

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Hiperkoleszterinémia adverz hatása a kardiális homeosztázisra New Zealand nyúl modellen

Dr. Kertész Attila Béla

Témavezető: Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Hiperkoleszterinémia adverz hatása a kardiális homeosztázisra New Zealand nyúl modellen

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Kertész Attila Béla

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Juhász Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Leprán István, az MTA doktora
Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2014. március 31. 11 óra, helye a Debreceni Egyetem GYTK,
Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára (Elméleti Tömb, 5. emelet)

Az értekezés bírálói:

Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Csiki Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Leprán István, az MTA doktora
Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora
Dr. Csonka Csaba, PhD
Dr. Csiki Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. március 31. 13 óra, helye a Debreceni Egyetem
ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület Tanterme.

BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri betegségek világszerte az összes halálozás egyharmadáért felelősek. Mivel a rizikófaktoroként azonosított elhízás, nem megfelelő táplálkozás, diszlipidémia, cukorbetegség, magasvérnyomás, mozgáshiány és dohányzás előfordulása mind a fejlett, mind a fejlődő országokban – többségében – emelkedő tendenciát mutat, emiatt a kardiovaszkuláris mortalitás növekedésére számíthatunk.

A hiperkoleszterinémia és az ateroszklerózis összefüggése egyértelmű. A klinikumban makrovaszkuláris szövődményként miokardiális infarktus, stroke, veseelégtelenség és perifériás érbetegség jelentkezhetnek, melyek felelősek a morbiditásért és mortalitásért.

A kórállapot fontosságát mutatja, hogy a betegség népegészségügyi és gazdasági jelentősége hatalmas. A kialakult ateroszklerotikus plakkok gyógyszeres, eszközös, illetve műtéti kezelése, valamint a különböző szervekben kialakuló infarktusok akut ellátása és az ezt követő rehabilitáció az egészségügy minden szintjét érinti, és egyértelműen kijelenthető, hogy az egészségügyi szolgáltatóktól nagy anyagi ráfordítást igényel.

A hiperkoleszterinémia okozta kórállapotok diagnosztikájára, korai felismerésére, a fokozott rizikójú csoportok kiválasztására különböző score-ok, továbbá nem invazív és invazív vizsgálatok széles tárháza áll rendelkezésünkre.

A kórállapotok kezelése és szövődmények ellátása mellett azonban kiemelt fontosságú a megelőzés szerepe. A kezelés és megelőzés lehetőségeit szélesíti a patomechanizmus részletes feltárása, azonban ez hiperkoleszterinémia esetében még nem minden részletében ismert.

A modern molekuláris gyógyszertervezés korában is figyelemre méltó az a tény, hogy a természetben, különösen a növényvilágban található anyagok tanulmányozása a gyógyszerkutatás történetében több alkalommal vezetett sikerre. A Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszékén több gyógynövénykivonat, különböző hatásait tanulmányozták. Egy ilyen kutatás eredménye a meggymag-kivonat kedvező hatása retina, illetve egészséges patkány szívizom iszkémia reperfúziója kapcsán. Munkám során a hiperkoleszterinémia kapcsán észlelt változások idő függését és ebben az állapotban a meggymag-kivonat kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait vizsgáltam. Az idő-hatás vizsgálatot addig folytattuk, amíg a szívizom szisztolés funkciójának romlása is kimutathatóvá vált, és nem csak a diasztolés funkciózavar jelei voltak észlelhetők.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A koleszterin a szterol vegyületcsoport tagja, széles körben előfordul gerincesekben és számos egyéb élőlényben. Életfontosságú molekula, mely a szteroid hormonok előanyaga és a sejtmembránok fontos építőeleme, jelentős szerepe van a sejtmembrán fluiditás és permeabilitás meghatározásában. Szintézise a májban, a mellékvesében, a petefészekben és herében, valamint a bélhámsejtekben zajlik. A szintézis sebességének meghatározó lépése a HMG-CoA reduktáz enzim által végzett reakció.

Az endogén koleszterin szintézis mellett, a táplálékból exogén koleszterin felvétel is zajlik. A koleszterin transzportját a vérben fehérjéket és lipideket tartalmazó lipoproteinek végzik.

Mivel a nyúl növényevő állat, az exogén úton bevitt koleszterindús diéta hatására szervezetében a HDL/LDL arány hamar leromlik, ezért a hiperkoleszterinémiás nyúl kiváló modell a kardiovaszkuláris történések és az ateroszklerózis tanulmányozására.

COX

A mitokondrium kettős membránnal rendelkező organelum, mely a sejt aerob energiatermeléséért felelős. Működése során a két membrán közötti térbe H^+ -t halmoz fel, mellyel ATP termelésre felhasználható membránpotenciált hoz létre.

A citokróm c és a COX a mitokondriális elektrontranszportban résztvevő fehérjék. A COX felelős az oxigén vízmolekulává történő redukálásáért, valamint a H^+ transzportjáért a mitokondrium két membránja közötti térbe. A folyamat a sejt energiatermelése szempontjából alapvető jelentőséggel bír. A két membrán közötti térben felhalmozott protonok a mitokondrium mátrixba az ATP szintetázon keresztül jutnak vissza, mely során ATP képződik. A citochrome c az elektrontranszport mellett erős ROS (reaktív oxigén gyökök) gátló (scavenger) hatással bír, viszont a cardiolipin peroxidálását követően a citoplazmába jutva apoptózist indukál.

A COX a mitokondriális mebránpotenciál kialakításának kulcsfontosságú enzime, melynek aktivitása több ponton szabályozott. Kóros körülmények között a mitokondriális membránpotenciál a normális értéktől jellemző módon eltérhet. Iszkémia-reperfúzió során a szöveti oxigén ellátás függvényében három fázis alakul ki.

1. Iszkémiás (éhezési) fázis: Ebben a fázisban az energiahiány miatt a COX aktivitás fokozódik, az intramitokondriális kalcium tartalom nő, a mitokondriális membránpotenciál a lehetőségekhez képest megtartott marad.

2. Reperfúziós fázis: A kalcium hatására az 1. fázisban hiperaktívvá vált COX molekulák a megérkező oxigént hasznosítva hiperpolarizálják a mitokondriális membránpotenciált (fokozódik a két membrán közötti tér H^+ tartalma), ami ROS képződéshez vezet. A hiperpolarizált állapot egér agyban végzett mérések alapján mintegy 8 percig tart.

3. Mitokondriális diszfunkció (az energiatermelés elégtelenségének) fázisa: Ebben a fázisban a légzési lánc fehérjéi a szabadgyökök oxidatív károsítása miatt részben tönkremennek, ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenésével és az energiatermelés hanyatlásával jár. Ha a károsodás elér egy fokot, apoptosis indukálódik.

