátlóként intravénás heparint alkalmaztunk 500 IU/ttkg dózisban. A heparin injekció után, thorakotómiát végeztünk és a szíveket jéghideg módosított Krebs-Henselite pufferbe helyeztük. Ezt követően az aortán keresztül kanuláltuk a szíveket és 10 percig perfundáltuk 100 vízcentiméteres nyomás mellett módosított KHB pufferrel nem dolgozó „Langendorff-módban”, hogy eltávolítsuk a vért. A 10 perc „mosási” periódus alatt a pulmonáris vénát kanuláltuk és a szíveket átkapcsoltuk „dolgozó” módba. A dolgozó módba történő kapcsoláskor elzártuk az aortás beáramlást és a pulmonáris véna felől perfundáltuk a szíveket 17 vízcentiméteres nyomással (előterhelés). Ezen periódus alatt átlagban 45-60 ml KH puffer távozott a szívből az aortán keresztül egy 100 vízcentiméteres nyomással szemben(109). A módosított Krebs-Henselite bikarbonát puffer összetétele 118 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, és 5 mM glükóz volt.

3. Az iszkémia kiváltása:

Az aerob perfúziót követően 30 perc teljes iszkémiát váltottunk ki a pulmonáris véna és az aorta felőli kanül elzárásával. Annak érdekében, hogy a szívizmot megvédjük a kiszáradástól az üvegedényt a kísérlet teljes ideje alatt befedtük, így tartva a kb. 90-100%-os páratartalmat. A 30 perc elteltével az aorta felőli kanül megnyitásával a szíveket 10 percig Langendorff-módban reperfundáltuk, annak érdekében, hogy kivédjük a reperfúzió-indukálta fatális kamrai fibrillációt. A 10 perc Langendorff reperfúziót követően a szíveket 110 percre dolgozó módba kapcsoltuk(109).

4. Bal kamrai funkciók mérése:

A kísérleteink során epikardiális elektrogrammot regisztráltunk két a szívhez közvetlenül kapcsolódó ezüst elektród segítségével. A kísérletek végén az EKG-t elemeztük, hogy meghatározzuk a kamrai fibrilláció (VF) illetve kamrai tachikardia (VT) előfordulási gyakoriságát a reperfúzió első 2 perce során. Amennyiben a VF vagy VT kialakult és két perc után a szív nem tért vissza spontán szinusz ritmusba, a szíveket elektromosan defibrilláltuk egy 1 másodperces 15 V-os négyszög impulzus segítségével. Az aerob perfúzió végén és a reperfúzió 30, 60 és 120-ik percében mértük a szívfunkciókat, úgymint aorta kiáramlás (AF), koronária átáramlás (CF), szív frekvencia (HR), kifejlődő bal kamrai nyomás (LVDP) és a kifejlődő bal kamrai nyomás idő szerinti első deriváltját (LVDP/dt) (ADinstruments, PoweLab, Castle Hill, Australia). A harmadik kísérletsorozatunknál a Gould P23XL pressure transducer (Gould Instrument Systems Inc., Valley View, OH, USA) rendszert használtunk(99). Az aorta kiáramlást egy kalibrált áramlásmérő segítségével mértük. A koronária átáramlást a koronáriákból kicsöpögő folyadék egy percig történő összegyűjtésével határoztuk meg.

5 a. Infarktusz terület meghatározása (meggyomag és a rezveratrol hatásainak vizsgálata során):

Miután a szíveket alávetettük a 30 perc teljes iszkémiának és a 120 perc reperfúzióknak, 25 ml 1%-os trifenil-tetrazólium klorid oldatot injektáltunk a szívekbe az aortán keresztül, majd a szíveket -70 °C-on tároltuk. A fagyott szíveket ezt követően merőlegesen az apiko-bazális tengelyre 2-3 mm szeletekre vágtuk, majd lemértük,

szárítottuk, tárgylemezek közé helyeztük és szkenneltük (HP Scanjet 5p). Ezt követően meghatároztuk az infarktusos terület nagyságát és kiszámítottuk az infarktusos terület tömegét. Az infarktus mértékét az infarktusos rész/teljes bal kamra tömeg x 100 képletből %-ban kaptuk meg(54).

5 b. Infarktusos terület meghatározása (a rezveratrol és γ -tokotrienol hatásainak vizsgálata során):

A 30 perc teljes iszkémia és a 120 perc reperfüzió után 40 ml 1%-os trifenil-tetrazólium klorid oldatot injektáltunk a szívekbe az aortán keresztül, majd a szíveket -70 °C-on tároltuk az analízis elvégzéséig. A fagyott szíveket merőlegesen az apiko-bazális tengelyre 0,8 mm nagyságú szeletekre vágtuk és 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd tárgylemezek közé helyeztük és szkenneltük (Microtek ScanMaker 600z). Ezt követően meghatároztuk infarktusos terület nagyságát és a teljes rizikó területet (esetünkben ez egyelő volt a metszet területével). Az infarktusos területet és a teljes terület nagyságának a hányadosa adta az infarktusos területet.

6 a. Apoptózis meghatározása meggyag és a rezveratrol hatásainak vizsgálata során:

A kísérletek végén a szíveket 4%-os formaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk, és 4 μ m szeleteket metszettünk le belőlük. A mintákat xilol és etanol oldattal deparaffinizáltuk. Az apoptotikus sejtek immunhisztokémiai detektálását TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) módszer segítségével végeztük. Ennek során a dioxigeninnel jelölt dUTP, dezoxinukleotidil-transzferáz segítségével beépül a DNS láncba. A beépített nukleotidot bárányban termeltetett, poliklonális anti-dioxigenin antitesttel inkubáltuk, majd nyúlban termeltetett FITC-kapcsolt, anti-bárány másodlagos antitesttel jelöltük.

A szeleteket háromszor mostuk foszfát pufferben, majd normál nyúl szérummal blokkoltuk. Ezt követően α -szarkomer aktin ellenes, egérben termeltetett monoklonális antitesttel inkubáltuk a mintákat, majd TRITC (tetramethyl rhodamin isocyanate) konjugálta egér IgG ellenes, nyúlban termeltetett antitestekkel történő inkubálást végeztünk (1:200). A metszeteket lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Kvantifikálás céljából meghatároztuk a TUNEL pozitív sejteket és ezt viszonyítottuk a teljes kardiomiocita populációhoz(54).

6 b. Apoptózis mértékének a meghatározása (a rezveratrol és γ -tokotrienol hatásainak vizsgálata során):

Az I/R végén a mintákat formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk be. A mintákból szeleteket vágunk és azokat tárgylemezre helyeztük. A szeletekből a parafint xilol oldattal távolítottuk el és a mintákat különböző koncentrációjú alkohol oldattal rehidratáltuk (abszolút, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %). Ezt követően az apoptózis mértéket TUNEL assay KIT (Promega, Madison, WI, USA) segítségével határoztuk meg. Ezen protokoll szerint fluoreszcein-12-dUTP építettünk be dezoxinukleotidil-transzferáz segítségével. Ezt követően propidium jodiddal festettük meg a sejtmagokat. A metszeteket fluoreszcens mikroszkóp (AXIOPLAN2 IMAGING) (Carl Zeiss Microimaging Inc., New York, NY, USA) segítségével vizsgáltuk 520±20 nm, és 620 nm-en. Az apoptotikus sejtek számát a totál kardiomiocita populációra vonatkoztattuk(70).

7. A kaszpáz-3 expresszió immunohisztokémás meghatározása:

A szívből úszó szeleteket vágatunk és inkubáltuk kecskében termeltetett kaszpáz-3 ellenes antitesttel (1:1000) 4°C-on, majd követően a metszeteket biotinilált nyúlban termeltetett kecske ellenes antitestet tartalmazó oldatba helyeztük (1:200) ötven percre szobahőmérsékleten. A szeleteket ez után négy órára szobahőmérsékleten avidin-biotinilált-peroxidáz (Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) komplexbe helyeztük 1:100 hígításban. A kísérleteket diaminobenzidin kromogén reakció zárta. A mintákat előtte 10 %-os normál kecske szérummal blokkoltuk. Az inkubálások ideje alatt a mintákat enyhén ráztuk, valamennyi antitestet 0,1 %-os Triton X-100-at tartalmazó 10 mM foszfát pufferrel hígítottunk. Az inkubálásokat követően a metszeteket zselatinnal borított tárgylemezre helyeztük és Permout semleges médiummal fedtük le(39, 40).

7. Western-blot:

Az I/R végén a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Ezt követően a mintákat egy polytron homogenizátor segítségével homogenizáltuk, a következő összetételű pufferben: 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM Na orthovanadát, 10 mM NaF, 10 mM pirofoszfát, 10 mM okadánsav, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF and 1x proteáz inhibitor koktél (Roche, Branford, CT USA). A homogenizáció után 2000 rpm sebességgel 10 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk a homogenizátumokat, majd a felülúszót további 20 percig centrifugáltuk 10000 rpm sebességgel $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A centrifugálást követően kapott felülúszót használtuk citoszol frakcióként. A mintákat ezután gyorsan lefagyasztottuk és felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fehérjék koncentrációját BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg, majd Laemmi oldatot adtunk a citoszol frakciókhoz, és 10 percig $95\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokra hevítettük. A mintákból $50\text{ }\mu\text{g}$ fehérjét SDS géltre vittünk fel és szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5% BSA oldattal 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk 1:1000 hígításban az elsődleges antitestekkel $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A membránokat ezt követően TBST pufferrel mostuk és szoba hőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk a tormaperoxidázal kapcsolt másodlagos antitestekkel, majd 3x5 percig mostuk és Western-blot luminol oldattal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk. Végül Kodak X-Omat filmeket exponáltunk a membránokkal a fehérjék detektálása céljából. A filmeket denzitometriás szkennelésnek vetettük alá, és a mennyiségi kontrollal szemben normalizáltuk.

9. Vércukor- és inzulin-szintmérés:

A szívek izolálása előtt az állatoktól vért vettünk. A vércukorszintet spektrofotometriásan határoztuk meg egy Glucose Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) segítségével a gyártó által javasolt protokoll szerint, 340 nm-es hullámhosszon. Hasonlóan a vércukor szint méréshez ugyanabból a mintából meghatároztuk az inzulin szintet is radioimmunoassay segítségével (LINCO Research, St. Charles, MO, USA).

10. Endotelin-szint mérése:

100 ml koronáris folyadékot gyűjtöttünk egy polisztirén konténerbe, majd EDTA-t és Triton X-100-at adtunk a mintákhoz (5 mM és 0,5 V/V végső koncentrációban), és ezt követően a mintákat -70 °C-on tároltuk a felhasználásukig. A vizsgált anyagokat ezt követően egy 3 ml metanollal és 5 ml vízzel kondicionált Sep-Pak C₁₈ „cartridge” vittük fel és 0,1 V/V%-os trifluoecetsavval 60 V/V %-osra hígított acetonitrillel elutáltuk. Az eluátumokat fagyasztva szárítottuk és -20 °C-on tároltuk a további radioimmunassay meghatározásig. A mintákat meghatározás előtt 0,5 ml assay pufferben oldottuk és 200 x-ra töményítettük(94). Az ET radioimmunoassay meghatározásához egy normál ET radioimmunoassay KIT-et használtunk a gyártó által előírtak szerint.

11. Konfokális mikroszkópia:

A kísérletek végén a szíveket 4%-os formaldehid oldatban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk és metszeteket készítettünk. A metszetek deparaffinizálását követően 10 mM nátrium citrát és 0,05%-os Tween 20 tartalmú pufferrel antigén feltárást végeztünk 90-95 °C-on 30 percig. A metszeteket ezt követően PBS pufferrel mostuk és Powerblock oldattal blokkoltuk 10 percig. A blokkolást követően ismét PBS pufferrel mostuk a metszeteket, majd 2 órán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitestet (1:50) tartalmazó oldattal, amely 1%-os BSA-t tartalmazó PBS puffer volt. Az inkubációs idő elteltével a metszeteket mostuk, majd 45 percen keresztül sötétben inkubáltuk a fluoreszcenciával kapcsolt másodlagos antitestet tartalmazó oldattal (1:1000). Ezt követően a sejtmagok festése érdekében 45 percig sötétben To-Pro 3 jodid (1:1000) oldattal inkubáltuk a metszeteket. A tárgylemezek mosását követően a mintákat fedőmédiával fedtük be. A metszeteket egy Zeiss LSM 510 (Thornwood, NY, USA) konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével 40 x nagyításon tanulmányoztuk.

12. Transzmissziós elektronmikroszkópos és fénymikroszkópos eljárások:

A 30 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően a minták egy részét 4 %-os glutáraldehid oldatban fixáltuk. A membránok kontrasztját 0,1 M cacodylate pufferben oldott ozmium-ferrocianáttal növeltük az utólagos fixáció során. Ezt követően a mintákat dehidratáltuk, és Epon 812-vel infiltráltuk és ágyztuk be 60 °C-on 48 órán át. A

fénymikroszkópos vizsgálatokhoz 1 μm vastagságú metszeteket festettünk meg 1 %-os toluidin kékkel. A vizsgálatokhoz Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments, Inc) mikroszkópot használtunk, s a képek rögzítéséhez egy CCD AxioCam Hrc Zeiss kamerát (Carl Zeiss Imaging solution GmbH, Németország) alkalmaztunk.

Az elektron mikroszkópos vizsgálatokhoz egy gyémántkés segítségével 60 nm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket formwarral borított rácokra vittük fel és 1%-os uranyl acetáttal és Reynold's ólom citráttal festettük. A mintákat egy Morgagni 286 típusú transzmissziós elektronmikroszkóp (FEI Company, Eindhoven, Hollandia) segítségével vizsgáltuk 60 kv-on. A digitális képeket egy MegaView III CCD kamerával rögzítettük (Olympus, Soft Imaging System GmbH, Németország).

13. Statisztika:

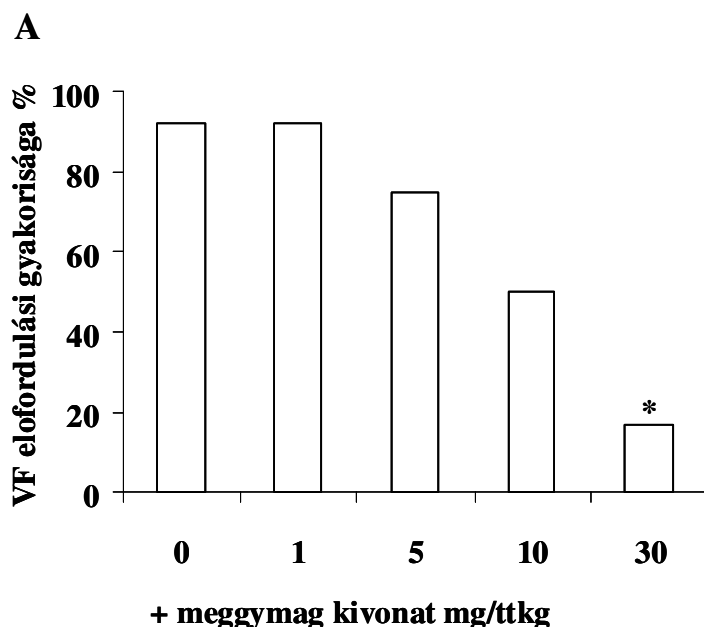
A szív funkciók (HR, AF, CF, LVDP) az infarktusos terület és az apoptózis értékeinek összehasonlításakor a számtani átlagot és a mintaközép hibáját adtuk meg. Először „kétutas” variancia tesztet végeztünk, hogy megtudjuk, van e különbség a különböző csoportok adatai között. Ha különbséget találtunk, a kezelt csoport adatait a kezeletlen kontroll csoport értékeihez hasonlítottuk Dunnett vagy módosított „t” tesztel. Mivel a VF és VT nem parametrikus elosztást követ, ezért e paraméterek összehasonlításakor khi-négyzet tesztet végeztünk a kezelt és a kontroll csoport értékei között. A változást szignifikánsnak tekintettünk, ha $p < 0,05$.

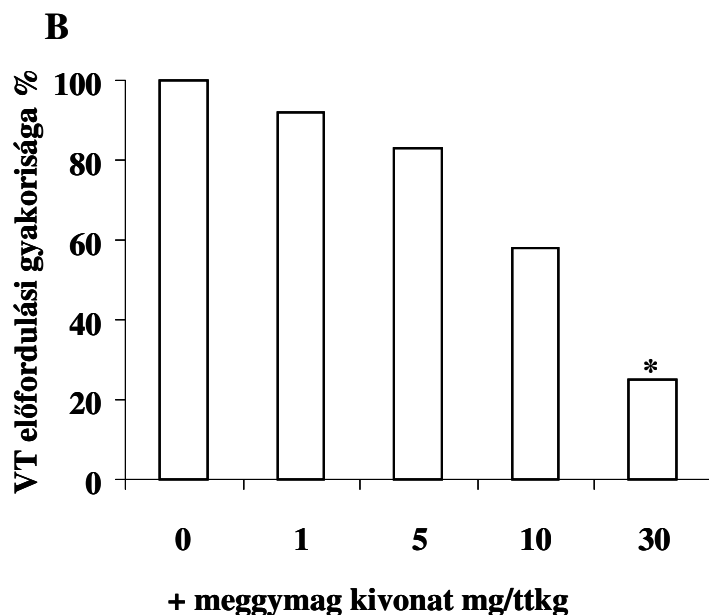
Eredmények:

I. A meggymag kivonat hatása iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben.

I a. A meggymag kezelés hatása a kamrai aritmiákra.