A fentiek alapján a COX mennyisége és aktivitása jelentősen befolyásolja a sejt nyugalmi körülmények közötti energiatermelését, valamint fontos szerepet játszik az iszkémia-reperfúzió kapcsán észlelt szöveti károsodás patomechanizmusában.

VEGF

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor szignál protein, mely tirozin kináz receptorokhoz kötve fejti ki angiogenetikus hatását. Elégtelen oxigén ellátás esetén a sejtek hipoxia indukált transzkripció faktor termelését kezdik meg, mely VEGF felszabadulást eredményez. Normál körülmények között alapvető szerepe van a magzati szervezetben az érrendszer kialakulásában, a későbbiekben a növekedésben, valamint sérüléseket követő regenerációban. Több közlemény számolt be az intravénás illetve plazmával génterápiás módon bejuttatott VEGF remodelling gátló hatásáról. Patkányoknál infarktust követően a szöveti VEGF és a VEGF receptorok fokozott expresszióját figyelték meg.

A fiziológiás szerepén túl bizonyos kórállapotokban is jelentős szereppel bír. Daganatos betegségekben történő felszabadulása segíti a tumorok növekedését, növeli az áttétképző hajlamot. A diabéteszes retinopátia kialakulása során a diabéteszes angiopátia okozta elégtelen vérellátás következtében megnövekedik a VEGF produkció, mely hatására túlzott érképződés indul. A túlzott neovaszkularizáció a retina funkciójával interferál, mely végső soron a látás elvesztését okozhatja. Hasonló patomechanizmussal alakul ki az idős korban észlelhető makula degeneráció. Az anti-VEGF terápiák eredményességét széles körben vizsgálják a fent említett kórállapotokban.

HO-1

A 70-es években fedezték fel a számtalan sejtszintű és szöveti szabályozó hatással rendelkező endoteliális relaxáló faktort. A 80-as években derült fény arra, hogy az endoteliális relaxáló

faktor valójában a gáz halmazállapotú nitrogén-monoxid (NO). Ezen felfedezés nyitott utat egy másik, fiziológiás körülmények között a szövetekben termelődő gáz, a szénmonoxid szabályozó szerepének vizsgálatára.

A szénmonoxid képződéséért a hem oxigenáz felelős. A mikroszómális hem oxigenáz végzi a hem oxidatív lebontását, mely során biliverdin, szénmonoxid és Fe^{2+} keletkezik. Emlősökben a hem oxigenáz-nak három, különböző gén által kódolt izoformja, HO-1, HO-2 és HO-3 található. A HO-3, mely struktúráisan a HO-2-vel mutat nagy hasonlóságot, kis jelentőséggel bír. A HO-nak antioxidáns mechanizmusa révén védő szerepet tulajdonítanak, melyet a stressznek kitett szövetekben mérhető emelkedett szintje is magyaráz (emiat sorolják a hősokk proteinek csoportjába).

A HO aktivitás következtében létrejövő CO vizsgálata kapcsán igazolódott endogén transzmitter szerepe. Biológiai hatását a ciklikus guanil-monofoszfát (cGMP) képződésért felelős guanil cikláz enzimre hatva fejt ki. Az érfalakban képződő CO a vaszkuláris tónus és trombocita funkció szabályozásának fontos eleme. A genetikai modifikációval elért fokozott hem oxigenáz-1 expresszió igazoltan neuroprotektív hatással bír iszkémiás cerebrális inzultus esetén.

Iszkémia-reperfúzió hatására a szöveti HO-1 szint csökkenés figyelhető meg.

A meggy-mag-kivonat és hatásai

A meggy-mag-kivonat elkészítése során a meggy-magok csonthéját kiszáradásukat követően eltávolítják. Belső részüket őrlik és Soxhlet-extraktor segítségével, n-hexánnal kivonatot készítenek. A kivonat elemzése kapcsán (UV, infravörös, gáz kromatográfia és tömeg spektroszkópia) kimutatták, hogy az olajos fázis triglicerideket, olajsavat, α -tokoferolt, toko-trienolokat és tokoferol szerű anyagokat tartalmaz. A szilárd fázisban számtalan biológiailag aktív vegyületet található, mely 2-4%-a cianid, 1-3%-a polifenol, 1-4%-a flavonoid, 1-3%-a növényi sav, 1-2%-a pro- és antocianidin, 1%-a transz-reszveratrol, 1%-a stilbene és 1%-a katekin. Korábbi vizsgálatok igazolták a meggy-mag-kivonat erős antioxidáns és hem oxigenáz-1 induktor hatását (patkány retinában, diabéteszes egyénektől vett vér leukocita tenyészetekben). 2 hetes kezelést követően, dózis függő protektív hatását bizonyították (10 és 30 mg/kg kivonatot tartalmazó táppal etetett állatok) egészséges patkány retina, illetve egészséges patkány, izolált szívizom preparátum iszkémia-reperfúziója kapcsán, az állatokra kifejtett bármilyen káros mellékhatás észlelése nélkül.

CÉLKITŰZÉSEK

Nyúl állatmodell alkalmazásával, két kísérleti elrendezésben kerestük a választ arra, hogy milyen hatással van a fokozott alimentáris koleszterin bevitellel indukált hiperkoleszterinémia a kardiovaszkuláris paraméterekre és a szöveti markerekre, valamint, hogy az így létrehozott hiperkoleszterinémiás állatmodellben megfigyelhető-e kedvező hatása a hem oxigenáz-1 induktor meggy-mag-kivonatnak.

Kíváncsiak voltunk, hogy a 2%-os koleszterinnel dúsított táppal végzett etetés milyen mértékű szérumszint emelkedést okoz nyúl állatmodellben, valamint, hogy a behatási idő (12 és 40 hét) mennyire befolyásolja a hiperkoleszterinémia kardiovaszkuláris és molekuláris hatásait.

Vizsgálatuk, hogy az így előidézett hiperkoleszterinémia milyen hatással van a torakális ateroszklerózisra; az *in vivo*, szívvultrahanggal mérhető funkcionális paraméterekre; az *ex vivo*, izolált szívműködés preparátumon mérhető funkcionális paraméterekre; a szívizomban kialakult infarktus mértékére; a szívizomban található citokróm c oxidáz (COX) protein mennyiségére és aktivitására; a szívizomban található hem oxigenáz-1 (HO-1) és vaszkuláris endoteliális növekedési hormon (VEGF) proteinek mennyiségére.

Előző kísérleteink alapján kíváncsian vártuk, hogy a meggy-mag-kivonat addíció 16 hetes behatási idő esetén milyen hatással van a fent említett paramétereket.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és a hiperkoleszterinémiás állapot elérése

Vizsgálatainkban 2-2.5 kg testsúlyú, felnőtt, hím, New Zealand típusú nyulakat használtunk. Kísérleteink során az állatvédelmi törvénynek és ennek végrehajtása tárgyában megjelent országos (243/1998.(XII. 31.) számú, az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet) és nemzetközi (a National Society of Medical Research által kiadott „Principles of Laboratory Animal Care”) szabályzatoknak megfelelően jártunk el. A kísérletek elvégzését a Debreceni Orvostudományi Egyetem Állatkísérleti Tudományetikai Bizottsága jóváhagyta.

A nyulakat laboratóriumi nyúltáppal etettük (ad libitum):

- a kontroll csoport (Kontroll) normál laboratóriumi nyúltápot,
- a hiperkoleszterinémiás csoport (HC) 2%-os koleszterinnel dúsított tápot,
- a meggyimag-kivonattal végzett kísérletben a kezelt csoport (HC+MMK) 2%-os koleszterinnel, plusz 30 mg/kg meggyimag-kivonattal (MMK) dúsított tápot kapott.

Az állatokat két kísérleti protokoll alapján 7 csoportba osztottuk. A hiperkoleszterinémia hatásainak idő-függését vizsgálva 4 csoportot alakítottunk ki.

12 és 40 héten keresztül normál nyúltáppal etetett állatok:

- Kontroll 12 (n=4) csoport és
- Kontroll 40 (n=4) csoport

12 és 40 héten át 2% koleszterint tartalmazó táppal etetett állatok:

- HC 12 (n=4) csoport és
- HC 40 (n=4) csoport.

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben 3 csoportot vizsgáltunk.

- 16 hétig normál nyúltáppal etetett állatok: Kontroll csoport (n=6)
- 16 hétig 2% koleszterint tartalmazó táppal etetett állatok: HC csoport (n=6)
- 16 hétig 2% koleszterint + 30 mg/kg meggyimag-kivonatot tartalmazó táppal etetett állatok: HC+MMK csoport (n=6).

Szérumból koleszterinszint mérés

Rendszeres időközönként szérumból koleszterinszint meghatározás történt. A szérumból koleszterinszintet vénás vérből határoztuk meg Cardio Check készülékkel, minden állatnál, az előre meghatározott protokollnak megfelelő időpontban.

Echokardiográfia

Szívultrahangos vizsgálatok felületes anesztéziában (15 mg/kg ketamin + 3 mg/kg xylazin i.m.) történtek. A mellkas szőrét leborotváltuk, az állatokat hátukra, a csúcsi metszetek elkészítése során bal oldalukra fektettük. A felvételeket digitális formában (CD, illetve magneto-optikai lemez) rögzítettük, a kiértékelés későbbi időpontban történt. A szívultrahangos vizsgálat kapcsán a human vizsgálatoknak megfelelő standard metszeteket, véráram- és szöveti Doppler görbéket rögzítettünk a következő protokoll szerint:

2D paraszternális hossztengetelyi metszet,

2D paraszternális rövidtengetelyi metszet a papilláris izmok magasságában,

150 mm/sec futási sebességgel készített, 2D alapján pozícionált M-mód kép a papilláris izmok magasságában (paraszternális hossz- és rövidtengetelyi metszetből is elkészítve),

csúcsi 4 üregi metszet,

csúcsi 2 üregi metszet,

bal kamrai beáramlási spektrális pulzatilis Doppler görbe,

bal kamrai kiáramlási pálya spektrális pulzatilis Doppler görbe,

mitrális laterális és szeptális, valamint trikuszipidális anulus spektrális szöveti Doppler görbe.

A mérések kapcsán 0.1 mm-es pontosságot, leading-edge to leading-edge módszert alkalmaztunk, a 3-5 egymást követő szív ciklus során mért értéket átlagoltuk.

M-mód képből mértük az interventrikuláris szeptum (IVSTD) és a bal kamra hátsó fal (PWTD) diasztolés vastagságát, a bal kamrai vég-szisztolés (LVESD) és vég-diasztolés (LVEDD) átmérőket, paraszternális hossztengetelyi képből az aorta gyök és bal pitvar antero-posterior átmérőjét. A fenti adatokból kiszámoltuk a frakcionális rövidülést (Fractional shortening = FS), a bal kamrai ejekciós frakciót (EF) és a bal kamrai izomtömeget (LVMASS) az alábbi képletek segítségével:

$$FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD * 100$$

$$EF = (LVEDD^2 - LVESD^2) / LVEDD^2 * 100$$

$$LVMASS = 1.05 * [(LVEDD + PWTD + IVSTD)^3 - LVEDD^3]$$

Mértük a vér bal kamrai kiáramlás sebesség-idő integrálját, az aorta áramlás csúcssebességét, a bal kamrai beáramlás korai (E) és pitvari komponens (A) csúcssebességét, az E hullám decelerációs idejét (DT), a mitralis lateralis és septalis anulus, valamint a tricuspidalis latetralis anulus systoles (S'), korai (E') és késői (A') diasztolés szöveti sebességét.

Szívizom izolálás és az izolált dolgozó szívizom rendszer leírása

A nyulakat a kísérleti időszak végén (az idő-függés vizsgálatában 12 és 40 hét után, a meggyomag-kivonattal végzett kísérletben 16 hét után) áldoztuk fel. 1000 E Na-heparin intravénás (tromboembólia kivédésére) és ketamin/xylazin (40/5 mg/kg) kombináció (analgesia) intramuszkuláris adását követően az állatok szívét torakotómia során eltávolítottuk és jéghideg pufferbe helyeztük. Az aortát kanüláltuk, majd a szívet 5 percig Langendorff módban (retrográd) perfundáltuk átmosás céljából 100 vízcentiméter folyamatos nyomással (10 kPa). A perfundáló oldat módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer volt, melyet előzőleg 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével telítettük (pH: 7,4, 37 °C).

A bal pitvar kanülálását követően a szívet dolgozó módba kapcsoltuk, mely során a puffer anterográd irányba áramlik. Ebben az esetben a bal pitvarba bevezetett perfúziós puffer oldat a bal kamrán keresztül az aortába jut. Innen az oldat egy része egy az áramlás mérésére alkalmas csőrendszerbe, másik része a koronáriakon keresztül a sinus coronariusba, majd a jobb pitvarból a jobb kamrába, innen a felvágott pulmonális artérián keresztül a szív alatt elhelyezett üvegtégelybe kerül – koronária átáramlás.

A fent leírt rendszerben a bal pitvari nyomást (bal kamrai előterhelés) 17 cm puffer oldat nyomására (1.7 kPa), az aorta nyomást (bal kamrai utóterhelés) 90 cm puffer oldat nyomásra (9 kPa) állítottuk be.

Az izolált szívbe szúrt ezüst elektróda segítségével folyamatos EKG monitorozást végeztünk. Az aorta kiáramlás mérésére kalibrált áramlásmérőt használtunk. A koronária átáramlást az időegység alatt a szívből kicsepegő puffer mennyiségének mérésével határoztuk meg. A bal kamra által generált nyomást (Left Ventricular Developed Pressure) a kiáramlási szár oldalára csatlakoztatott nyomásmérővel mértük.