Először vizsgáltuk a meggymag kivonat hatását az I/R indukálta kamrai tachikardiák és fibrillációk kialakulására. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a meggymag kivonat 14 napos kezelést követően dózisfüggő módon csökkentette mind a VT mind a VF kialakulásának gyakoriságát (1. ábra) 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúziót követően. A kezeletlen kontroll szívek 92%-ban alakul ki fibrilláció I/R után és minden szívben kialakult VT. Az 1 mg/ttkg dózisú meggymag kivonattal kezelt csoportban hasonló eredményeket kaptunk, mint a kezeletlen kontroll csoportban. Mind az 5 mind a 10 mg/ttkg meggymag kivonattal kezelt csoportban csökkent a VF kialakulása (75% és 50% szemben a 92%-al) a kontroll csoporthoz képest, azonban ezek nem értek el a statisztikailag szignifikánsnak számító értéket. A legmagasabb 30 mg/ttkg meggymag kivonattal kezelt csoportban mind a VF mind a VT kialakulása jelentős mértékben csökkent a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (92% és 100%-ról 17% illetve 25%-ra).



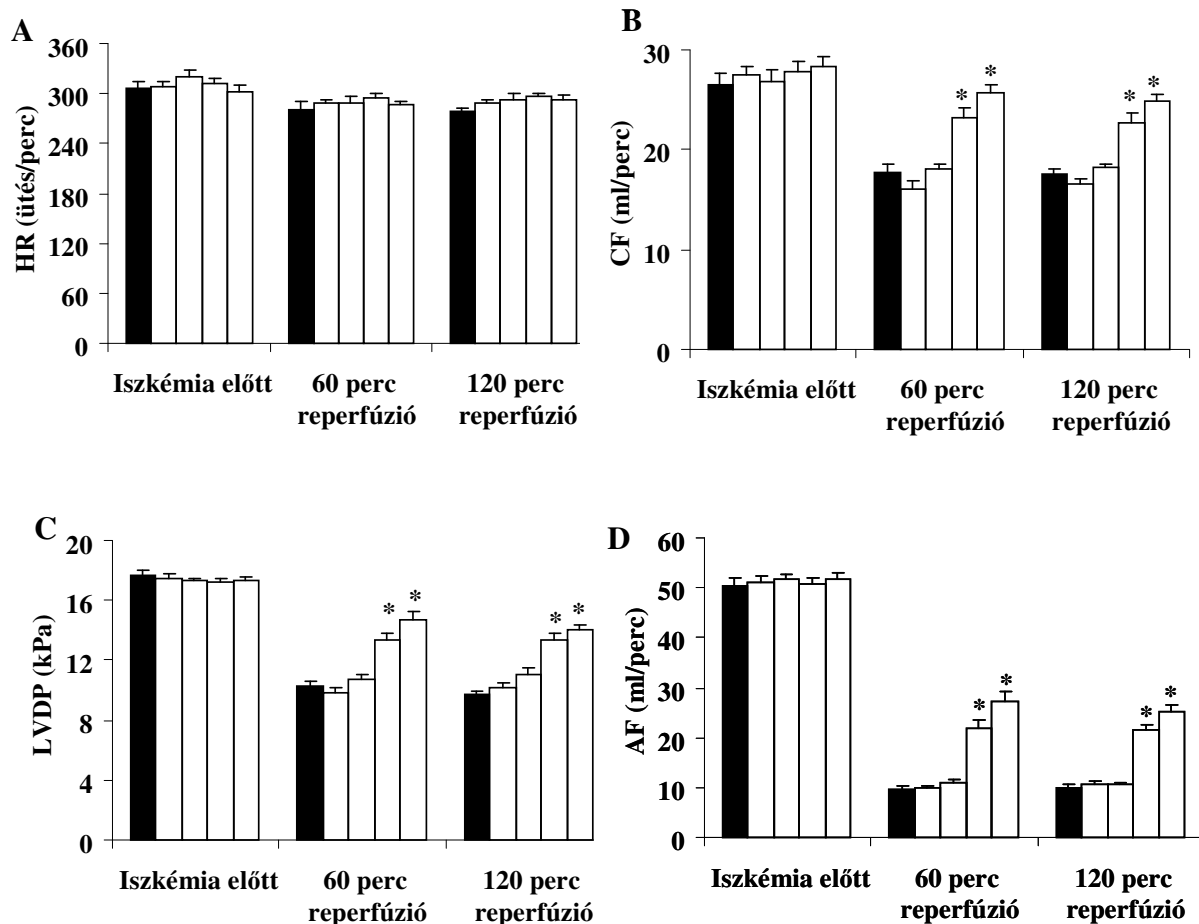


1. ábra. A meggymag kivonat hatása a kamrai aritmiák kialakulására. VF (kamrai fibrilláció) az „A” panel, VT (kamrai tachikardia) „B” panel.

(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

I b. A meggymag kivonat hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra.

Hasonlóan a kamrai aritmiák kialakulására gyakorolt hatáshoz, a meggymag kivonattal történő kezelés dózisfüggő módon javítja a poszt iszkémiás szívfunkciókat (2. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a 10 és 30 mg/ttg-os kezelés szignifikáns mértékben javította a posztisztkémiás bal kamrai funkciókat. Így az aorta kiáramlás például 120 perc reperfúzió után $9,8 \pm 0,8$ ml volt a kontroll csoportban, ezzel szemben $21,7 \pm 1,0$ ml illetve $25,3 \pm 1,3$ ml-re emelkedett a magasabb dózissal kezelt csoportokban. Hasonló változásokat tapasztaltunk a koronária átáramlás és a kifejlődő bal kamrai nyomás esetében is. A szívfrekvencia nem mutatott jelentős különbséget a csoportok között. A két alacsonyabb dózissal kezelt csoport egyikében sem találtunk jelentős különbséget a kezeletlen kontroll csoporthoz képest.

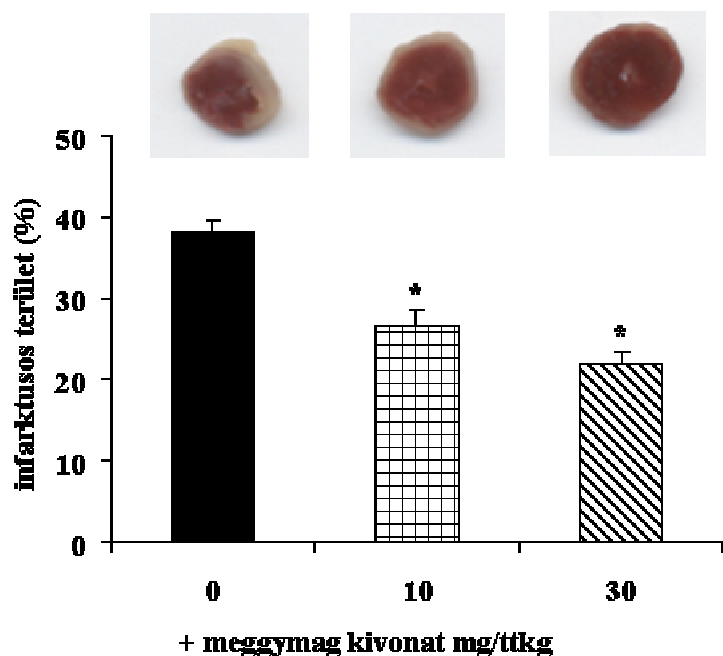


2. ábra. A meggymag kivonat kezelés hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra. „A” panel mutatja a szívfrekvenciát, „B” panelen a koronária áramlást látható, a „C” panelen a kifejlődő balkamrai nyomást a „D” panelen pedig az aorta kiáramlást ábrázoltuk. Az eredményeket a középérték \pm mintaközép hibájaként adtuk meg. (* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva) $n=6$.

I c. A meggymag kivonat előkezelés hatása az infarktusos terület nagyságára.

Az infarktusos terület nagyságát TTC módszer segítségével határoztuk meg. A kontroll csoportban az infarktusos terület $38,3 \pm 1,3\%$ -nak adódott, ehhez képest a 10

mg/ttkg-os meggy mag kivonat kezelés $26,5 \pm 2\%$, a 30 mg/ttkg-os kezelés pedig $21,8 \pm 1,8\%$ -ra csökkentette ezt az értéket, amely mindkét esetben statisztikailag szignifikánsnak számított. A két alacsonyabb dózissal kezelt állatok szívében nem csökkent jelentős mértékben az infarktusos terület nagysága (3. ábra).



3. ábra. A meggy mag kivonat kezelés hatása az infarktusos terület nagyságára. Az eredményeket a középérték \pm mintaközép hibájaként adtuk meg. $n=6$

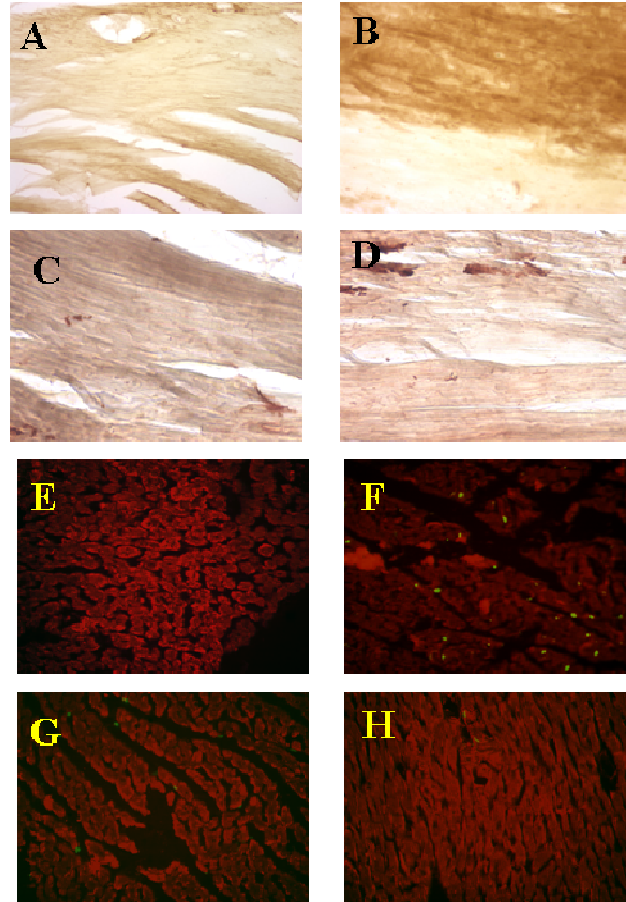
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

I d. A meggy mag kezelés hatása a kaszpáz-3 expresszióra és az apoptózisra.

Kísérleteink során meghatároztuk az apoptotikus sejtek számát. Amint az a 4. ábrán látható az I/R indukálta apoptózis csökkenthető meggy mag kivonattal. A nem iszkémiás csoportban az apoptotikus sejtek száma 1% alatt volt, mely 21% körüli értékre emelkedett a kezeletlen iszkémia-reperfundált kontroll csoportban, ehhez képest a 10 mg/ttkg meggy mag kivonattal kezelt csoportban ez az érték 12%-ra, míg a 30 mg/ttkg meggy mag-kivonattal kezelt csoportban 9%-ra csökkent, amely statisztikailag szignifikáns mértékű.

A kaszpáz-3 egy aszpartát specifikus cisztein proteáz, amely a sejtekben inaktív zimogén formában található meg. Az apoptózis kezdetén a prokaspáz-3 aktiválódik, az

aktív kaszpáz-3 ezt követően több fontos fehérjét aktivál. Vizsgálataink során kiderült, hogy a két magasabb dózisú meggymag kivonattal történő kezelés képes csökkenteni a kaszpáz-3 aktivitását, talán ez az egyik mechanizmus, amellyel a meggymag kivonata csökkenti az apoptózist és hozzájárul a védő hatásokhoz, melyet a meggymag kivonattal történő kezelést követően tapasztaltunk.



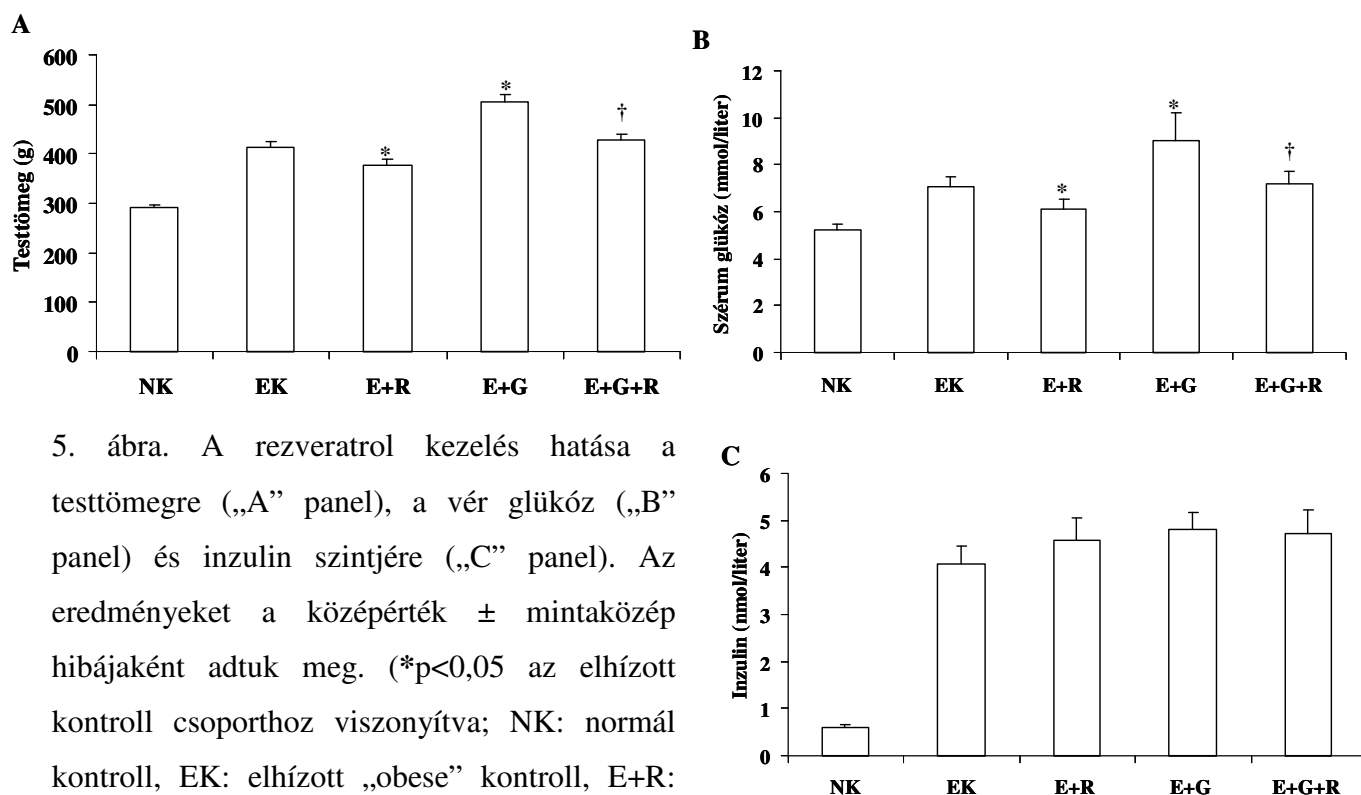
4. ábra. A meggymag kivonat kezelés hatása az infarktusz terület nagyságára és a kaszpáz-3 expresszióra. A-D: reprezentatív képek, amelyek a kaszpáz-3 expressziót mutatják, A: aerob kontroll, B: I/R kezeletlen kontroll, C – D: 10 – 30 mg/ttkg

meggymaggal kezelt I/R; E-H: reprezentatív képek, amelyek az apoptózisos sejteket mutatják zöld színben, E: aerob kontroll, F: I/R kezeletlen kontroll, G – H: 10 – 30 mg/ttkg meggymag kivonattal kezelt I/R. Az eredményeket a középérték \pm a mintaközép hibájaként adtuk meg. (* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

II. A rezveratrol hatása iszkémia/reperfundált „Zucker Obese” patkányok szívére.

II a. A rezveratrol kezelés hatása az állatok testtömegére, inzulin és vércukorszintjére.

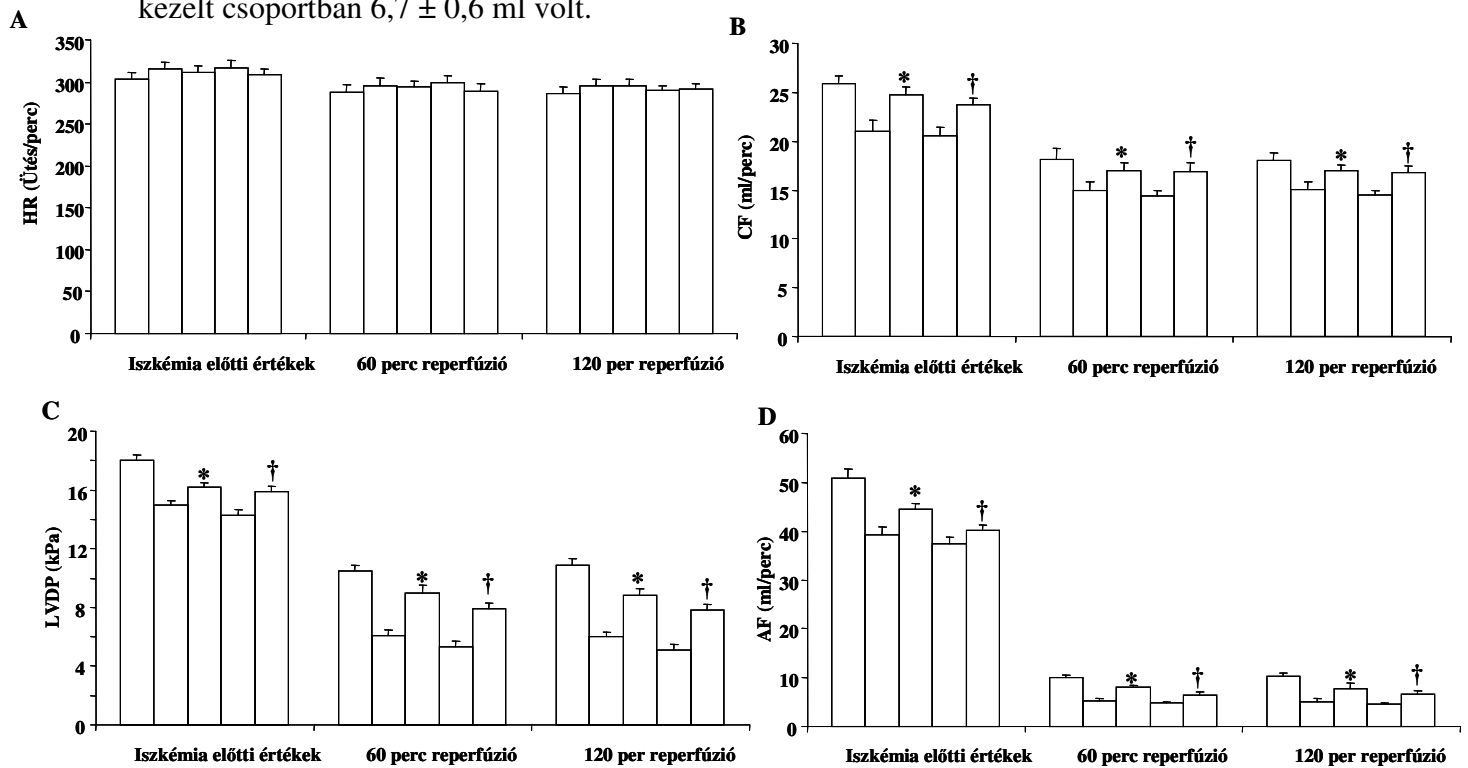
A kezeléseket követően vizsgáltuk az állatok testtömegét, vércukorszintjét, valamint a vér inzulinszintjét. Amint az az 5. ábrából kiderül 5 mg/ttkg rezveratrollal való kezelés szignifikánsan csökkentette az állatok testtömegét és vércukorszintjét 414 ± 10 g, $7,08 \pm 0,41$ mmol/l kontroll értékről 378 ± 12 g és $6,11 \pm 0,44$ mmol/l-re a kezelt csoportban. Hasonló változást tapasztaltunk a 10%-os cukoroldattal kezelt állatoknál, ahol a kontroll csoport testtömege 504 ± 16 g, míg a rezveratrollal kezelt állatok tömege 428 ± 11 g volt. A vércukorszint $9,02 \pm 1,20$ mmol/l volt a kontroll csoportban ezzel szemben csak $7,21 \pm 0,51$ mmol/l a rezveratrol kezelt csoportban. Az inzulin szint azonban nem csökkent jelentősen rezveratrol kezelés hatására.



5. ábra. A rezveratrol kezelés hatása a testtömegre („A” panel), a vér glükóz („B” panel) és inzulin szintjére („C” panel). Az eredményeket a középérték \pm mintaközép hibájaként adtuk meg. (* $p < 0,05$ az elhízott kontroll csoporthoz viszonyítva; NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; † $p < 0,05$ az elhízott glükózzal kezelt csoporthoz viszonyítva). $n=6$.

II b. A rezveratrol kezelés hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra.

A kezeléseket követően az állatok szívét izoláltuk és 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúzióknak vetettük alá, az eredményeket a 6. ábra mutatja. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a rezveratrol kezelés szignifikánsan javította a posztisztkémiás szívfunkciókat. Az aorta kiáramlás például 30 perc iszkémia és 120 reperfúzió után $5,1 \pm 0,6$ ml volt az elhízott kontroll csoportban, amely $7,8 \pm 1,0$ ml volt a rezveratrollal kezelt csoportban. Hasonló eredményeket kaptunk a külön cukorral is kezelt csoportokban, itt az aorta kiáramlás $4,5 \pm 0,4$ ml ezzel szemben a rezveratrollal kezelt csoportban $6,7 \pm 0,6$ ml volt.



6. ábra. a rezveratrol kezelés hatása a posztisztkémiás

szívfunkciókra. „A” panel szív frekvenciát, „B” panel

koronária átáramlást, „C” panel kifejlődő balkamrai nyomást,

„D” panel aorta kiáramlást mutatja. Az eredményeket a

középérték \pm mintaközép hibájaként adtuk meg. NK: normál kontroll, EK: elhízott

„obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz,

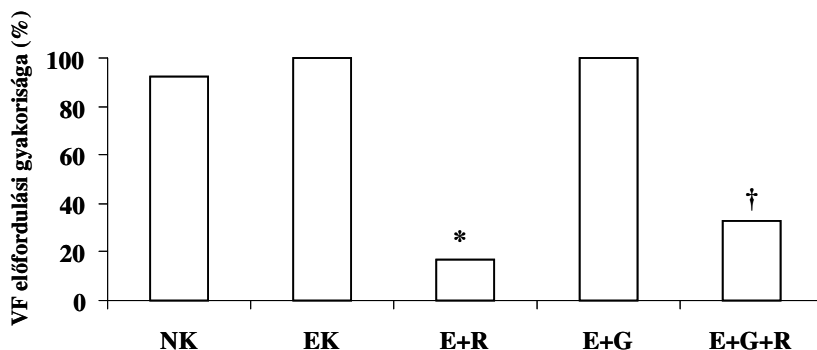
E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az elhízott kontroll csoporthoz

viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott glükózzal kezelt csoporthoz viszonyítva), $n=6$.

- Normál kontroll (NK)
- Elhízott kontroll (EK)
- Elhízott állatok+ 5 mg/ttkg rezveratrol (E+R)
- Elhízott állatok+ glükóz (E+G)
- Elhízott állatok+ glükóz+5 mg/ttkg rezveratrol (E+G+R)

II c. A rezveratrol hatása a kamrai aritmiákra.

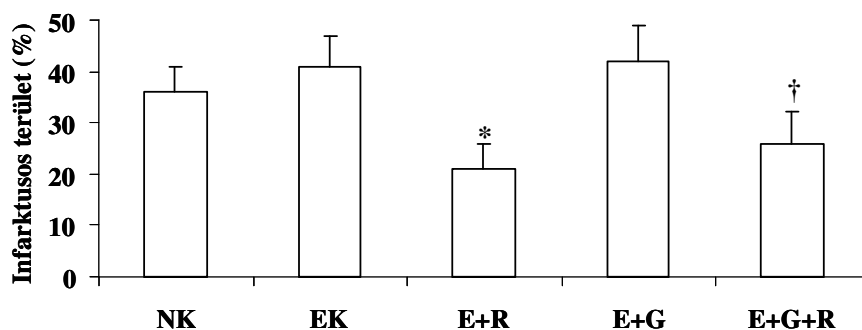
A 7. ábrán látható a VF előfordulásának a gyakorisága. Eredményeinkből kiderül, hogy a rezveratrol képes volt csökkenteni a VF kialakulását. Az elhízott kontroll csoport és a cukorral kezelt elhízott csoport állataiból izolált szívek mindegyikében kialakult VF, ehhez képest 5 mg/ttkg rezveratrol kezelés 17%-ra csökkentette, míg a cukorral kezelt csoportban 33%-ra csökkentette a VF kialakulását.



7. ábra. A rezveratrol kezelés hatása a kamra fibrilláció (VF) kialakulására. NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az elhízott kontroll csoporthoz viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott glükózzal kezelt csoporthoz viszonyítva). $n=12$.

II d. A rezveratrol hatása az infarktusos terület nagyságára.

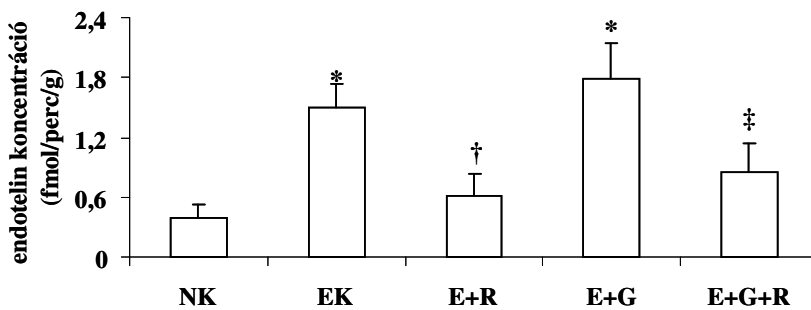
A kapott eredményekből kiderül, hogy a rezveratrol képes volt csökkenteni az infarktusos terület nagyságát. Az elhízott kontroll csoportban 41 ± 6 % a cukorral kezelt elhízott állatokban 42 ± 7 % volt, ehhez képest a rezveratrollal kezelt csoportokban 21 ± 5 %, a rezveratrollal és a cukorral is kezelt csoportban pedig 26 ± 6 % volt (8. ábra).



8. ábra. a rezveratrol kezelés hatása az infarktusz területre. Az eredményeket a középérték \pm a mintaközép hibájaként adtuk meg. NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az elhízott kontroll csoporthoz viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott glükózzal kezelt csoporthoz viszonyítva), $n=6$.

II e. A rezveratrol kezelés hatása az endotelin felszabadulásra.

Vizsgáltuk a koronária folyadékban az endotelin mennyiségét, s ez a normál kontroll állatokban $0,39 \pm 0,13$ fmol/perc/g volt, mely jelentősen megemelkedett az elhízott állatok koronária folyadékában ($1,49 \pm 0,25$ fmol/perc/g), ehhez képest is tovább emelkedett a cukor oldattal kezelt állatok koronária folyadékában ($1,79 \pm 0,35$ fmol/perc/g). Az 5 mg/ttkg rezveratrol kezelés szignifikánsan csökkentette az elhízott állatok koronáriáiban a felszabaduló endotelin mennyiségét. Hasonlóan csökkentette a cukor oldattal kezelt elhízott állatok szívében is (9. ábra).



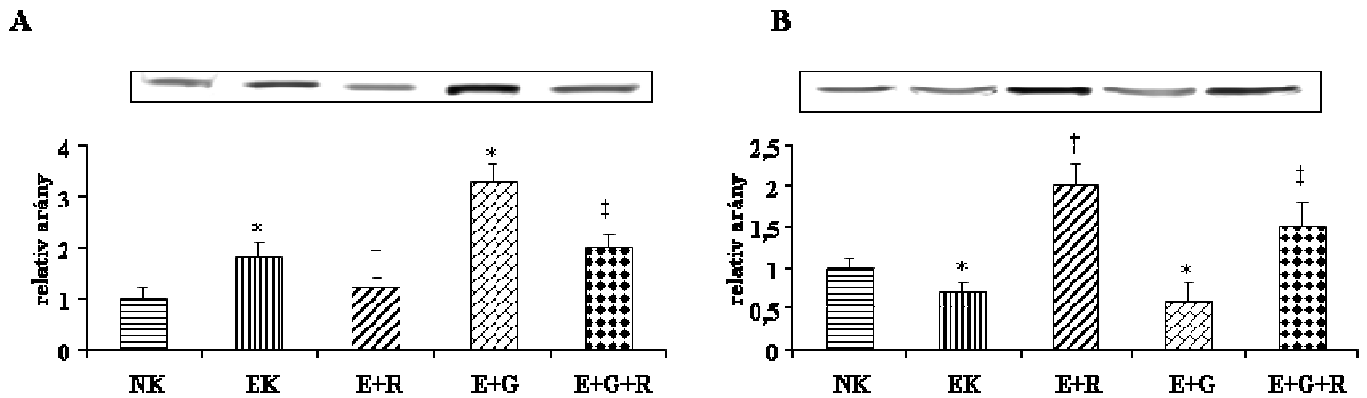
9. ábra. A rezveratrol kezelés hatása az endotelin felszabadulásra. NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az normál kontroll csoporthoz viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott kontrollhoz viszonyítva; ‡ $p < 0,05$ az elhízott kontrollhoz viszonyítva). $n=6$

II f. A rezveratrol kezelés hatása az ET-1 és a Glut-4 expresszióra.

A felszabaduló endotelin mennyiségének meghatározása után vizsgáltuk a különböző csoportból származó szívekben az ET-1 és a Glut-4 fehérjék expresszióját. A

10/A ábrán látható az ET-1 fehérje jelentős emelkedést mutatott az elhízott állatok szívében a normál állatokhoz képest, amely tovább emelkedett a cukorral kezelt állatok szívében. Rezveratrol kezelés jelentősen képes volt csökkenteni az ET-1 fehérje szintjét mindkét kezelt csoportban.

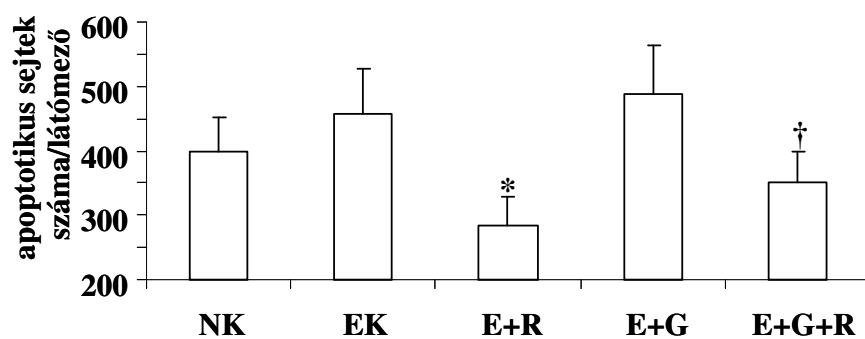
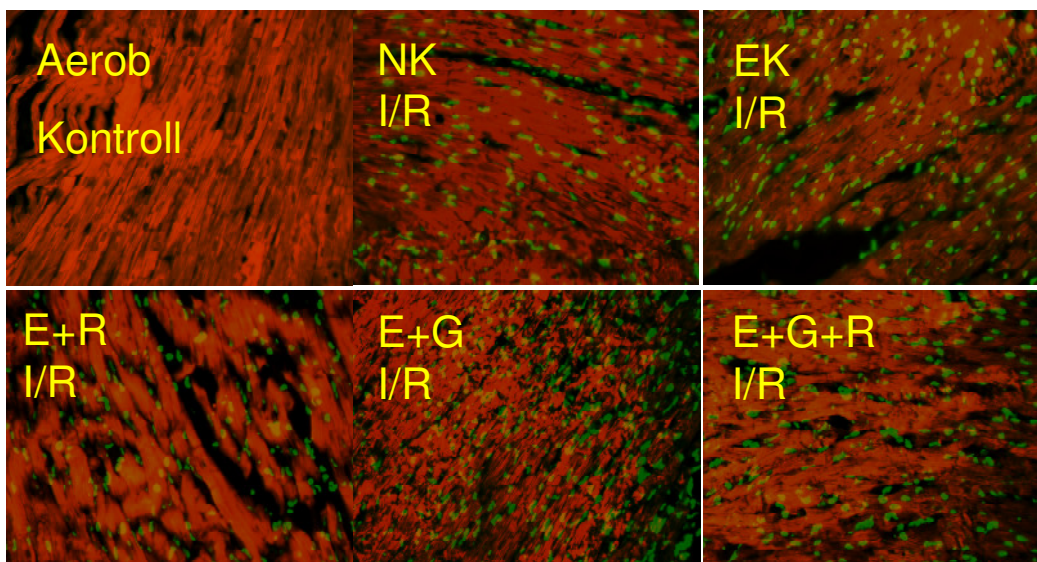
Ellentétben az ET-1 fehérjével az elhízott állatok szívében a Glut-4 fehérje szintje csökkent és a külön cukorterhelés ezt tovább csökkentette, a rezveratrol kezelés megfordította ezt a tendenciát (10/B. ábra).



10. ábra. Rezveratrol kezelés hatása az endothelin-1 fehérje expressziójára („A” panel), és a Glut-4 fehérje expressziójára („B” panel). NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az normál kontroll csoporthoz viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott kontrollhoz viszonyítva; ‡ $p < 0,05$ az elhízott + glükózzal kezelt csoporthoz viszonyítva). $n=6$.

II g. A rezveratrol kezelés hatása az apoptózisra.

Az aerob kontrollban csak elvétve detektáltunk apoptotikus sejteket, az iszkémia/reperfúzió minden szívben indukálta a sejtek apoptotikus elhalását. Az elhízott kontroll állatokban ez az érték magasabb volt, mint a normál kontroll I/R csoportban, amelyet a cukorterhelés még tovább fokozott. A rezveratrol kezelés szignifikánsan csökkentette az apoptotikus sejtek mennyiségét mind az elhízott mind a glükózzal kezelt elhízott csoportban (11. ábra).



11. ábra. a rezveratrol kezelés hatása az apoptózisra. Az eredményeket a középérték \pm a mintaközép hibájaként adtuk meg. NK: normál kontroll, EK: elhízott „obese” kontroll, E+R: elhízott állatok + rezveratrol, E+G: elhízott állatok + glükóz, E+G+R: elhízott állatok + glükóz+ rezveratrol; (* $p < 0,05$ az normál kontroll csoporthoz viszonyítva; † $p < 0,05$ az elhízott kontrollhoz viszonyítva). $n=6$.

III. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol hatása az I/R indukálta károsodásokkal szemben.

III a. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére.