Globális iszkémia kiváltása, majd reperfúzió végzése

10 perces aerob perfúziót követően rögzítettük a kiindulási paramétereket. Ezután 30 percig globális szívizom iszkiémiát hoztunk létre a perfúziós oldat keringetését végző perisztaltikus pumpa leállításával, valamint a pitvari beáramlási és aorta kiáramlási kanülok lezárásával.

A globális iszkémia megszüntetését követően az aritmia előfordulásának csökkentése érdekében (a kiinduláshoz hasonló módon) 10 perces Langendorff szerinti perfúziót végeztünk, majd ismét dolgozó módba kapcsoltuk a szívet és 120 percig ebben az állapotban tartottuk (reperfúziós fázis).

Funkcionális mérések

Mivel a koleszterindús táppal 40 hétig etetett csoportban az izolált szívek nyugalmi paraméterei drasztikusan leromlottak, az idő-függési vizsgálatban a szíveket egyik csoportban sem tettük ki iszkémia-reperfúciónak, vagyis a funkcionális paramétereknek csak a nyugalmi értékeit határoztuk meg. Ezzel szemben a meggyimag-kivonat hatásának vizsgálata során az izolált szíveket a nyugalmi méréseket követően iszkémia-reperfúziós provokációnak tettük ki, ezután két időpontban (a reperfúzió 60. és 120. percében is) lemértük a funkcionális paramétereket.

Az izolált szívizmokon végzett kísérlet teljes ideje alatt rögzítettük a szívfrekvenciát és a bal kamrai nyomást, valamint a globális iszkémia előtt és a reperfúzió 60. illetve 120. percénél megmértük az aorta ki- és a koronária átfolyást.

Az infarktusos terület méretének meghatározása

Az izolált szívizmon végzett méréseket követően 100 ml, foszfát pufferben oldott 1%-os trifetil-terta-zolium klorid oldatot (TTC) juttattunk az aorta kanülbe. A fehér színű TTC élő szövetben, az ott található dehidrogenáz enzimek révén redukálódik és sötétpiros színű trifetil-formazánná (TFF) alakul. Az elhalt területeken a TTC nem alakul át, ezért a terület fehérre festődik. A módszert kiterjedten alkalmazzák szívizom infarktus post-mortem kimutatására. A TTC beadását követően a szíveket -70 °C-ra fagyasztottuk a későbbi feldolgozás céljából.

A fagyasztott szívizommintákat a transzverzális síkban, az apiko-bazális tengellyel párhuzamosan, 2-3 mm-es szeletekre vágtuk. A szeleteket lemértük, szárítottuk, majd két üveglap közé helyezve szkenneltük. Számítógépes planimetriás szoftver segítségével a metszeteken az infarktusos területeket körberajzoltuk és (pixel denzitás elven) az infarktusos területek méretét meghatároztuk. Az adott szív egyes szeletei tömegének és területének, valamint az infarktusos szívizom területek ismeretében kiszámoltuk a szívizom teljes tömegét (rizikó zóna) és az infarktusos szívizom tömegét (infarktus zóna). Az infarktusos terület nagyságát az infarktus zóna rizikó zónára vonatkoztatott százalékában fejeztük ki.

Az ateroszklerotikus léziók analízise

Az aortában látható zsíros csíkok kvantifikációját Sudan III festékkel végeztük. A torakális aortát kipreparáltuk, a környező kötőszövetet és zsírszövetet leválasztottuk. Az így nyert mintákat módosított Krebs-Henseleit pufferben mostuk, majd 10 v/v %-os formalin pufferben fixáltuk. Az ereket hosszában felvágtuk, majd 37 °C fokos vízfürdőben 5 mg/ml töménységű Sudan III-at tartalmazó, 70 v/v %-os izopropanollal 15 percig inkubáltuk. Ezt követően 70%-os izopropanollal többszöri öblítést végeztünk a felesleges festék eltávolítása céljából. Az így előkészített artériákat üveglemezek közé helyezve, számítógépes technikával meghatároztuk az ateroszklerotikus plakkok kiterjedtségét (azok teljes érfelszínre vonatkoztatott százalékát).

Citokróm c oxidáz (COX) aktivitás mérése

A nyúl miokardium citokróm c oxidáz aktivitásának mérésére kolorimetriás assay kit-et használtunk. MITOISO1 kittel frissen kivett szívizomból mitokondriumokat izoláltunk. A mitokondriumokat dithiothreitolal kezeltük a citokróm c redukálása végett, melyet COX mediálta reoxidáció követett. A COX aktivitás mérését szobahőmérsékleten végeztük. Az aktivitást a ferrocitokróm c abszorbancia csökkenésével jellemeztük, mely a redukált formából oxidáltba való alakulásakor következik be 550 nm-es fénytartományban. A COX aktivitást $-\Delta A_{550}/\text{min}$ formában fejeztük ki.

Western blot analízis

A szívizom mintákat (100 µg) Clontech extrakciós pufferban homogenizáltuk, majd azonos mennyiségű sodium dodecyl sulfate (SDS) puffer hozzáadását követően 10 percig forraltuk. Ezt követően a fehérjéket 12% SDS polyacrylamide gélen 120 V-tal futtattuk. A gél nitrocellulóz membránra helyeztük, a szétválasztott fehérjéket a 100 V feszültség alkalmazásával a membránra juttattuk és 1 órán át transzfer pufferban állni hagytuk. A membránt 1 órás TBS-T kezeléssel blokkoltuk, majd 4°C-on egy éjszakán át a kiválasztott primer antitestekkel (HO-1, VEGF, COX III, COX IV, GAPDH) inkubáltuk. 3 alkalommal történő TBS-T mosás után 1 órán át TBS-T és 1 m/v %-os zsírmeszes tejport tartalmazó oldatban lévő 1:2000 hígítású torma-peroxidázzal konjugált szekunder antitestekkel inkubáltuk. A fehérjéket változó röntgen film segítségével mutattuk ki, majd a szkennelt

Western blot minták HO-1 (hem oxigenáz 1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), COX III (citokróm c oxidáz III), COX IV (citokróm c oxidáz IV) és GAPDH (glyceraldehyd-3 foszfát dehidrogenáz) fehérje tartalmának kvantitatív analízisét el végeztük. Az egyes fehérjéknek megfelelő csíkok jelintenzitását megbecsültük és önkényes mértékegységben fejeztük ki.