Amint az 1. táblázat mutatja mind a rezveratrol mind a γ -tokotrienol jelentősen javította a posztisztkémiás szívfunkciókat a vivőanyaggal kezelt kontroll csoporthoz képest. Amikor mindkét hatóanyaggal kezeltük az állatokat további javulást tapasztaltunk a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésében. Az aorta kiáramlás például 120 perc reperfüzió után $7,8 \pm 1,7$ ml volt a kontroll csoportban, ezzel szemben a rezveratrollal kezelt csoportban $22,2 \pm 1,0$ ml, a γ -tokotrienollal kezelt csoportban $21,2 \pm 0,9$ ml és a rezveratrollal és γ -tokotrienollal kezelt csoportban $27,1 \pm 0,7$ ml volt. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevésünket miszerint ez a két természetes hatóanyag rendelkezik bizonyos szinergista hatással.

Az 2. táblázatban tüntettük fel a Wortmanninal (PI3-kináz inhibitor) és a 3-metiladeninnel (autofágia inhibitor) történő kezelés eredményeit. Összességében elmondhatjuk, hogy mind a két blokkoló jelentősen csökkentette a rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol kezelés hatásait. Megjegyzendő azonban, hogy az általunk használt körülmények között a Wortmannin által kifejtett blokkoló hatás erősebbnek bizonyult, mint a 3-metiladenin hatása.

	Iszkémia előtti értékek				A reperfüzió 60. percében mért értékek				A reperfüzió 120. percében mért értékek			
	CF	AF	LVDP	LVdP/dt	CF	AF	LVDP	LVdP/dt	CF	AF	LVDP	LVdP/dt
kontroll	24,00±0,53	50,7±1,3	115,0±2	3133±59	20,83±0,42	21,8±1,9	81,7±3,7	1892±39	19,5±0,48	7,8±1,7	55,5±4,3	1118±47
rezveratrol	24,75±0,73	52,6±1,5	114,8±1,7	3292±66	22,45±0,54	34,3±1,4*	101±4*	2358±42*	21,58±0,37	22,2±1 [†]	86,7±3,2*	1702±60 [†]
γ -tokotrienol	25,42±0,55	50,4±1	116,1±1,8	3227±81	22,58±0,71	30,6±0,8 [†]	99±2,8*	2221±87 [†]	21,5±0,67	21,2±0,9 [†]	84,8±2,7*	1652±58 [†]
rezveratrol+ γ -tokotrienol	25,57±0,44	54,7±1,2	118,6±1,6	3471±65	23,87±0,46	36,7±0,8*	105,3±3,1*	2576±58*	21,75±0,51*	27,1±0,7*	95,5±3,6*	1954±69*

1. táblázat. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra. Az eredményeket a középérték \pm mintaközép hibájaként adtuk meg. n=6; CF= koronária átáramlás, AF= aorta kiáramlás, LVDP= bal kamra kifejlődő nyomás, LVdP/dt= a kifejlődő bal kamrai nyomás maximális első deriváltja. * p<0.05. vs. kontroll; † p<0.05 vs. rezveratrol+ γ -tokotrienol.

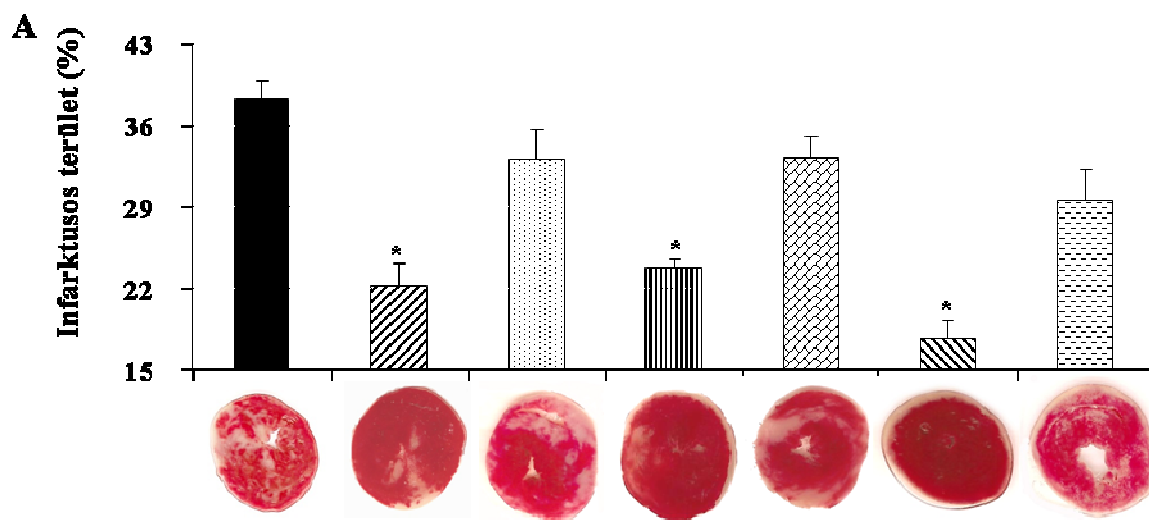
	Iszkémia előtti értékek				A reperfúzió 60. percében mért értékek				A reperfúzió 120. percében mért értékek			
	CF	AF	LVDP	LVdP/dt	CF	AF	LVDP	LVdP/dt	CF	AF	LVDP	LVdP/dt
rezveratrol	24,75±0,73	52,6±1,5	114,8±1,7	3292±66	22,45±0,54	34,3±1,4*	101±4*	2358±42	21,58±0,3	22,2±1	86,7±3,2	1702±60
rezveratrol + Wortmannin	24±0,63	52,0±1,2	122,5±2,1	3325±69	19,08±0,42 [†]	17,3±1,1*	81,5±2,1 [†]	1877±50*	17,83±0,4 [†]	6,7±0,5 [†]	63,3±2,6 [†]	1317±37 [†]
rezveratrol + 3MA	25,08±0,49	51,5±0,9	115,7±2,3	3347±111	22,25±0,51	24,2±3,1*	94,8±2,8	2167±117	20,5±0,6	10,7±1,2*	75,2±3,2*	1539±51
γ-tokotrienol	25,42±0,55	50,4±1	116,1±1,8	3227±81	22,58±0,71	30,6±0,8	99±2,8	2221±87	21,5±0,67	21,2±0,9	84,8±2,7	1652±58
γ-tokotrienol + Wortmannin	24,08±0,44	50,1±1,2	111,5±2,1	3354±39	18,83±0,44*	15,2±1*	83,2±2,2*	1596±58 [†]	17,17±0,4	6,5±0,4*	60,7±2,7*	1161±48 [†]
γ-tokotrienol + 3MA	24,5±0,44	49,8±0,6	116±3,1	3249±80	22,17±1,01	18,8±1,4*	90,7±4,1	1999±114	20,5±1,38	9,3±1,3*	67,7±3,2*	1376±62*
rezveratrol+ γ-tokotrienol	25,57±0,44	54,7±1,2	118,6±1,6	3471±65	23,87±0,46	36,7±0,8	105,3±3,1	2576±58	21,75±0,5	27,1±0,7	95,5±3,6	1954±69
rezveratrol+ γ-tokotrienol+ Wortmannin	24,42±0,43	52,5±1,8	113,5±1,8	3274±87	18,67±0,56 [†]	20,1±1 [†]	88,7±2,3	1992±52*	17,58±0,5	9±0,9 [†]	67±3,1	1344±53 [†]
rezveratrol+ γ-tokotrienol+ 3MA	24,67±0,36	51,5±0,8	115,2±2	3400±92	21,83±0,54*	24,9±1,3*	94±2,2	2198±88*	20,08±0,5	14,5±1,1*	76±3,2	1577±47*

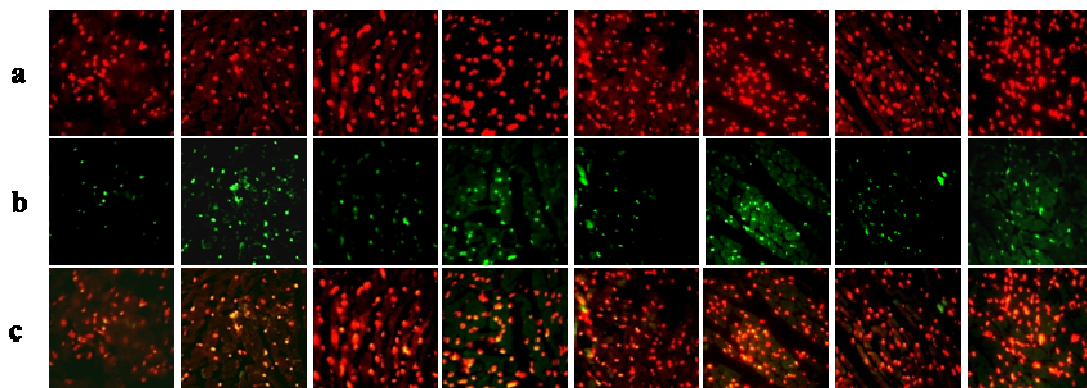
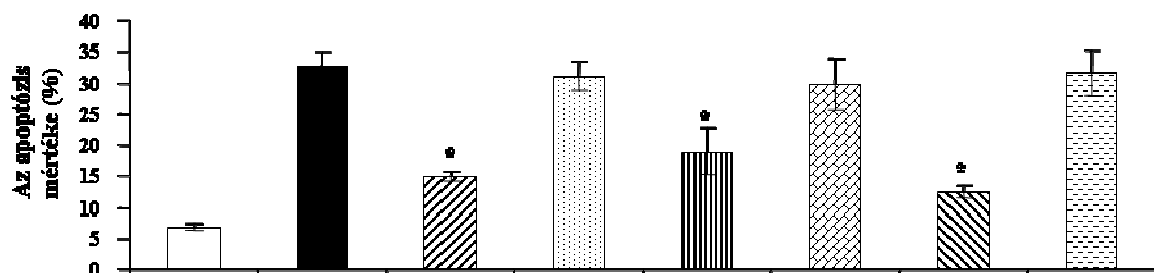
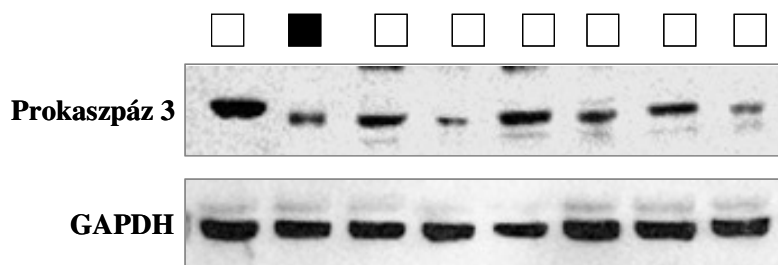
2. táblázat. A Wortmannin és 3-metiladenin hatása rezveratrol és/vagy γ-tokotrienollal kezelt állatok szívfunkcióira. Az eredményeket a középérték ± mintaközép hibájaként adtuk meg. n=6; CF= koronária átáramlás, AF= aorta kiáramlás, LVDP= bal kamra kifejlődő nyomás, LVdP/dt= a kifejlődő bal kamrai nyomás maximális első deriváltja. * p<0,05. A blokkoló nélküli csoportok vs. a blokkolókkal kezelt csoportok; † p<0,05 a Wortmanninnal kezelt csoportok vs. 3-metiladeninnel kezelt csoportok.

III b. A rezveratrol és/vagy γ-tokotrienol hatása az infarktusz területre és az apoptózisra.

Hasonlóan a szívfunkciók alakulásához az infarktusz területek vizsgálatából kiderült, hogy mind a rezveratrol mind a γ-tokotrienol jelentősen csökkentette az infarktusz terület nagyságát, valamint a két komponens kombinált adagolását követően további csökkenést tapasztaltunk az infarktusz terület kiterjedésében, azonban ez nem volt statisztikailag szignifikáns. A rezveratrollal kezelt csoportban $22,2 \pm 1,9$ %, a γ-tokotrienollal kezelt csoportban $23,7 \pm 0,8$ %, a biterápiás csoportban $17,7 \pm 1,4$ % volt szemben a kontroll csoporttal ahol az infarktusz terület $38,2 \pm 1,5$ % volt. A Wortmanninnal történő kezelés mindhárom kezelt csoportban ellensúlyozta a kardioprotektív hatásokat (12/A ábra).

Hasonló eredményeket kaptunk az apoptotikus sejtek vizsgálatakor is. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét monoterápia és a kettős kezelés is jelentősen csökkentette az apoptotikus sejtek számát, bár a kombinált kezelésekkel elért hatás itt sem bizonyult statisztikailag jelentősnek a monoterápiás eredményekhez viszonyítva (12/B ábra). Összhangban a TUNEL assay eredményeivel, a prokaspáz-3 szintje magasabb volt a kezelt csoportokban iszkémia/reperfúziót követően, mint a kezeletlen kontroll csoportban, ezzel szemben a Wortmanninnal kezelt csoportban alacsonyabb prokaspáz-3 szintet és magasabb apoptózist detektáltunk, ami arra utal, hogy a kezelt csoportokban a prokaspáz-3 nem aktiválódik és alakul át aktív kaspáz-3-má (12/C ábra).



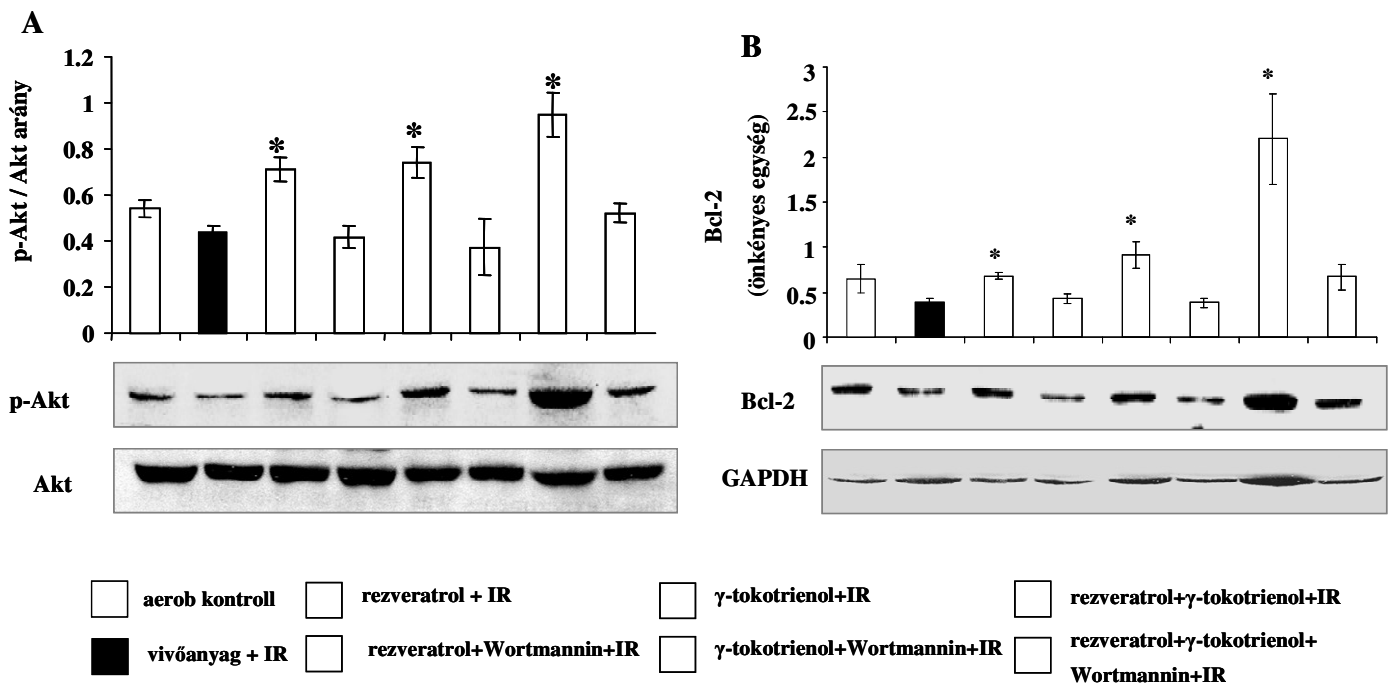
B**C**

aerob kontroll rezveratrol + IR γ-tokotrienol+IR rezveratrol+γ-tokotrienol+IR
 vivőanyag + IR rezveratrol+Wortmannin+IR γ-tokotrienol+Wortmannin+IR rezveratrol+γ-tokotrienol+Wortmannin+IR

12. ábra. Az infarktusos terület TTC- módszerrel határoztuk meg. Az ábra „A” része mutatja a rezveratrol és/vagy γ-tokotrienol hatásait az infarktusos terület nagyságára. Az ábra „B” része szemlélteti az apoptózis mértékét amelyet TUNEL assayvel határoztunk meg. Az „a” sorban a teljes kardiomiocita populáció, a „b” sorban a TUNEL pozitív sejtek, a „c” sorban pedig a kettőből összeállított reprezentatív képek láthatóak. Az ábra „C” részén egy reprezentatív Western-blot kép látható a prokaspáz-3 fehérjéről, mennyiségi kontrollként GAPDH-t használtunk. Az eredményeket a középérték ± mintaközép hibájaként adtuk meg. * $p < 0,05$. vs. vivőanyag+I/R; n=3.

III c. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol hatása a „túlélési” útvonalakra.

A „túlélési” útvonalak monitorozása céljából vizsgáltuk a p-Akt/Akt arányát valamint Bcl-2 fehérje szintjét. Amint az a 13. ábrán látható a rezveratrollal és a γ -tokotrienollal kezelt állatok szívében a p-Akt/Akt arány és a Bcl-2 fehérje szintje jelentősen megemelkedett a kontroll csoporthoz képest, további jelentős emelkedést tapasztaltunk a rezveratrollal és γ -tokotrienollal is kezelt állatok szívszövetében. A Wortmanninnal kezelt állatok szívében Bcl-2 és a p-Akt/Akt arány a kontroll csoportéhoz állt közelebb.



13. ábra. Western-blot analízis a p-Akt, Akt („A” panel) és Bcl-2 fehérjéről („B” panel), mennyiségi kontrollként GAPDH volt használva. * $p < 0,05$. vs. vivőanyag+I/R; $n=3$.

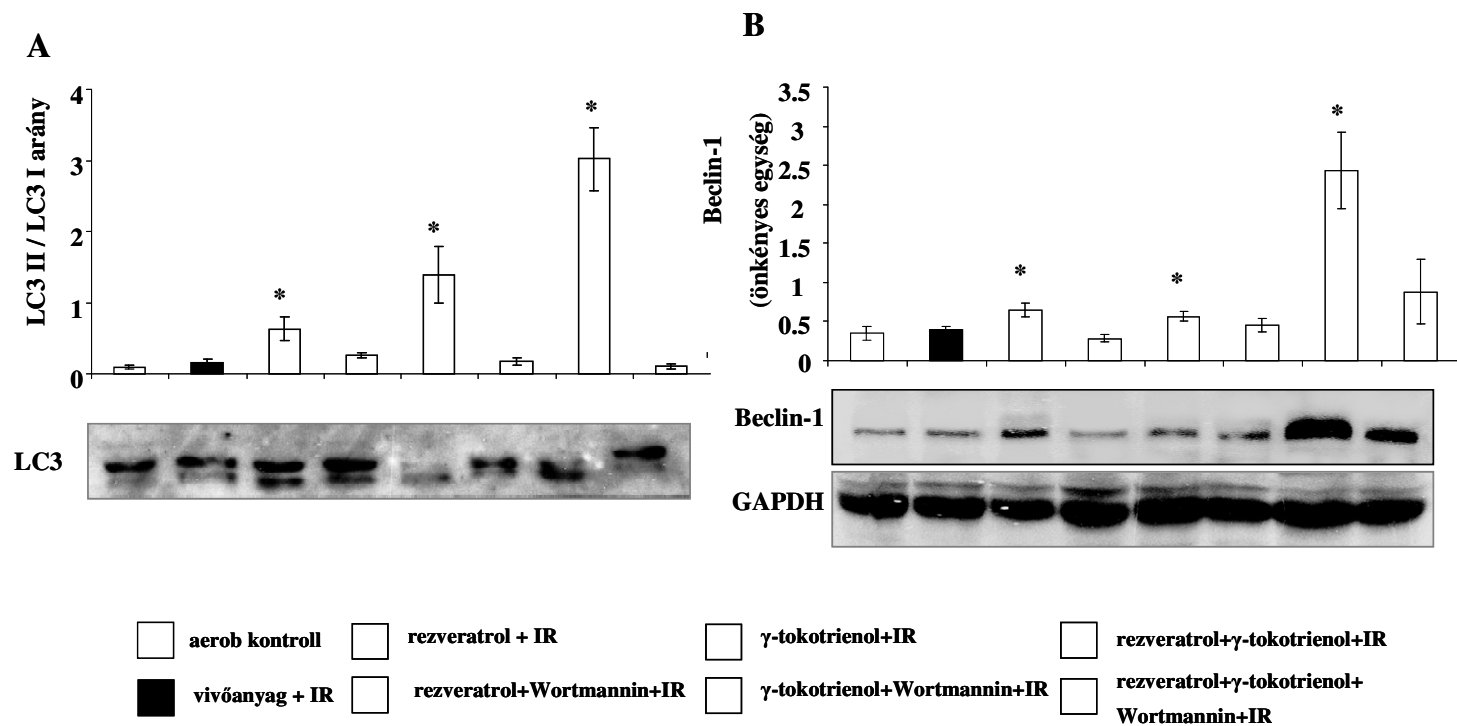
III d. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol hatása az autofágiára.

Tanulmányunkban vizsgáltuk, hogy a két növényi hatóanyag képes-e az autofágia indukálására, és ez szerepet játszik-e a hatóanyagok kardioprotektív hatásaiban. Először

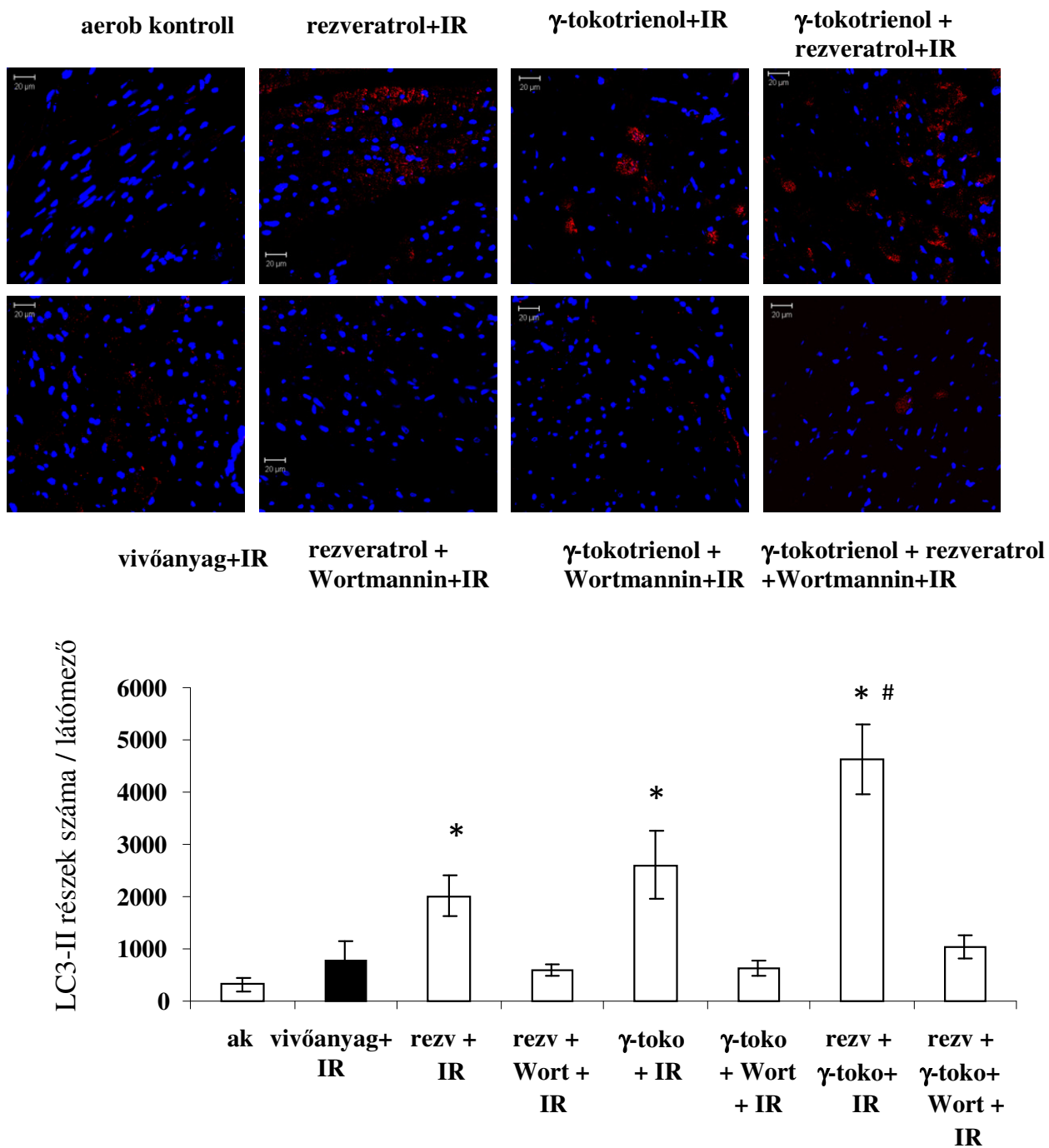
Western-blot segítségével tanulmányoztuk a Beclin-1 fehérje szintjét és az LC3II/LC3I arányát. A vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban I/R-t követően kismértékű emelkedést tapasztaltunk a Beclin-1 és az LC3II/LC3I arányban. Az eredmény jól korrelál az irodalommal, mely szerint az I/R fokozza az autofágiát. A két monoterápiás csoportban további jelentős emelkedést tapasztaltunk az I/R kontrollhoz képest. A rezveratrollal és γ -tokotrienollal kezelt csoportban az LC3II/LC3I aránya és a Beclin-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a két monoterápiás csoporthoz viszonyítva. Hasonlóan a „túlélési” szignál fehérjéihez, a Wortmannin csökkentette az autofágiás markerek szintjét (14. ábra). Ezt követően immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk az LC3II pozitív sejtek számát. Hasonlóan a Western-blot eredményekhez, enyhén növekedett számú LC3II pozitív sejtet figyeltünk meg a kontroll I/R csoportban. Mind a két hatóanyaggal történő kezelés jelentősen növelte az LC3II pozitív sejtek számát. A Wortmannin kezelés, hasonlóan a Western-blot eredményekhez, csökkentette az LC3II pozitív sejtek számát (15. ábra), valamennyi kezelt csoportból származó mintában.

A mintákat fénymikroszkóp segítségével is vizsgáltuk. Valamennyi kezelt csoportból származó mintában közel normál ultrastruktúrát találtunk, kevés degeneratív változással, ezzel szemben a 3-metiladeninnel kezelt állatok szívében ahol, onkotikus elváltozásokat figyeltünk meg miofibrilláris kontrakciós sávokkal és vakouláris degradációval (16. ábra).

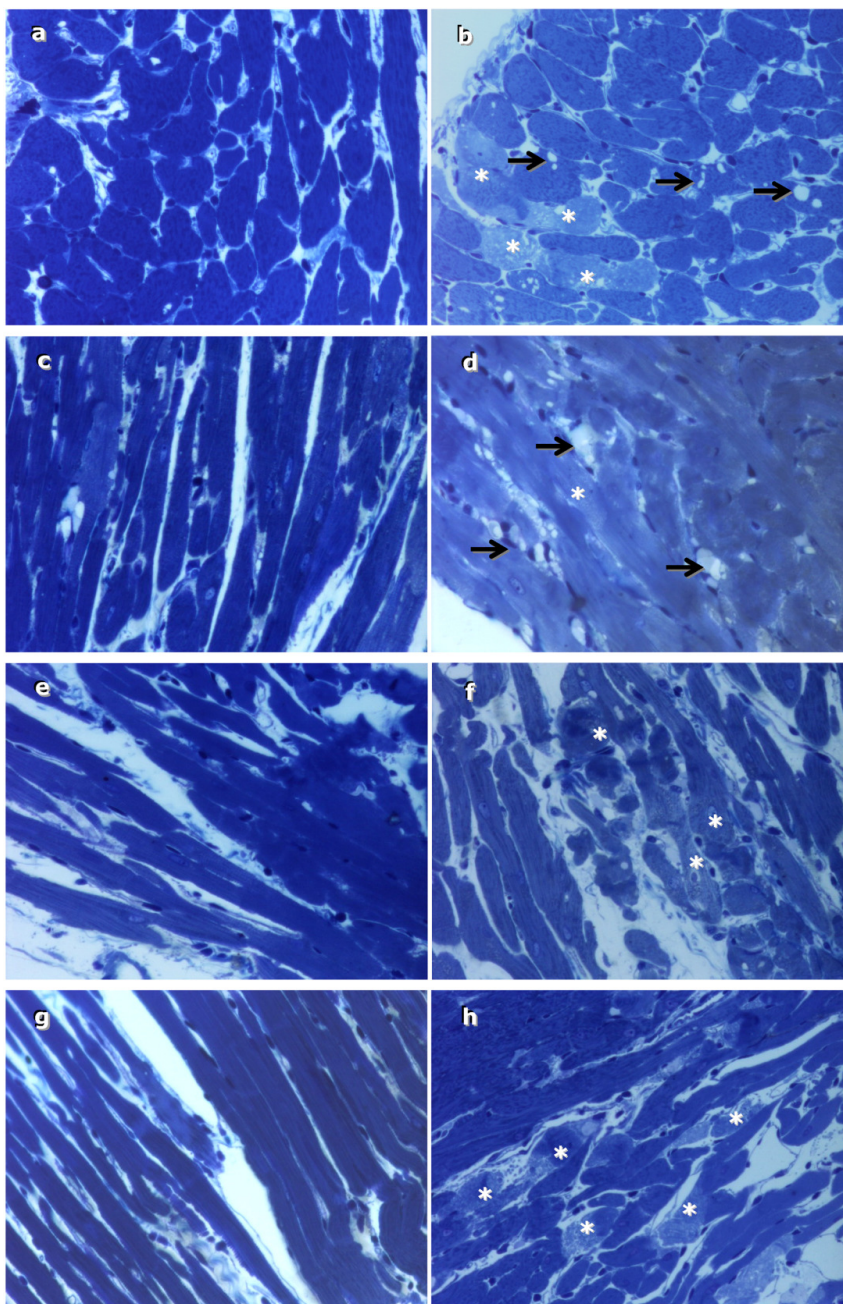
Az autofagoszómák feltérképezéséhez transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk. Az aerob kontroll szívek normál morfológiát mutattak eltérések nélkül, az I/R kontroll szívekben onkotikus elváltozásokat találtunk, úgy mint az izomrostok dezorganizációját, a mitokondriumok felfúvódását, és lízis folyamatokat. Mindkét esetben kevés kisméretű autofagoszómát figyeltünk meg. Valamennyi kezelt mintában közel normális ultrastruktúrát találtunk és számos különböző érési fázisban lévő autofagoszómát detektáltunk. A 3-metiladeninnel kezelt szívekben kevés apró autofagoszómát figyeltünk meg, de az ultrastruktúrában iszkémiás változásokat tapasztaltunk (17. ábra).



14. ábra. Western-blot analízis az LC3 és Belcin- 1 fehérjékről, mennyiségi kontrollként GAPDH-t használtunk. * $p < 0.05$. vs. vivóanyag+I/R; $n=3$.



15. ábra. Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek. Az LC3II pozitív sejtek pirossal vannak jelölve, a sejtmagok pedig kéken.



16. ábra. Fénymikroszkópos képek az Eponba ágyazott és toluidin késsel megfestett ultravékony metszetekről. a: aerob kontroll; b: I/R; c: rezveratrol I/R; d: rezveratrol + 3 MA I/R; e: γ -tokotrienol I/R; f: γ -tokotrienol + 3 MA I/R; g: rezveratrol + γ -tokotrienol I/R; h: rezveratrol + γ -tokotrienol + 3 MA I/R. Az a, c, e, g képeken majdnem teljesen normál ultraszerkezet látható. A b,d,f,h képeken a szívizomsejtek onkotikus változásai láthatóak, a jellemző nekrotikus kontrakciós sávokat (*) jelölik, a vakuoláris degenerációt pedig a nyilak mutatják.

17 Ábra. Transzmissziós elektronmikroszkópos képek:

a, aerob kontroll: sejtek szerkezete normál struktúrát mutatnak, néhány autofagoszóma látható, amit a nyíl mutat.

b, iszkémiás kontroll: a sejtekben iszkémiás léziók figyelhetők meg a miofilamentumok szétesését a * mutatja, a duzzadt mitokondriumokat a nyílhegy jelöli.

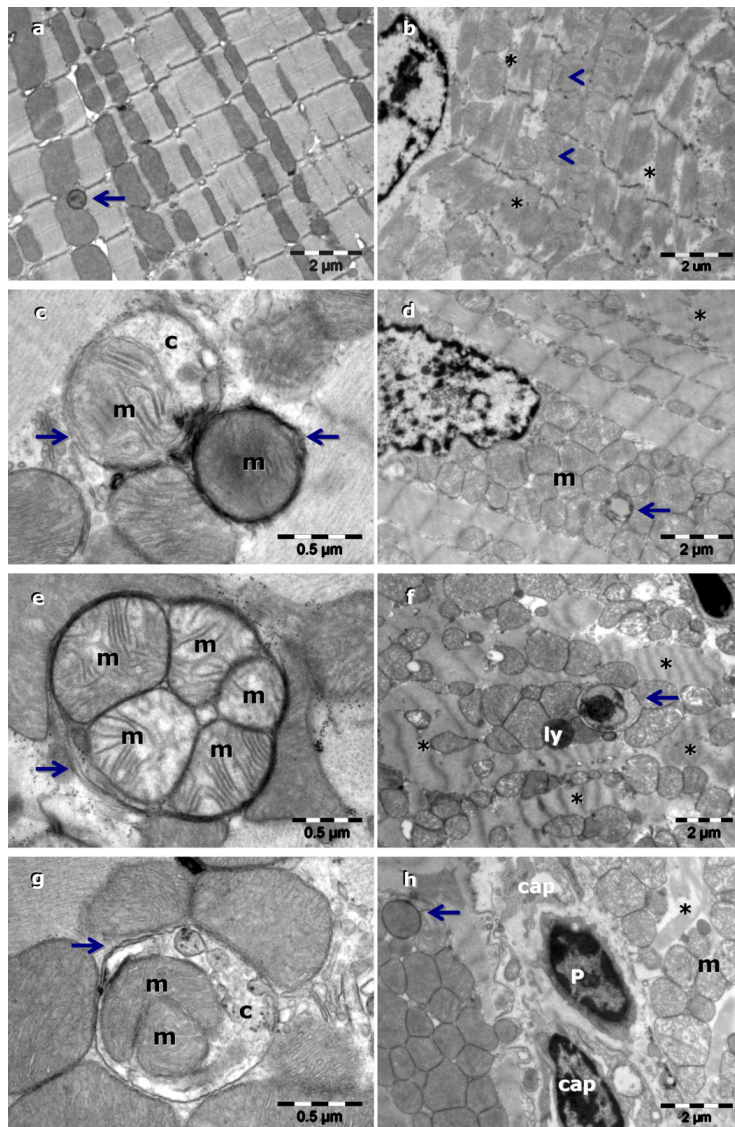
c, rezveratrol I/R: A képen két korai autofagoszóma látható amely mitokondriumot (m) és kis mennyiségű citoplazmát (c) tartalmaz. A kettős membránban a nyíl mutatja.

d, rezveratrol + 3 MA I/R: a sejtekben felfúvódott mitokondriumok figyelhetők meg, a miofilamentumok részleges elvesztése látható a *-gal jelölt részen és a nyíl egy apró autofagoszómát mutat.

e, γ -tokotrienol I/R: a képen egy kettős membránnal (nyíl) határolt korai autofagoszóma látható, amely öt mitokondriumot (m) tartalmaz .

f, γ -tokotrienol + 3 MA I/R: onkotikus változást mutató kardiomiociták láthatóak kondenz szarkomerrel (*), egy lizoszóma (ly) és egy autofagoszóma (nyíl) is megfigyelhető.