Statisztika

Az eredményeket számtani közép $\pm$ SD vagy számtani közép $\pm$ SEM formában adtuk meg. Először egyutas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk az egyes csoportok átlagértékeinek összehasonlítására. Ha a csoportok közötti különbség szignifikáns volt, az egyes csoportokat Tukey teszttel hasonlítottuk össze. A különbséget $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Mivel a disszertáció alapját képező két kísérlet elrendezése igen hasonló volt és a kapott eredmények – egymást erősítve – részben átfedtek, a két vizsgálat eredményeit párhuzamosan mutatom be.

Szérum koleszterinszint változásai

A táplálékkal bevitt koleszterin mindkét kísérleti elrendezésben folyamatosan növelte a szérum koleszterinszintet, míg a koleszterinmentes táppal etetett állatok koleszterinszintje nem változott. Az idő-függés vizsgálatban a 8. héttől, a meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben a 4. héttől kezdődően a koleszterindús táppal etetett nyulak koleszterinszintje szignifikánsan magasabb volt a normál táppal etetett nyulakénál. A meggyimag-kivonattal kezelt (HC+MMK) állatok koleszterinszintje a 8. héttől kezdődően szignifikánsan magasabb volt a normál táppal etetett nyulakénál, a 16. héten pedig szignifikánsabb alacsonyabbnak bizonyult a csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatokéhoz képest.

A torakális aortában észlehető ateroszklerotikus plakkok kiterjedtsége

Mindkét vizsgálatban a koleszterindús táppal etetett állatok torakális aortájában erőteljes ateroszklerotikus plakk képződés volt megfigyelhető. Az idő-függési vizsgálat eredményei szerint a hosszabb ideig tartó koleszterindús táplálás szignifikánsan növelte a plakkok kiterjedtségét. A meggyimag-kivonat hozzáadása a koleszterindús táphoz (HC+MMK csoport) ugyanakkor szignifikáns mértékben csökkentette az ateroszklerotikus plakkok kiterjedését a nyulak aortájában a csak koleszterindús tápot kapó állatokéhoz képest (HC csoport). A normál táppal etetett nyulak torakális aortájában nem mutatkozott ateroszklerózis.

Echokardiográfia

Az idő-függési vizsgálatban jelentős eltéréseket észleltünk a bal kamra funkcionális paramétereiben, melyek a bal kamra szisztolés ürülését jellemzik (frakcionális rövidülés, ejekciós frakció). A koleszterindús táppal hosszan etetett (HC 40) állatok frakcionális rövidülése és ejekciós frakciója szignifikánsan alacsonyabb volt, mind a normál táppal etetett (Kontroll 40), mind a koleszterindús táppal rövid ideig (HC 12) etetett állatok értékeihez képest, egyéb paraméterekben szignifikáns eltérést nem észleltünk.

A meggymag-kivonat hatásának vizsgálata során, ami csak 16 hétig követte az állatok sorsát, nem észleltünk szignifikáns eltérést a szisztolés paraméterekben és az anatómiai méretekben a három csoport között. A szöveti Dopplerrel mért E'/A' érték (a kora diasztolés és késő diasztolés sebességek hányadosa, ami a diasztolés funkciót jellemzi) a normál táppal etetett (Kontroll) és a meggymag-kivonatot is kapó (HC+MMK) állatoknál nagyobb volt, mint 1, míg a csak koleszterindús táppal etetett állatoknál (HC) 1-nél kisebb arányt mértünk. A kontroll állatok (Kontroll) és a meggymag-kivonatot tartalmazó koleszterindús táppal ellátott (HC+MMK) állatok értékei között szignifikáns különbséget nem észleltünk. A csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatok E'/A' értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a másik két csoporthoz (Kontroll, HC+MMK) képest.

Hemodinamikai mérések

Az izolált szívizom preparátumokon a következő hemodinamikai paramétereket mértük: szívfrekvencia, aorta kiáramlás, koronária átáramlás, a bal kamra által generált nyomás (LVDP). Az idő-függési vizsgálatban, az echokardiográfiásan meghatározott bal kamrai szisztolés funkciós paraméterekkel összhangban, a koleszterindús táppal etetett állatoknál már a nyugalmi aorta kiáramlásban jelentős eltéréseket észleltünk. A hosszú hiperkoleszterinémias állapotot reprezentáló csoportba (HC 40) tartozó szívek az izolálást követően gyakran képtelenek voltak effektív munkát végezni (aorta illetve koronária flow: 0 ml/perc), ezért ebben a kísérletben globális iszkémia provokációt nem végeztünk.

Az idő-függési vizsgálatban a hosszú hiperkoleszterinémias állapot (HC 40) szignifikáns kiáramlás csökkenést eredményezett. Az aorta kiáramlás ebben a csoportban mind a kontroll csoportokénál (Kontroll 12, Kontroll 40), mind a rövidebb hiperkoleszterinémias hatásnak kitett csoporténál (HC 12) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult.

A meggymag-kivonat hatásának vizsgálatakor a nyugalmi hemodinamikai paraméterekben nem volt szignifikáns különbség a három csoport között. Az iszkémia-reperfúziós provokációt követően minden vizsgált paraméter csökkenést mutatott a kiindulási értékekhez képest. Az aorta kiáramlás mind a 60., mind a 120. perc reperfúzió után szignifikánsan alacsonyabb volt a koleszterindús táppal etetett (HC és HC+MMK) csoportokban a normál táppal etetethez (Kontroll) képest. A meggymag-kivonattal kezelt csoportban (HC+MMK) azonban 60 és 120 percnél is szignifikánsan magasabb aorta kiáramlást mértünk a csak koleszterindús tápot kapó csoporthoz (HC) képest.

A koronária átáramlás hasonlóan a többi paraméterhez, a globális iszkémiát követően, mindhárom csoportban, az idő függvényében csökkent. A három csoport értékeiben csak 120 percnél volt szignifikáns különbség megfigyelhető. A Kontroll csoport értékei szignifikánsan magasabbak voltak a koleszterin dús táppal etetett másik két csoporthoz képest (HC és HC+MMK), valamint a meggyimag-kivonattal kezelt csoport értékei (HC+MMK) szignifikánsabban magasabbak voltak a csak koleszterindús tápot kapó (HC) állatok értékeinél (az aorta kiáramlás vizsgálata során kapott eredményekkel egybevetve).

Az infarktusos területek mérete

Az idő-függés vizsgálata során a 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) szívében szignifikánsabb nagyobb infarcterált területet kaptunk, mint a koleszterindús tápot csak 12 hétig kapó állatoknál (HC 12) illetve a 40 hétig normál táppal etetett állatok (Kontroll 40) esetében. Megjegyzendő, hogy a koleszterindús táppal 40 hétig etetett állatok (HC 40) szíveiben az infarktusos szövet foltos-csíkos mintázatot mutatott (vagyis nem alkotott egyetlen összefüggő részt), melyet mint teljes infarcterált régiót (Total Infarcted Region) határoztunk meg.