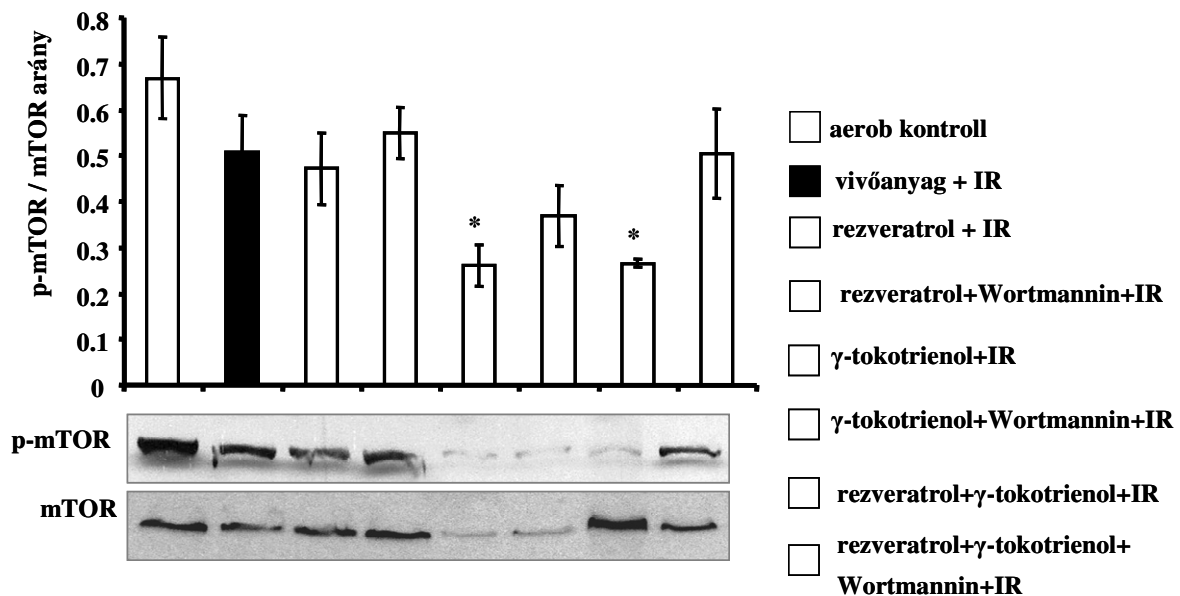
g, rezveratrol + γ -tokotrienol I/R: a képen két mitokondriumot (m) és némi citoszolikus anyagot (c) tartalmazó autofagoszóma látható. A nyíl a jellegzetes kettős membránt mutatja.



h, rezveratrol + γ -tokotrienol + 3 MA I/R: a kép bal oldalán normális struktúrával rendelkező kardiomiocita látható, amely tartalmaz egy autofagoszómát (nyíl), mellette egy duzzadt mitokondriumot tartalmazó szívizomsejt rendezetlen miofibrillumokkal (*). P – pericite, cap – kapilláris.

III e. A rezveratrol és/vagy γ -tokotrienol különböző módon indukálja az autofágiát.

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk az autofágia indukciójának módját, Western-blot analízis segítségével mértük az mTOR foszforiláltságát. Az aerob kontrollhoz képest az I/R enyhén csökkentette az mTOR foszforiláltságát. Rezveratrol jelenlétében is csökkent valamelyest a foszforiláltság, de ez nem volt jelentős, szemben a γ -tokotrienollal kezelt csoporttal ahol jelentősen csökkent a p-mTOR/mTOR arány. A Wortmannin kezelés valamennyi esetben emelte az mTOR foszforilációs szintjét. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a rezveratrol által indukált autofágia kevésbé függ az mTOR-tól, ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a γ -tokotrienol mTOR függő módon indukálja az autofágiát.



18. Ábra. Western-blot analízis p-mTOR és mTOR fehérjékről. * $p < 0,05$. vs. vivőanyag+I/R; $n=3$.

Eredmények megbeszélése:

A kardiovaszkuláris, illetve bármely más területen végzett alap kutatások egyik legfontosabb feladata az, hogy a különböző betegségek pontos patomechanizmusát tisztázza, és ezzel segítse a betegség kialakulásának pontos megismerését, így ehhez kapcsolódóan segítsen az esetleges védekező stratégiák kialakításában. Napjainkban egyre fontosabb szerepet tulajdonítanak a megelőzésnek bármilyen megbetegedésről is legyen szó. A kardiovaszkuláris megbetegedésekkel kapcsolatban is egyre többször hangzik el a megfelelő testmozgás, az alkohol fogyasztás mérséklése, a dohányzás mellőzése, vagy a megfelelő étrend kialakításának a fontossága. Egyre több növényi hatóanyagról illetve növényi eredetű készítményről igazolódik be, hogy azok rendelkeznek valamilyen egészségmegőrző hatással.

Kísérleteink első részében a Magyarországon ipari hulladéknak minősülő meggymag kivonatot vizsgáltuk. Az eredményeink összességében igazolták, hogy a meggymag kivonat dóziszfüggő módon képes csökkenteni a kamrai aritmiák kialakulásának valószínűségét, illetve javítani a posztisztkémiás szívfunkciókat, ezek mellett csökkenti az infarktusz terület nagyságát és az apoptózis mértékét. Továbbá immunhisztokémiai vizsgálataink kiderítették, hogy a meggymag kivonat képes volt csökkenteni a kaszpáz-3 expresszióját.

A kaszpázok egy cisztein proteáz enzimcsalád tagjai (caspase = cysteine-dependent aspartate-specific protease), amelyek kulcsszerepet játszanak a programozott sejthalál evolúciósan konzervált folyamataiban. Prekurzor (zimogén) formában képződnek és két jól szabályozott útvonalon aktiválódnak. Az egyik az extrinszik vagy „halál” receptor útvonal, a másik intrinszik vagy mitokondriális útvonal, amelyet a celluláris stressz aktivál és a citokróm c mitokondriumokból történő felszabadulása indít el. A kaszpázokat két csoportba sorolhatjuk, az ún. iniciátor kaszpázok, ide tartozik a kaszpáz-2, -8, -9, -10 és az effektor kaszpázok-3, -6, -7, amelyek közül a legfontosabb talán a kaszpáz-3, amely a sejtek teljes lebontásáért felelős (10, 53). Kezdeti tanulmányok szerint a hipoxia, illetve az iszkémia elegendő az apoptózis elindításához(61), azonban későbbi tanulmányok megváltoztatták ezt a nézetet. Webster és munkatársai szerint nem az iszkémia vagy a hipoxia, hanem az acidózis, a reoxigenizáció illetve reperfüzió felelős a szívizomban az apoptózis kialakulásáért(105). Tanulmányok különböző specifikus és nem specifikus

kaspáz inhibitorok vizsgálatával igazolták, hogy a kaspázok gátlása révén csökkenthető az I/R indukálta apoptózis mértéke és a posztisztkémiás károsodások súlyossága(43, 54, 67). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a meggy mag kivonat képes csökkenteni az apoptózis mértéket a kaspáz-3 gátlása révén, azt azonban nem zárhatjuk ki, hogy a kardioprotektív hatásokban más kaspázok gátlása is szerepet játszik, mint ahogyan valószínűleg más mechanizmusok is szerepet játszanak a kardioprotektív hatások kialakulásában, annál is inkább mert a meggy mag kivonatban található flavonoidok, pro- és antocianidok vagy a polifenolok rendelkeznek antioxidáns hatásokkal, vagy bizonyos enzimgátló hatásokkal, mint a lipoxigenáz, vagy a COX stb.(9, 69). Továbbá a meggy mag kivonatról kimutatták, hogy képes megvédeni a retinát a reperfüzió indukálta károsodásoktól azáltal, hogy növeli a HO-1 expressziót és ezáltal emeli az endogén CO koncentrációját(93). A HO enzim katalizálja a hem oxidatív lebontását, a HO oxigén és NADPH jelenlétében átalakítja a hem porfirin gyűrűjét nyíltláncú biliverdinné, s a folyamat során vas, valamint equimoláris mennyiségű szénmonoxid keletkezik(64). A keletkező biliverdint a biliverdin-reduktáz bilirubinná alakítja. Bizonyították azt is, hogy az antioxidáns tulajdonságú bilirubin is rendelkezik kardioprotektív hatásokkal (12). Ezt követően azonban a figyelem részben a szintén felszabaduló CO-ra terelődött, amely egyre több bizonyíték alapján úgy tűnik az NO-hoz hasonlóan rendelkezik jelátvivő funkcióval. Több publikáció is született nem csak az endogén, de az exogén CO szerepének vizsgálatáról I/R szívekben(3, 4). Bak és munkatársai azt találták, hogy HO-1 KO állatok szíve érzékenyebb az iszkémia reperfüzió indukálta károsodásokkal szemben, mint a vad típus, amiben a HO-1 hiánya és részben a csökkent CO felszabadulás játszott szerepet. Noha jelen tanulmányunkban nem vizsgáltuk a hemoxigenáz rendszert, de joggal feltételezzük azt, hogy ahogyan a retinaprotektív hatásokban, úgy a meggy mag kivonat által közvetített kardioprotektív hatásokban is szerepet játszik a hemoxigenáz rendszer. Eredményeink alapján azt lehetetlen megállapítani, hogy a meggy mag kivonat direkt csökkenti a reperfüzió indukálta károsodásokat vagy a látott kardioprotektív hatás a meggy mag kivonat antiiszkémiás hatásával függ össze, mivel az állatok előkezelve voltak és a meggy mag kivonatot nem akután az iszkémia alatt vagy a reperfüzió során kapták. További tanulmányokat folytatunk annak kiderítése érdekében, hogy a meggy mag szívet védő tulajdonságában a kaspáz-3 gátló hatásán kívül milyen más

szignáltranszdukciós útvonalak játszanak szerepet, és mely vagy melyek azok a komponensek, amelyeknek a legaktívabb szerep tulajdonítható. Az egyik komponens minden bizonnyal a rezveratrol, amelyről igen nagyszámú tudományos közlemény jelent meg, és kutatócsoportunk is foglalkozott, illetve jelenleg is foglalkozik azzal.

A rezveratrol szívre gyakorolt hatásainak vizsgálatát már számos korábbi tanulmány is célul tűzte ki, és az eredmények azt mutatják, hogy ez a természetes polifenol képes megvédeni a szívszövetet az iszkémia reperfüzió indukálta károsodásokkal szemben(8, 82). A kísérletek többsége viszont egészséges szívizmon kiváltott iszkémia/reperfüzió hatásait vizsgálta, ami lényegében különbözhet a „beteg” szívizom I/R-ra adott választától(48). Ezért választottuk a kísérletekben a „Zucker obese” elhízott patkány modellt. Eredményeink tükrében elmondhatjuk, hogy a rezveratrol képes a „beteg” szívizmot is megvédeni az I/R-indukálta károsodásoktól, amit bizonyít a posztisztkémiás szívfunkciók jobb felépülése, valamint a csökkent infarktusos terület és apoptózis mértéke a kezelt csoportokban.

Ismeretes továbbá az a tény, hogy a diabétesz vagy a metabolikus szindróma jelentős kockázati tényező a különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Továbbá a diabéteszes betegek körében sokkal nagyobb az anginás megbetegedések és az infarktusok kialakulásának a valószínűsége és azok súlyossága. A miokardiális infarktus után a mortalitás 2-3x nagyobb, mint a nem-diabéteszes betegekben, valamint az infarktusok után kialakuló szívelégtelenség kialakulásának a valószínűsége is kétszer magasabb a nem diabéteszes beteg csoportokhoz viszonyítva(62). Hasonló eredményeket kaptak Greer és munkatársai db/db diabéteszes egereken végzett tanulmányában, ahol a db/db egerek egynapos túlélése 45 perc iszkémiát követően mindössze 44% volt a 88%-os túlélési arányhoz viszonyítva a nem-diabéteszes kontroll csoporthoz képest. Továbbá jelentős bal kamra dilatációt, hipertrófiát és kontraktilis diszfunkciót figyeltek meg 28 nappal a 45 perc iszkémia után, amíg ezzel szemben a kontroll csoportban nem tapasztaltak hasonló jellegű elváltozásokat(30). Az egyik legjelentősebb eltérés a diabéteszes paciensek szívsejtjeiben a metabolizmus megváltozása, különösképpen az, hogy csökken a sejtek glükóz felvétele és oxidációja amellyel párhuzamosan nő a zsírsavak felhasználása(62). Még diabétesz nélkül is a glükózzal zsírsavakra történő váltás növeli az iszkémia súlyosságát, és csökkenti a posztisztkémiás felépülést(63). Sidell

és munkatársai „Zucker obese” patkányokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy ha helyreállítják a szívszövet inzulin érzékenységét rosiglitazonnal, javul a szívszövet glükóz felhasználása és a posztisztkémiás funkciók felépülése(89). A kísérleteikben alkalmazott állatok inzulin rezisztensek voltak, és csökkent a szívszövetben a Glut-4 fehérje szintje, amelyet a roziglitazon kezelés helyreállított. Tian és munkatársai szív specifikus Glut-4 KO egereket használva kimutatták, hogy ezen állatok szívében csökken a glükóz felhasználás, és nő az iszkémiás károsodások mértéke (97). Ezen eredmények jól mutatják az inzulin érzékeny Glut-4 transzporter fontosságát a diabéteszes és nem diabéteszes állapotokban egyaránt.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a rezveratrol által elért kardioprotekcióban szerepet játszik-e a Glut-4 transzporter. Eredményeinkből kiderül, hogy a rezveratrol képes helyreállítani a Glut-4 expressziót, és legalább részben ez a hatás felelős a kevésbé súlyos I/R indukálta károsodásokért. Vizsgálataink során az egyik állat csoport további extra cukorterhelést kapott, hogy tovább súlyosbítsuk a diabétesz okozta metabolikus elváltozásokat. A rezveratrol ebben a csoportban is képes volt emelni a Glut-4 receptor szintet és védeni a szíveket az I/R károsító hatásaitól. Az eredményekből kiderül az is, hogy a rezveratrol csökkentette az állatok súlygyarapodását, és a vércukorszintet, azonban az inzulin szintet nem befolyásolta.

Az endotel sejtek diszfunkcióját több kardiovaszkuláris megbetegedéssel hozták és hozhatjuk összefüggésbe, így az arterioszklerózis vagy az iszkémiás szívbetegségekben is kimutatták azok jelentőségét(98, 103). Mint ismeretes az endotél sejtek fontos szerepet játszanak a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában, több vazoaktív anyag termelése révén is. Verma és munkatársai emelkedett endotelin szintet találtak a diabéteszes betegek koronária folyadékban koronária bypass műtét után, továbbá megfigyelték, hogy a diabéteszes betegekből származó koronáriás mikroerek erősebb kontrakciós választ adnak ET-1 stimulusra mint a nem diabéteszes paciensek mintái, s ez a hatás antagonizálható volt endotelin antagonistával(101). A jelen tanulmányunkban is vizsgáltuk az endotelin szintjét és az ET-1 fehérje expresszióját. Vizsgálataink során emelkedett endotelin szintet detektáltunk az „obese” állatok koronáriás folyadékában, amely tovább emelkedett a glükózzal kezelt állatban, mindkét rezveratrollal kezelt csoportban jelentős csökkenést tapasztaltunk a kontrollcsoporthoz

viszonyítva. Hasonló eredményeket figyeltünk meg az endothelin-1 fehérje szintjének a vizsgálata során. A rezveratrol ezen hatásaiban valószínűleg direkt és indirekt hatások is szerepet játszanak. Liu és munkatársai kimutatták, hogy a rezveratrol képes csökkenteni a rostfelszülés indukálta ET-1 felszabadulást és az ET-1 mRNS szintet humán köldökzsínór véna endoteliális sejteken (HUVEC)(60). A hatást a szerzők részben a ROS szint csökkentésével és az ERK1/2 szignáltranszdukciós útvonal gátlásával magyarázták. Ez részben magyarázatot adhat a jelen tanulmányunkban megfigyelt ET-1 szint csökkenésnek is. Valószínűleg azonban egy másik indirekt hatás is szerepet játszik a rezveratrol által indukált változásokban. Nevezetesen az, hogy az emelkedett glükóz szint is képes az endothelin-1 szekrécióját és expresszióját fokozni(74, 110). Továbbá Park és munkatársai megfigyelték, hogy a magas glükóz szint által kiváltott ET-1 expresszió növekedés, visszafordítható a glükóz szint csökkentésével. Ezek és az alapján, hogy a rezveratrol mind a két kezelt csoportban csökkentette a vér glükóz szintjét, valószínűsíthetjük, hogy a rezveratrol ezen indirekt hatása is hozzájárul az ET-1 szignáltranszdukciós útvonal aktivitásának csökkentéséhez. Összegezve eredményeinket elmondhatjuk, hogy a rezveratrol képes megvédeni az elhízott és cukorbeteg állatok szívét az I/R-indukálta károsodásoktól, amit bizonyítanak a javult posztisztkémiai funkciók, a csökkent infarktusos terület és apoptózis mértéke. A rezveratrol ezen hatása magyarázható azzal, hogy képes javítani a szív glükóz felhasználását, valamint direkt és indirekt módokon csökkenteni a túlzott endotelin felszabadulást.

Harmadik kísérleti sorozatunkban arra kerestük a választ vajon van-e valamilyen interakció a rezveratrol és a γ -tokotrienol között. Kísérleti eredményeinkre alapozva elmondhatjuk, hogy a rezveratrol és a γ -tokotrienol között szinergista hatások alakulnak ki. Amint azt korábbi eredményeink alapján vártuk, mind a rezveratrol mind a γ -tokotrienol rendelkezik kardioprotektív hatásokkal(17, 19). Az izolált iszkémiás/reperfundált szívek vizsgálata során jelen tanulmányunkban is megfigyeltük a posztisztkémiai szívfunkciók javulását a rezveratrollal vagy γ -tokotrienollal kezelt csoportokban. A negyedik csoportban, ahol mind a két növényi származékkal kezeltük az állatokat további javulást tapasztaltunk, amely statisztikailag jelentős volt a monoterápiákhoz képest. Hasonló tendenciákat figyeltünk meg az infarktusos terület és az apoptózis vizsgálata során, ahol valamennyi kezelt csoportban szignifikánsan javulást

tapasztaltunk a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezekben a vizsgálatokban is a kettős kezelésben részesült állatok szíve volt a „legjobb” I/R után, azonban itt nem volt statisztikailag jelentős különbség a mono és a duál terápia között. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor vizsgáltuk a prokaspáz-3 szintet. Ahogyan azt korábban említettünk a kaszpáz-3 inaktív formája a prokaspáz-3, amely az apoptózis folyamán kerül aktív formába. Eredményinkből kitűnik, hogy a kontroll szívekben lecsökkent a prokaspáz-3 szint, ami arra utal, hogy a prokaspáz-3 átalakult aktív kaszpáz-3-má. A kezelt szívszövetben a prokaspáz-3 kaszpáz-3 átalakulás nem következett be, erre bizonyíték a magas prokaspáz-3 szint.

Vizsgáltuk az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjét is, hiszen a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai központi szerepet játszanak a szívizom apoptotikus folyamataiban. A csoport tagjai között vannak anti-apoptotikus fehérjék, mint pl.: Bcl-2, Bcl_{xL}, valamint megtalálhatóak pro- apoptotikus molekulák is, mint a Bak, Bax, Bnip3 és PUMA(35). A Bcl-2 fehérjéről kimutatták, hogy védi a mitokondriumokat több mechanizmuson keresztül, pl. inaktiválja a Bax/Bak fehérjét és ezáltal gátolja a mitokondriumok külső membránjának a permeabilizációját(34). Bcl-2 transzgén állatok szívében kevesebb apoptotikus sejtet, csökkent infarktuszó területet és jobb balkamrai funkciókat mértek I/R után(11). Western-blot eredményeinkből kiderült, hogy valamennyi kezelt csoportban jelentősen megemelkedett a Bcl-2 fehérje szintje. A kettős kezelésben részesült csoportban ez az emelkedés szignifikánsan magasabb volt a monoterápiás csoportokhoz viszonyítva. A „túlélési” Akt fehérje aktivitásának vizsgálatokor hasonló eredményeket kaptunk. Ez alapján úgy tűnik, hogy a rezveratrol és γ -tokotrienol által indukált kardiprotektív hatások részben a Bcl-2-Akt „túlélési” útvonal indukciójával valósulnak meg, mint ahogyan a szinergista hatásokért is részben ezek a mechanizmusok a felelősek.

A tanulmányunkban vizsgáltuk az autofágia szerepét a rezveratrol és a γ -tokotrienol hatásában. Kezdetben az autofágiát, mint a programozott sejthalál nem apoptotikus formáját tartották számon. Manapság viszont az autofágia szerepe egyre jobban kiszélesedni látszik, és egyre több bizonyíték utal arra, hogy bizonyos körülmények között az autofágia túlélési folyamatokban is fontos szerepet tölt be. Az autofágia fokozódását írták le krónikusan iszkémiás sertés szívizomban, úgy hogy az autofágiás folyamatok jelensége a túlélő miokardiumban volt fokozott. A témához

kapcsolódó másik tanulmány szerint a fokozott makroautofágia védi a HL-1 sejteket az I/R-tól(38). Egy korábbi vizsgálatunkban fokozott autofágiát tapasztaltunk iszkémiás prekondicionáció után (IPC), vizsgálataink szerint az autofágia a Bag-1 protein indukcióján keresztül fokozódik. A Bag-1 útvonal gátlása csökkentette az autofágia nagyságát, és megakadályozta az IPC protektív hatását(33). Jelen kísérleteinkben elsőként vizsgáltuk az LC3II/LC3I arányát valamint a Beclin-1 fehérje szintjét Western-blot segítségével.

Eredményeink szerint, valamennyi kezelés fokozta a Beclin-1 és az LC3II/LC3I arányát, de a legintenzívebb változásokat a kettős kezelésben részesült csoportban detektáltuk. A Wortmanninnal történő kezelés csökkentette mindkét anyag autofágiát indukáló hatását. Immunhisztokémiai vizsgálataink alátámasztották a Western-blottal kapott eredményeket, és enyhén emelkedett LC3II festést detektáltunk az I/R csoportba tartozó szívekben összhangban az irodalmi adatokkal, miszerint az I/R képes indukálni az autofágiát(66). Immunhisztokémiai vizsgálataink során is fokozott LC3II festést tapasztaltunk a kezelt szívekben, amelyet a Wortmannin lecsökkentett.

A Wortmannin kezelt szívekben nem csak az autofágia mértéke csökkent, hanem a posztisztkémiás bal kamra funkciók is, továbbá mindkét hatóanyag kezelésének hatásosságát csökkentette az infarktusz területre és az apoptózis mértékére. Továbbá csökkentette az Akt-Bcl-2 útvonal aktivitását is.

A Bcl-2 molekula egyik legismertebb tulajdonsága az apoptózis gátló hatása, emellett azonban normál körülmények között kötődik a Beclin-1 fehérjéhez és gátolja annak autofágiát indukáló hatását. Az éhezés az egyik legjobb induktora az autofágiának. Kuma és munkatársai kimutatták az autofágia upregulációját a születés után, amely biztosítja a megfelelő energiaellátást ebben a periódusban. Továbbá a szerzők rámutattak arra is, hogy az Atg5 deficiens egerek (jelenléte létfontosságú az autofágia kialakulásában), majdnem normál fenotípussal születnek de 1 napon belül a születés után elpusztulnak, ezzel is alátámasztva az autofágia fontosságát az energia ellátásban a születés után(55). Wei és munkatársai azt figyelték meg, hogy az éhezés következtében aktiválódik a c-Jun N-terminál protein kinase 1 (JNK-1) amely foszforilálja a Bcl-2-öt(106). A Bcl-2 foszforilációja, a Bcl-2 Beclin-1-ről való ledisszociációjához és az autofágiája indukációjához vezet(106). A Bcl-2 foszforilációja indukálja a Bcl-2 Bax

disszociációját és az apoptózist. Ventura és munkatársai azt találták, hogy a korai tranziens JNK aktivációja a sejtek túlélését, míg a tartós aktivációja a sejtek elhalását indukálja(100). Kinetikai vizsgálatok során kimutatták, hogy rövid ideig tartó éhezés során a kis mennyiségű Bcl-2 foszforilálódik, ami elég ahhoz, hogy a Bcl-2-Bcl-1 komplex felbomoljon, de a Bcl-2-Bax komplex megmaradjon. Súlyosabb tápanyag megvonás során a Bcl-2 nagymértékű foszforilációja és a Bcl-2-Bax komplex felbomlása valamint a kaszpáz-3 aktiválódása megfigyelhető(107). Ez a jelenség magyarázhatja az általunk kapott eredményeket, miszerint az emelkedett Bcl-2 szint mellett emelkedett autofágiát láttunk, de az apoptózis mértéke nem növekedett. További vizsgálatok szükségesek ennek a hipotézisnek a megerősítésére.

Fénymikroszkópos eredményeink alátámasztották az elméletünket miszerint ezek a természetes anyagok rendelkeznek kardioprotektív hatásokkal. Az I/R kontroll szívekben valamint a hatóanyagokkal és 3-MA-nel kezelt állatok szívében onkotikus szívizomsejteket figyeltünk meg, a jellemző nekrotikus sávokkal. A kezelt csoportokban ehhez képest majdnem normál szerkezetű szívizomsejteket találtunk, alátámasztva a kardioprotektív hatásokat. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok megerősítették az autofagoszómák jelenlétét a kezelt állatokban. Az I/R kontroll szívekben és a 3-MA-val kezelt állatok szívében is jelen vannak autofagoszómák, de ezekben a szívekben a szívizomsejtek struktúrája jelentős patológiás változásokat mutatnak.

Munkánk során vizsgáltuk az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerepét az autofágia indukálásában. A Tor egy konzervált Ser/Thr protein kináz, amely szerepet játszik a sejt növekedésének, sejtciklus menetének, a tápanyag felvételének, fehérje szintézisének és az autofágia szabályozásában(87). A tápanyagokban gazdag állapotok aktiválják a TOR-t, ami az Atg 13 hiperfoszforilációját okozza és megakadályozza az Atg 13 és Atg1 interakcióját, gátolva ezzel az autofágia kialakulását. Éhezés vagy rapamycin kezelés, a TOR inaktivációját okozza, ennek következtében az Atg13 gyors defoszforilációja következik be, ami indukálja az Atg13-Atg1 kölcsönhatását és az autofágia kialakulását(50, 88). Eredményeinkből láthatjuk, hogy az I/R önmagában is csökkentette a p-mTOR/mTOR arányát, ami arra utal, hogy az I/R indukálta autofágiában az mTOR szerepet játszik. További eredményeinkből kitűnik az is, hogy a γ -tokotrienol

jelentősen csökkentette a p-mTOR/mTOR arányát, ami arra utal, hogy a γ -tokotrienol által előidézett autofágia jelentős mértékben függ az mTOR aktivitásától, ezzel szemben a rezveratrol indukálta autofágia kevésbé függ tőle. Kísérleteinkben igazoltuk tehát, hogy a rezveratrol és a γ -tokotrienol között vannak bizonyos szinergista hatások. Ezen hatásokban fontos szerepet játszik az Akt-Bcl-2 túlélési útvonal aktiválása, valamint az autofágia indukciója.

Összegzésként igazoltuk, hogy a ma még ipari hulladéknak számító meggymag kivonat rendelkezik kardioprotektív hatásokkal. Bizonyítottuk továbbá, hogy a rezveratrol képes a „beteg” szívmot is megvédeni az I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Végül arra rámutattunk arra, hogy a rezveratrol és a γ -tokotrienol között vannak bizonyos szinergista hatások. Az általunk kapott eredmények tovább támogatják azokat a megfigyeléseket melyek szerint ez autofágia segíthet a sejtek túlélésében.

Összefoglalás:

A munkám első részében vizsgáltuk a meggybogyó kivonat száraz kivonatának hatását iszkémiás/reperfundált szívekben. Kísérleteink során a meggybogyó kivonat dóziszfüggő módon csökkentette a reperfúzió indukálta kamrai tachiaritmiák kialakulásának valószínűségét, továbbá javította a posztiszkémiás szívfunkciók felépülését, csökkentette az infarktusz terület nagyságát és az apoptózis mértékét. Eredményeinkből az is kiderült, hogy a kardioprotektív hatások háttérben legalább részben a kaszpáz-3 gátló hatás áll.

A vörösbogyó egyik legfontosabb komponense a rezveratrol, amelyről számos egészséget kedvezően befolyásoló hatást írtak már le. A kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ vajon képes-e a rezveratrol jótékony hatásainak a kifejtésére beteg szívizomszövetben. A rezveratrol előkezelés jelentős mértékben csökkentette az I/R indukálta bal kamra károsodásokat az elhízott állatokban is, ezek mellett a rezveratrol jelentősen csökkentette a kezelt állatok testsúlyát és a vércukorszintet. Eredményeink szerint ezen kardioprotektív hatásokban a csökkent endotelin felszabadulás valamint az ET-1 fehérje alacsonyabb expressziója, és a Glut-4 fehérje emelkedett szintje játszik szerepet.

Vizsgáltuk továbbá a rezveratrol hatásait γ -tokotrienollal kombinálva is. Együttes adagolásuk során szinergikus kardioprotektív hatás tapasztaltunk. Tanulmányoztuk továbbá a p-Akt és Bcl-2 „túlélési” fehérjék szintjét. Eredményeink azt mutatták, hogy az önálló kezelések is jelentős mértékben emelték az említett fehérjék szintjét, azonban a kombinált kezelés további drasztikus emelkedést eredményezett a fehérjék expressziójában, tovább erősítve a szinergista hatások meglétét. Az apoptózis mellett vizsgáltuk az autofágia előfordulását is. Tanulmányoztuk a Beclin-1 fehérje szintjét valamint a LC3II/LC3I arányát, melyek jelentős emelkedést mutattak a monoterápiás csoportokban a kontroll csoporthoz képest, s további jelentős emelkedést tapasztaltunk a kombinált kezelést kapott csoportban. Munkánk során vizsgáltuk az mTOR szerepét az autofágia indukálásában. Eredményeink szerint a γ -tokotrienol által előidézett autofágia jelentős mértékben függ az mTOR aktivitásától, ezzel szemben a rezveratrol indukálta autofágia kevésbé függ tőle.

Summary:

In the first part of my work, we have studied the effect of sour cherry seed extract on the ischemic/reperfused myocardium. Based on our results, this natural by-product possesses dose-dependent cardioprotective effects. In line with this, the sour cherry seed extract has the capability to reduce the incidence of VT and VF in a dose-dependent manner. Furthermore, our immunohistochemistry experiments revealed the ability of the sour cherry extract to inhibit the caspase 3.

One of the most significant components of the red wine is resveratrol, which has been recognised to possess many health beneficial effects. We have used this phytochemical to test whether it can cure also the pathologic myocardium. Resveratrol treatment improved the postischemic cardiac functions, reduced the bodyweight and the blood glucose level in comparison with the control animals. Based on our results, we concluded that the enhanced Glut-4 protein level and reduced ET-1 play a major role in the cardioprotective effect of resveratrol.

Furthermore, we investigated the effect of resveratrol in combination with γ -tocotrienol. Based on our results we concluded that resveratrol and γ -tocotrienol to some extent possess synergic effect against I/R injury. We measured the level of the antiapoptotic Bcl-2 and the ratio of the survival p-Akt/Akt. Both of them were significantly induced by resveratrol or γ -tocotrienol compared to the vehicle treated control group. More enhanced level of Bcl-2 and ratio of p-Akt/Akt were observed in samples obtained from the dual treated rats, further supporting the existence of synergetic features between resveratrol and γ -tocotrienol. Beside apoptosis, we studied the autophagy. To check the role of autophagy, first we studied the level of Beclin-1 and the ratio of LC3II/LC3I by Western-blot. In case of both resveratrol and γ -tocotrienol we detected enhanced level of Beclin-1 and ratio of LC3II/LC3I, which were more intense in the dual treated group. The phosphorylation status of mTor was studied to examine the mechanisms of initiation of the autophagy. It appears from our results that γ -tocotrienol-induced autophagy, at least in part, is being mediated through mTOR pathway, and resveratrol-mediated autophagy is less dependent on mTOR.

Irodalomjegyzék:

1. **Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, and Sammut IA.** Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 19: 1088-1095, 2005.
2. **Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, and Kim AL.** Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 486: 95-102, 2009.
3. **Bak I, Szendrei L, Turoczy T, Papp G, Joo F, Das DK, de Leiris J, Der P, Juhasz B, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P, and Tosaki A.** Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 17: 2133-2135, 2003.
4. **Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M, and Tosaki A.** The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51: 453-459, 2005.
5. **Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, and Sinclair DA.** Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342, 2006.
6. **Benndorf K, Friedrich M, and Hirche H.** Anoxia opens ATP regulated K channels in isolated heart cells of the guinea pig. *Pflugers Arch* 419: 108-110, 1991.
7. **Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, and Bertelli A.** Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* 17: 1-3, 1995.
8. **Bradamante S, Barenghi L, and Villa A.** Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22: 169-188, 2004.
9. **Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, and Darley-Usmar V.** Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med* 32: 1220-1228, 2002.

10. **Chen M, and Wang J.** Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7: 313-319, 2002.
11. **Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, and Chua BH.** Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2313-2320, 2001.
12. **Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, and Motterlini R.** Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H643-651, 2000.
13. **Das DK, and Maulik N.** Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 233: 601-610, 1994.
14. **Das DK, and Maulik N.** Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 6: 36-47, 2006.
15. **Das S, Cordis GA, Maulik N, and Das DK.** Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H328-335, 2005.
16. **Das S, Falchi M, Bertelli A, Maulik N, and Das DK.** Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by the anti-inflammatory action of resveratrol. *Arzneimittelforschung* 56: 700-706, 2006.
17. **Das S, Lekli I, Das M, Szabo G, Varadi J, Juhasz B, Bak I, Nesaretam K, Tosaki A, Powell SR, and Das DK.** Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H970-978, 2008.
18. **Decker RS, and Wildenthal K.** Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol* 98: 425-444, 1980.
19. **Dudley JI, Lekli I, Mukherjee S, Das M, Bertelli AA, and Das DK.** Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem* 56: 9362-9373, 2008.
20. **Eisner DA, Nichols CG, O'Neill SC, Smith GL, and Valdeolmillos M.** The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol* 411: 393-418, 1989.