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletek során a globális iszkémiát követő 120 perc reperfúzió után szignifikánsan nagyobb infarktusos területet kaptunk a csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatoknál, mint a normál táppal etetett állatok (Kontroll) esetében. A meggyimag-kivonattal kezelt állatok (HC-MMK) esetében viszont az infarktusos terület szignifikánsabb kisebb volt a csak koleszterindús táppal etetett állatokhoz (HC) képest, sőt a HC-MMK csoport nem különbözött szignifikánsan a Kontroll csoporttól.

A citokróm c oxidáz (COX) aktivitás

Az idő-függési vizsgálatban a citokróm c oxidáz (COX) aktivitás a koleszterindús táppal etetett (HC 12, HC 40) állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a normál diétán tartott (Kontroll 12, Kontroll 40) állatokhoz képest. A 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) COX aktivitása viszont szignifikánsan magasabb volt, mint a 12 hétig etetett (HC 12) állatoké.

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben az iszkémia-reperfúziót követően történtek a mérések. A csak koleszterindús táppal etetett állatok esetén szignifikánsan alacsonyabb COX aktivitást mértünk mind a normál táppal etetett, mind a meggyimag-kivonattal is kezelt állatokhoz képest.

A szívizomban mérhető COX III, HO-1 és VEGF fehérjék mennyisége

A COX III, a hem oxigenáz-1 (HO-1) és a vascular endothelial growth factor (VEGF) fehérjék mennyiségét Western blot technikával határoztuk meg a szívizomokban.

A COX III mennyisége az idő-függési vizsgálatban a COX aktivitással egyező mintát mutatott, a 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatokban (HC 40) szignifikánsan magasabb mennyiséget mértünk, mint a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 12) szívében.

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérlet során az iszkémia-reperfúzió átesett szívek között a meggyimag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús tápot kapó csoportban (HC+MMK I/R) szignifikánsan magasabb COX III mennyiséget mértünk, mint a többi csoportban.

A HO-1 mennyisége az idő-függési vizsgálatban a koleszterindús táppal etetett állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a normál táppal etetett állatokban, ezen túl a 40 hétig koleszterindús tápot kapó csoportban (HC 40) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a koleszterindús tápot csak 12 hétig kapó (HC 12) csoportban. A meggyimag-kivonat vizsgálata során a koleszterindús táppal etetett állatok (HC nyugalmi, HC I/R, HC+MMK I/R) szívében a kontrollhoz képest alacsonyabb HO-1 mennyiség volt mérhető. A meggyimag-kivonattal kezelt koleszterindús táppal etetett állatok szívében az iszkémia-reperfúziót követően (HC+MMK I/R) szignifikánsan magasabb HO-1 mennyiséget mértünk, mint a csak koleszterindús táppal etetett állatok (HC I/R) iszkémia-reperfúzió átesett szívében.

A VEGF mennyiségében sem az idő-függési, sem a meggyimag-kivonat hatását felmérő vizsgálatban nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között.

MEGBESZÉLÉS

Munkánk során a fokozott alimentáris koleszterin bevitel okozta hiperkoleszterinémia hemodinamikai és szövettani következményeit vizsgáltuk, továbbá a szintén alimentárisan bejutott, bizonyítottan HO-1 induktor hatású meggy-mag-kivonat hatását mértük fel a hiperkoleszterinémia okozta elváltozásokra nyúl állatmodellben.

Szérum koleszterinszint

A vizsgálatainkban alkalmazott, 2% koleszterint tartalmazó táppal *ad libitum* etetett nyulakban hiperkoleszterinémiás állapot alakult ki. A szérum koleszterinszint az eltelt hetekkel párhuzamosan emelkedett. A mmol/l-ben mért szérum koleszterinszintek csaknem megegyeztek az eltelt hetek számával. A normál $2 \pm 0,5$ mmol/l körüli érték így az időfüggési vizsgálatban a 12 hetes kezelés végére $14 \pm 1,3$ mmol/l-ra, a 40 hetes kezelés végére $37 \pm 3,5$ mmol/l-ra, a meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló 16 hetes kísérlet végére pedig $24 \pm 1,6$ mmol/l-ra emelkedett. A nyúl szervezetére ezzel egy egyre fokozódó hiperkoleszterinémiás teher hárult, melynek következményei az idő előrehaladtával halmozottan jelentkeztek. Ez magyarázza az időfüggési vizsgálatban a HC 12 és HC 40 csoportok közötti szignifikáns különbségeket, valamint a 40. hét után észlelt markáns anatómiai és fiziológiai eltéréseket.

Familiáris hiperkoleszterinémia

A humán gyógyászatban familiáris hiperkoleszterinémiás betegekben mérhetünk a kísérleteinkben előfordulóhoz hasonlóan magas szérum koleszterin értékeket, illetve figyelhetünk meg hasonló patológiás elváltozásokat. A primer hiperlipidémiákat a WHO/Fredrickson klasszifikáció alapján osztják különböző csoportokba. Fokozott ateroszklerózis a magas szérum LDL szinttel járó familiáris hiperkoleszterinémiában (II.a) és familiáris kevert hiperlipidémiában (II.b) figyelhető meg. A betegség patomechanizmusa az LDL receptor elégtelen működése, mely miatt az LDL clearance nem megfelelő. A vérben a magas koleszterin tartalmú LDL felhalmozódik, ott szabadgyökök hatására oxidálódik. Az oxidált LDL-t makrofágok veszik fel, melyek az érfalba migrálva (habos sejtek) a T limfocitákkal együtt alkotják az ateroszklerotikus plakk magját. Ennek következtében a betegek szervezetében kiterjedt ateroszklerózis figyelhető meg, mely miatt igen korai életkorban jelentkezik koronária szklerózis, szívizom infarktus (legfiatalabb 2 éves korban),

stroke, perifériás verőér betegség. A homozigóta betegek átlagosan 30-40 éves korukban, valamely érbetegség szövődményében halnak meg. A betegség kezelésében a különböző támadáspontú gyógyszerek kombinációja mellett alkalmaznak monoklonális antitesteket, génterápiát, a dialízishez hasonló elven működő LDL-aferezist, valamint májtranszplantációt is.

Az emelkedett szérum koleszterin szint kardiovaszkuláris hatásai

Torakális ateroszklerózis

A torakális aortában kialakult ateroszklerózis a hiperkoleszterinémia makrovaszkuláris szövődményeinek látványos megjelenési formája. A zsigeri erek és az alsóvégtag ereinek szűkítése révén azokban krónikus vérellátási zavart, az oxigénigénytől függő mértékű iszkémiás fájdalmat (és pl. klaudikációt) okoz.

Kísérleteinkben a normál táppal etetett állatok torakális aortájában ateroszklerotikus plakk nem ábrázolódott. Már 12 és 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés jelentős torakális ateroszklerózist provokált, az aorta plakkok kiterjedése a teljes érfelszín $61 \pm 14\%$ -a és $75 \pm 11\%$ -a volt, mely a normál táppal etetett állatokhoz képest szignifikánsan nagyobbak bizonyult. A 40. hét végére az ateroszklerotikus léziók progressziója volt megfigyelhető (a teljes érfelszín $88 \pm 5\%$ -a), mely szignifikánsan nagyobb mind a normál, mind a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest.

Miokardiális iszkémia és infarktus

A makrovaszkuláris eltérések mellett súlyos koronária szklerózis következményei is tetten érhetők voltak vizsgálatainkban. Az idő-függési vizsgálatban kapott eredményeket a következőképpen értelmezhetjük.

A magas koleszterin szint hatására a generalizált ateroszklerózis részjelenségeként súlyos koszorúsér szklerózis jelentkezett, mely következtében miokardiális iszkémia és infarktus alakult ki. Az infarktusz terület a 12 hetes koleszterindús táppal történő etetést követően ($1,7 \pm 2,65\%$) nem különbözött szignifikánsan a normál táppal etetett állatokétól, azonban a 40. hét végére a szívizom $32 \pm 8,6\%$ -a volt elhalt terület, mely szignifikánsan magasabb mindkét csoporthoz képest. A TTC festés kapcsán a HC 40 állatokban a szívizom infarktuszos területek helyenként nagyobb, összefüggő területeket alkottak, máshol foltos, csíkos megjelenést mutattak. Ez a kettős mintázat arra utal, hogy az állatok szívében mind az ST elevációs, mind

a nem ST elevációs infarktusnak megfelelő patomechanizmus szerepet játszott a nekrotikus területek kialakulásában.

Az in vivo elvégzett szívlultrahangos vizsgálat az infarktusos és aktuálisan iszkémiás szívizom területek következtében kialakult csökkent szisztolés funkciót igazolta. A 40 hetes koleszterindús táppal történt etetést követően a bal kamra szisztolés funkciót jellemző paraméterek (frakcionális rövidülés és ejekciós frakció) szignifikánsan kisebb értéket mutattak a többi csoporthoz képest. A HC 40 csoportban ($20 \pm 3\%$) a frakcionális rövidülés a Kontroll 12 ($35 \pm 5\%$), Kontroll 40 ($33 \pm 4\%$) és HC 12 ($32 \pm 6\%$) állatoknál mért értékeknél szignifikánsan kisebb volt. Az ejekciós frakció a frakcionális rövidüléssel azonos módon változott, a HC 40 állatokban ($38 \pm 5\%$) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a többi csoportban (Kontroll 12: $60 \pm 7\%$, Kontroll 40: $58 \pm 6\%$, HC 12: $55 \pm 9\%$).

Az ex vivo izolált szívizom preparátumon kivitelezett mérések a szívlultrahangos eredményekkel egyező képet igazoltak. A 40 hétig tartó koleszterindús táplálást követően a szívmok a vizsgálati rendszerben beállított utóterheléssel szemben gyakran képtelenek voltak érdemi aorta kiáramlást létrehozni, a mért értékek ($4,6 \pm 11,4$ ml/perc) szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a másik három csoportban (Kontroll 12: 146 ± 53 ml/perc, Kontroll 40: 120 ± 18 ml/perc, HC 12: 72 ± 18 ml/perc).

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben, a 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés hatására, a bal kamra szisztolés funkcióját in vivo jellemző frakcionális rövidülésben és ejekciós frakcióban, valamint ex vivo az aorta kiáramlásban és a bal kamra által generált nyomásban a vizsgált csoportok (Kontroll, HC, HC+MMK) között szignifikáns különbség nem volt.

A fentiek alapján kísérleti elrendezéseinkben szignifikáns mértékű bal kamra szisztolés funkció csökkenéshez és miokardiális infarktus kialakulásához viszonylag hosszú behatási időre van szükség.

Diasztolés diszfunkció

Általánosságban elmondható, hogy a szívizom funkcióját rontó változások első jele a diasztolés diszfunkció. A diasztolé ugyanis, valójában energiaigényes folyamat, melynek során a szisztolé alatt felszabadult intracelluláris kalcium visszapumpálása zajlik a szarkoplazmatikus retikulumba. A visszapumpálásért felelős fehérje az ATP-igényes Ca^{2+} ATPáz (SERCA2). Diasztolés diszfunkciót számtalan miokardiális és extramiokardiális tényező okozhat.

In vivo a szívultrahang megfelelő módszer mind a szisztolés, mind a diasztolés funkció vizsgálatára. A kora- és késődiasztolés szöveti sebességek aránya normálisan nagyobb, mint 1, diasztolés diszfunkció esetén viszont az arány 1-nél kisebb.

A meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletekben szívultrahanggal szöveti sebesség méréseket is végeztünk, mellyel lehetőséget adott a diasztolés funkció értékelésére. A normál táppal etetett állatok bal kamra diasztolés funkciója megtartott volt ($E'/A' > 1$). A csak koleszterindús táppal etetett állatokban diasztolés diszfunkciót észlelünk, az $E'/A' < 1$ -nek adódott. Az E'/A' arányban a csoportok között a különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (HC kisebb mind a Kontroll, mind a HC+MMK csoporttal összehasonlítva).

Összefoglalva: A 12 hétig tartó koleszterindús táppal történt etetést követően a normál táppal etetett állatokhoz képest szignifikánsan nagyobb kiterjedésű torakális aorta ateroszklerózis, szignifikánsan alacsonyabb aorta kiáramlás volt megfigyelhető. Ezen eltérések a 40 hetes kezelési idő végére szignifikánsan tovább romlottak, mind a normál, mind a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest. A fentiek mellett a szívizomban szignifikánsan nagyobb kiterjedésű teljes infarktusz területet, ennek következtében csökkent bal kamra funkciós paramétereket mértünk.

A fentiekkel összhangban 16 hétig tartó koleszterindús táppal történt etetés mellett torakális ateroszklerózist, diasztolés diszfunkciót detektáltunk.

A meggyimag-kivonat addíció kardiovaszkuláris hatásai

Vizsgálatunkban – legjobb tudomásunk szerint – elsőként tapasztaltuk, hogy a HO-1 induktor hatással bíró meggyimag-kivonat szignifikáns mértékben csökkentette a szérumban koleszterinszintet (HC: $24 \pm 1,6$ mmol/l, HC+MMK: $19,3 \pm 1$ mmol/l). Az, hogy a HO-1 indukció pontosan milyen molekuláris mechanizmussal éri ezt el, jelenleg nem ismert.

A 16 hetes koleszterindús táppal történt etetéshez képest a meggyimag-kivonat addíció szignifikáns torakális ateroszklerózis csökkentő hatással bírt. Az aorta plakkok kiterjedése a HC csoportban a teljes érfelszín $75 \pm 11\%$ -a, a HC+MMK csoportban $58 \pm 6\%$ -a volt.