21. **Espin JC, Garcia-Conesa MT, and Tomas-Barberan FA.** Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 68: 2986-3008, 2007.
22. **Ferrieres J.** The French paradox: lessons for other countries. *Heart* 90: 107-111, 2004.
23. **Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, and Cecconi F.** Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447: 1121-1125, 2007.
24. **Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, and Coffey RG.** Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 265: H774-778, 1993.
25. **Floreani M, Napoli E, Quintieri L, and Palatini P.** Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Sci* 72: 2741-2750, 2003.
26. **Gao WD, Atar D, Backx PH, and Marban E.** Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res* 76: 1036-1048, 1995.
27. **Gao WD, Liu Y, Mellgren R, and Marban E.** Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis? *Circ Res* 78: 455-465, 1996.
28. **Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, Schonbeck U, Patti ME, and Creager MA.** Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 47: 2456-2461, 2006.
29. **Goswami SK, and Das DK.** Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett* 284: 1-6, 2009.
30. **Greer JJ, Ware DP, and Lefer DJ.** Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H146-153, 2006.
31. **Guerrero RF, Garcia-Parrilla MC, Puertas B, and Cantos-Villar E.** Wine, resveratrol and health: a review. *Nat Prod Commun* 4: 635-658, 2009.

32. **Gupta SK, Mohanty I, Talwar KK, Dinda A, Joshi S, Bansal P, Saxena A, and Arya DS.** Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by *Withania somnifera*: a hemodynamic, biochemical and histopathological assessment. *Mol Cell Biochem* 260: 39-47, 2004.
33. **Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, and Das DK.** Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med* 13: 373-387, 2009.
34. **Gustafsson AB, and Gottlieb RA.** Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C45-51, 2007.
35. **Gustafsson AB, and Gottlieb RA.** Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 77: 334-343, 2008.
36. **Halestrap AP, Clarke SJ, and Javadov SA.** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385, 2004.
37. **Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod H, Andersen LF, Moskaug O, Jacobs DR, Jr., and Blomhoff R.** A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132: 461-471, 2002.
38. **Hamacher-Brady A, Brady NR, and Gottlieb RA.** Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 281: 29776-29787, 2006.
39. **Hancock MB.** Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. *J Histochem Cytochem* 32: 311-314, 1984.
40. **Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Mishima K, and Fujiwara M.** Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia. *Life Sci* 75: 1967-1978, 2004.
41. **Hausenloy DJ, and Yellon DM.** Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70: 240-253, 2006.

42. **Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Luscher TF, Riesen W, Noll G, and Corti R.** Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 92: 119-120, 2006.
43. **Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, and Cryns VL.** Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1709-1715, 1999.
44. **Hung LM, Su MJ, and Chen JK.** Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radic Biol Med* 36: 774-781, 2004.
45. **Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, and Reaven GM.** Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512-516, 1987.
46. **Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, Agullo L, Piper HM, and Soler-Soler J.** Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 55: 739-748, 2002.
47. **Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, and Pezzuto JM.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, 1997.
48. **Juhasz B, Der P, Turoczi T, Bacskay I, Varga E, and Tosaki A.** Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma? *Antioxid Redox Signal* 6: 325-333, 2004.
49. **Kaga S, Zhan L, Matsumoto M, and Maulik N.** Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *J Mol Cell Cardiol* 39: 813-822, 2005.
50. **Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, and Ohsumi Y.** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150: 1507-1513, 2000.

51. **Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, and Yoshimori T.** Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2: 330-335, 2001.
52. **Kluft C JJ.** Diabetes as a procoagulant condition. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2: 358-362, 2002.
53. **Kopper L FL** editor. *Apoptózis*. Budapest: Medicina Könyvkiadó RT., 2002.
54. **Kovacs P, Bak I, Szendrei L, Vecsernyes M, Varga E, Blasig IE, and Tosaki A.** Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364: 501-507, 2001.
55. **Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, and Mizushima N.** The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036, 2004.
56. **Levine B, Sinha S, and Kroemer G.** Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4: 600-606, 2008.
57. **Li C, Yan Z, Yang J, Chen H, Li H, Jiang Y, and Zhang Z.** Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochem Int* 2009.
58. **Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, and Jung JU.** Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8: 688-699, 2006.
59. **Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, and Levine B.** Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 72: 8586-8596, 1998.
60. **Liu JC, Chen JJ, Chan P, Cheng CF, and Cheng TH.** Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension* 42: 1198-1205, 2003.
61. **Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, Cirielli C, Lakatta EG, and Crow MT.** p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 99: 2635-2643, 1997.

62. **Lopaschuk GD.** Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 7: 149-159, 2002.
63. **Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, and Schonekess BO.** Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1213: 263-276, 1994.
64. **Maines MD.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997.
65. **Marino G, Uria JA, Puente XS, Quesada V, Bordallo J, and Lopez-Otin C.** Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem* 278: 3671-3678, 2003.
66. **Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, and Sadoshima J.** Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 100: 914-922, 2007.
67. **Mocanu MM, Baxter GF, and Yellon DM.** Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 130: 197-200, 2000.
68. **Mohanty I, Arya DS, Dinda A, Talwar KK, Joshi S, and Gupta SK.** Mechanisms of cardioprotective effect of *Withania somnifera* in experimentally induced myocardial infarction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94: 184-190, 2004.
69. **Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, and Hault JR.** Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 40: 787-792, 1988.
70. **Mukherjee S, Gangopadhyay H, and Das DK.** Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *J Agric Food Chem* 56: 609-617, 2008.
71. **Nascimento NR, Lessa LM, Kerntopf MR, Sousa CM, Alves RS, Queiroz MG, Price J, Heimark DB, Larner J, Du X, Brownlee M, Gow A, Davis C, and Fonteles MC.** Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and

rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 218-223, 2006.

72. **Opipari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, and Liu JR.** Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 64: 696-703, 2004.

73. **Ortega RM.** Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr* 9: 1136-1140, 2006.

74. **Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, and King GL.** Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 49: 1239-1248, 2000.

75. **Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, and Levine B.** Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939, 2005.

76. **Penna C, Perrelli MG, Raimondo S, Tullio F, Merlino A, Moro F, Geuna S, Mancardi D, and Pagliaro P.** Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochim Biophys Acta* 1787: 794-801, 2009.

77. **Perrella MA, and Yet SF.** Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular function. *Curr Pharm Des* 9: 2479-2487, 2003.

78. **Pierce GN, and Czubyrt MP.** The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol* 27: 53-63, 1995.

79. **Piper HM, Garcia-Dorado D, and Ovize M.** A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38: 291-300, 1998.

80. **Prince PS, and Rajadurai M.** Preventive effect of Aegle marmelos leaf extract on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats: biochemical evidence. *J Pharm Pharmacol* 57: 1353-1357, 2005.

81. **Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, and Poulsen L.** Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* 49: 159-174, 2005.

82. **Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, and Das DK.** The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 27: 160-169, 1999.
83. **Renaud S, and de Lorgeril M.** Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526, 1992.
84. **Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, and Molero X.** Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 132: 2518-2532, 2007.
85. **Rodriguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, and Garcia-Dorado D.** Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 12: 207-216, 2007.
86. **Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, and Elazar Z.** GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 19: 1494-1504, 2000.
87. **Sarbassov DD, Ali SM, and Sabatini DM.** Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17: 596-603, 2005.
88. **Scott SV, Nice DC, 3rd, Nau JJ, Weisman LS, Kamada Y, Keizer-Gunnink I, Funakoshi T, Veenhuis M, Ohsumi Y, and Klionsky DJ.** Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J Biol Chem* 275: 25840-25849, 2000.
89. **Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, Desrois M, Buckingham RE, and Clarke K.** Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker Fatty rat heart. *Diabetes* 51: 1110-1117, 2002.
90. **Siemann EH, Creasy, L.L.** Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 43: 49-52, 1992.
91. **Signorelli P, and Ghidoni R.** Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16: 449-466, 2005.
92. **Sybers HD, Ingwall J, and DeLuca M.** Autophagy in cardiac myocytes. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 12: 453-463, 1976.

93. **Szabo ME, Gallyas E, Bak I, Rakotovao A, Boucher F, de Leiris J, Nagy N, Varga E, and Tosaki A.** Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3727-3732, 2004.
94. **Szolcsanyi J, and Bartho L.** Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J Physiol Paris* 95: 181-188, 2001.
95. **Takaoka MJ.** Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Faculty Sci Hokkaido Imperial University* 3: 1-16, 1940.
96. **Tanida I, Ueno T, and Kominami E.** LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2503-2518, 2004.
97. **Tian R, and Abel ED.** Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation* 103: 2961-2966, 2001.
98. **Tooke JE, and Hannemann MM.** Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med* 247: 425-431, 2000.
99. **Tosaki A, and Hellegouarch A.** Adenosine triphosphate-sensitive potassium channel blocking agent ameliorates, but the opening agent aggravates, ischemia/reperfusion-induced injury. Heart function studies in nonfibrillating isolated hearts. *J Am Coll Cardiol* 23: 487-496, 1994.
100. **Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, and Davis RJ.** Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21: 701-710, 2006.
101. **Verma S, Maitland A, Weisel RD, Fedak PW, Li SH, Mickle DA, Li RK, Ko L, and Rao V.** Increased endothelin-1 production in diabetic patients after cardioplegic arrest and reperfusion impairs coronary vascular reactivity: reversal by means of endothelin antagonism. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 1114-1119, 2002.
102. **Vingtdeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, and Marambaud P.** Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2: S6, 2008.
103. **Wainwright CL, McCabe C, and Kane KA.** Endothelin and the ischaemic heart. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 333-341, 2005.

104. **Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, and Olsen RW.** GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397: 69-72, 1999.
105. **Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B, and Bishopric NH.** Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 104: 239-252, 1999.
106. **Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, and Levine B.** JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30: 678-688, 2008.
107. **Wei Y, Sinha S, and Levine B.** Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4: 949-951, 2008.
108. **Willett WC.** Goals for nutrition in the year 2000. *CA Cancer J Clin* 49: 331-352, 1999.
109. **Yamamoto F, Manning AS, Braimbridge MV, and Hearse DJ.** Cardioplegia and slow calcium-channel blockers. Studies with verapamil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86: 252-261, 1983.
110. **Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, Umeda F, and Nawata H.** Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 267: 16-18, 1990.
111. **Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Massover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, and Vatner SF.** Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13807-13812, 2005.
112. **Yorimitsu T, and Klionsky DJ.** Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1542-1552, 2005.
113. **Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, and Heintz N.** Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15077-15082, 2003.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Lekli I, Ray D, Mukherjee S, Gurusamy N, Md.Ahsan K, Juhasz B, Bak I, Tosaki A, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Co-ordinated autophagy with resveratrol and γ -tocotrienol confers synergetic cardioprotection. J. Cell. Mol. Med. 2009 (in press) (IF: 5.114)

Lekli I, Szabo G, Juhasz B, Das S, Das M, Varga E, Szendrei L, Gesztelyi R, Varadi J, Bak I, Das DK, Tosaki A. Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: the role of GLUT-4 and endothelin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Feb;294(2):H859-66. (IF: 3.643)

Bak I, **Lekli I**, Juhasz B, Nagy N, Varga E, Varadi J, Gesztelyi R, Szabo G, Szendrei L, Bacskay I, Vecsernyes M, Antal M, Fesus L, Boucher F, de Leiris J, Tosaki A. Cardioprotective mechanisms of Prunus cerasus (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Sep;291(3):H1329-36. (IF: 3,724)

Az értekezéshez fel nem használt egyéb közlemények:

Gurusamy N, **Lekli I**, Ahsan MK, Ray D, Mukherjee S, Mascareno E, Siddiqui MA, Das DK. Downregulation of cardiac lineage protein-1 confers cardioprotection through the upregulation of redox effectors. FEBS Lett. 2010 Jan 4;584(1):187-93 (IF.:3.264)

Gurusamy N, **Lekli I**, Mukherjee S, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by resveratrol: A novel mechanism via autophagy involving mTORC2 pathway. Cardiovasc Res. 2010 [Epub ahead of print] (IF.:5.947)

Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Gurusamy S, Kim YH, Tosaki A, Engelman RM, Ho YS, Das DK. nctional Recovery of Diabetic Mouse Hearts by Glutaredoxin-1 Gene Therapy: Role of Akt-FoxO Signaling Network Gene Therapy (accepted) (IF:4,492)

Lekli I, Gurusamy N, Ray D, Tosaki A, Das DK. Redox Regulation Of Stem Cell Mobilization Can. J. Phys. Pharm. 2009 Dec;87(12):989-95 (IF: 1.763)

Lekli I, Ray D, Das DK, Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. Genes and Nutritions 2009 [Epub ahead of print] (IF: 0.451)

Mukherjee S, **Lekli I**, Goswami S, Das DK. Freshly Crushed Garlic is a Superior Cardioprotective Agent than Processed Garlic J. Agric. Food Chem. 2009 Aug 12;57(15):7137-44. (IF: 2.562)

Ahsan MK, **Lekli I**, Ray D, Yodoi J, Das DK. Redox Regulation of Cell Survival by Thioredoxin Super-family: An Implication of Redox Gene Therapy in the Heart. Antioxid Redox Signal. 2009 Nov;11(11):2741-58. (IF: 6.190)

Vasanthi HR, Mukherjee S, **Lekli I**, Ray D, Veeraraghavan G, Das DK. Potential Role of Borreria hispida in Ameliorating Cardiovascular Risk Factors. J Cardiovasc Pharmacol. 2009 May 18. 2009 Jun;53(6):499-506 (IF: 2.290)

Mukherjee S, **Lekli I**, Gurusamy N, Bertelli AA, Das DK. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. Free Radic Biol Med. 2009 Mar 1;46(5):573-8. (IF: 4.813)

Gurusamy N, **Lekli I**, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK BAG-1 induces autophagy for cardiac cell survival. Autophagy. 2009 Jan 1;5(1):120-1. (IF: 4.657)

Dudley JI, **Lekli I**, Mukherjee S, Das M, Bertelli AA, Das DK. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines

and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem.* 2008 Oct 22;56(20):9362-73. (IF: 2.532)

Gurusamy N, **Lekli I**, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med.* 2009 Feb;13(2):373-87. (IF: 6.807)

Gurusamy N, Mukherjee S, **Lekli I**, Bearzi C, Bardelli S, DAS D. Inhibition of Ref-1 Stimulates the Production of Reactive Oxygen Species and Induces Differentiation in Adult Cardiac Stem Cells. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug 21. (IF: 6,190)

Mukherjee S, **Lekli I**, Das M, Azzi A, Das DK. Cardioprotection with alpha-tocopheryl phosphate: amelioration of myocardial ischemia reperfusion injury is linked with its ability to generate a survival signal through Akt activation. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1782(9):498-503. (IF: 4.041)

Lekli I, Das S, Das S, Mukherjee S, Bak I, Juhasz B, Bagchi D, Trimurtulu G, Krishnaraju AV, Sengupta K, Tosaki A, Das DK. Coenzyme Q9 provides cardioprotection after converting into coenzyme Q10. *J Agric Food Chem.* 2008 Jul 9;56(13):5331-7. (IF: 2,322)

Das M, Gherghiceanu M, **Lekli I**, Mukherjee S, Popescu LM, Das DK. Essential role of lipid raft in ischemic preconditioning. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(4):325-34. (IF: 3.246)

Das S, **Lekli I**, Das M, Szabo G, Varadi J, Juhasz B, Bak I, Nesaretam K, Tosaki A, Powell SR, Das DK. Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H970-8. (IF: 3.643)

Juhasz B, Der P, Szodoray P, Gesztelyi R, **Lekli I**, Bak I, Antal M, Maulik N, Tosaki A, Vecsernyes M. Adrenocorticotrope hormone fragment (4-10) attenuates the ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in isolated rat hearts. *Antioxid Redox Signal.* 2007 Nov;9(11):1851-61. (IF: 5,484)

Karsai D, Gesztelyi R, Zsuga J, Jakab A, Szendrei L, Juhasz B, Bak I, Szabo G, **Lekli I**, Vecsernyes M, Varga E, Szentmiklosi AJ, Tosaki A. Influence of hyperthyroidism on the effect of adenosine transport blockade assessed by a novel method in guinea pig atria. *Cell Biochem Biophys*. 2007;47(1):45-52. (IF: 1,953)

Varadi J, **Lekli I**, Juhasz B, Bacskay I, Szabo G, Gesztelyi R, Szendrei L, Varga E, Bak I, Foresti R, Motterlini R, Tosaki A. Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sci*. 2007 Apr 3;80(17):1619-26. (IF: 2,257)

Kumulatív IF: 87,385

Tárgyszavak:

Iszkémia/reperfúzió

Aritmia

Izolált szív

Meggymag kivonat

Rezveratrol

γ -tokotrienol

Autofágia

Endotelin

Infarktos terület

Ischemia/reperfusion

Arrhythmia

Isolated heart

Sour cherry seed extract

Resveratrol

γ -tocotrienol

Autophagy

Endothelin

Infarct size

Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Tósaki Árpádnak témavezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra a tanszékén való munkát, biztosította a megfelelő anyagi és tudományos háttérrel, és hasznos tanácsokkal látott el. Megköszönöm továbbá Prof. Dr. Dipak K. Dasnak, hogy csereprogram keretein belül laborjában dolgozhattam, ahol hasznos tanácsokkal látott el külföldi kinn tartózkodásom ideje alatt.

Szeretnék köszönetet mondani minden jelenlegi és korábbi munkatársamnak, hogy munkám során baráti segítséget nyújtottak.

Köszönöm szüleimnek a támogatásukat, amelyet gyermekkorom óta élvezhetek. Végül, de nem utolsósorban megköszönöm feleségemnek, Máriának a kitartást és hogy mindvégig mellettem állt, biztatott, és megadta számomra azt a nyugodt háttérrel, amely nélkül e munka nem jöhetett volna létre és köszönöm kisfiamnak, István Botondnak, hogy türelemmel volt és engedte, hogy a munkámmal is foglalkozzak.