Iszkémia-reperfúzió

A meggyimag-kivonat hatásának vizsgálata során a nyugalmi szisztolés funkciós paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között. Az izolált

szívek terhelhetőségét felméréndő, 30 perc globális iszkémiának majd 120 perc reperfúciónak tettük ki a preparátumokat. Ez hasonló a humán kardiológiában használatos terheléses vizsgálatokhoz, melynek során a szívizmot provokáljuk és a provokációt követő funkcióváltozás értékelésével nyerünk adatokat a szívizom állapotára. Így nem csak a nyugalmi funkció, hanem benne lévő tartalék (rezerv) megítélésére is lehetőség nyílik.

A HC és HC+MMK csoportok eredményeit értékelve: vizsgálatunkban a meggy-mag-kivonat addíciónak a koleszterin szint csökkenésén túl alimentáris koleszterin bevitellel indukált hiperkoleszterinémiában, számos kedvező hatását figyelhattunk meg. A csak koleszterin dús táppal etetett állatokhoz képest

- szignifikáns mértékben csökkentette a torakális aortában az ateroszklerotikus plakkok méretét (HC: $75 \pm 10\%$, HC+MMK $58 \pm 6\%$),
- javította a bal kamra diasztolés funkcióját (HC E'/A' : $0,98 \pm 0,02$; HC+MMK E'/A' : $1,29 \pm 0,2$),
- iszkémia-reperfúziót követően mind 60 és 120 perccel szignifikáns mértékben növelte az aorta kiáramlást (60 percnél: HC I/R: 34 ± 13 ml/perc, HC+MMK I/R: 49 ± 10 ml/perc; 120 percnél: HC I/R: 6 ± 6 ml/perc, HC+MMK I/R: 15 ± 3 ml/perc),
- iszkémia-reperfúziót követően 120 perccel szignifikáns mértékben növelte a koronária átáramlást (120 percnél: HC I/R: 24 ± 3 ml/perc, HC+MMK I/R: 32 ± 4 ml/perc),
- csökkentette az iszkémia-reperfúziót követően kialakult szívizominfarktus méretét (HC I/R: $47 \pm 4\%$, HC+MMK I/R: $39 \pm 5\%$).

A meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatoknál, az iszkémia-reperfúzió provokációt követően megfigyelhető nekrotikus terület mennyisége, a normál táppal etetett állatokéval közel egyező mértékű volt (infarktus méret: Kontroll I/R: $35 \pm 5\%$, HC+MMK I/R: $39 \pm 5\%$). Az aorta kiáramlási és koronária átáramlási sebesség koleszterin bevitel okozta csökkenését a meggy-mag-kivonat nem védte ki teljes mértékben (60 és 120 percnél szignifikánsan alacsonyabb aorta kiáramlás és 120 percnél szignifikánsan alacsonyabb koronária átáramlás volt mérhető), de a csak koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest mérsékelte azt.

A fentiek alapján a meggy-mag-kivonat kardioprotektív hatással rendelkezik. Ezek a kedvező hatások nyilvánvalóan összefüggésben állnak a hiperkoleszterinémia mérséklésével, de

elképzelt, hogy a koleszterin csökkentő hatás csak egy, a meggymag-kivonat kardioprotektív hatásának többféle mechanizmusa közül.

A hiperkoleszterinémia molekuláris hatásai

Annak vizsgálatára, hogy a meggymag-kivonat milyen molekuláris mechanizmusokon keresztül éri el kardioprotektív hatásait, vizsgálatainkat molekulárbiológiai mérésekkel is kiegészítettük.

Citokróm c oxidáz

A sejt nyugalmi energiatermelésében és iszkémia-reperfúziós sérülésében alapvető jelentőséggel bíró COX szintje és aktivitása kísérleteinkben normál táppal etetett állatoknál az idő függvényében csökkent. Szignifikáns különbség volt a Kontroll 12 (protein: 26 ± 3 , aktivitás: $0,038 \pm 0,004$) és Kontroll 40 (protein: 18 ± 2 , aktivitás: $0,023 \pm 0,002$) csoport értékei között. Koleszterindús táppal történt etetés során a 12 hetes időpontban mért COX szint és aktivitás a kontroll állatokéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt (HC 12 protein: 4 ± 3 , aktivitás: $0,0012 \pm 0,005$), melyhez képest a 40. hétre szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető (HC 40 protein: 13 ± 3 , aktivitás: $0,0015 \pm 0,008$). A 40. hét végére a Kontroll és HC állatok COX szintjében és aktivitásában szignifikáns különbség nem volt. Ennek a pontos magyarázata nem ismert, a feltételezés szintjén mozogva, a csökkent energiatermelésre válaszként adott fokozott COX expresszió lehet.

Az iszkémia-reperfúzió a szívizomban mért COX fehérje mennyiségére HC állatokban nem volt szignifikáns hatással (HC nyugalmi protein: 10148 ± 2892 , HC I/R protein: 11545 ± 3654).

Hem oxigenáz 1

Állatkísérletes modellben igazolták, hogy a magasabb miokardiális HO-1 szint iszkémia-reperfúzió során kardioprotektív hatással bír.

Idő-függési vizsgálatunkban a normál táppal etetett állatok szívizmában mért HO-1 protein mennyisége lényegesen és szignifikánsan magasabb volt, mint a koleszterindús táppal etetett állatoké (HO-1 protein szint: Kontroll 12: $11 \pm 0,5$; Kontroll 40: $10 \pm 0,7$; HC 12: $5 \pm 1,4$; HC 40: $3 \pm 1,2$). A HO-1 szintje az alimentáris koleszterin bevitel idejével párhuzamosan csökkent, a HC 12 és HC 40 értékek között szignifikáns különbség volt megfigyelhető.

A fentiek alapján tehát a hiperkoleszterinémiás állapot időfüggő HO-1 csökkenést eredményez, melynek következtében a HO-1 protektív hatásai kisebb mértékben tudnak érvényesülni.

Iszkémia-reperfúzió vizsgálatunkban a miokardiális HO-1 szintet szignifikáns mértékben nem befolyásolta, tendencia jelleggel annak csökkenését észleltük (HO-1 HC nyugalmi: 5230 ± 7482 ; HC I/R: 1691 ± 353).

A meggyماغ-kivonat hatásai a COX és HO-1 szintekre

HO-1

A meggyماغ-kivonat alkalmazása mellett a HO-1 expressziójának emelkedése várható. Vizsgálatunkban a meggyماغ-kivonat szignifikáns mértékben emelte a koleszterin dús táppal etetett nyúl szívizom iszkémia-reperfúzió utáni HO-1 szintjét (HO-1 HC I/R: 1691 ± 353 , HC+MMK I/R: 4143 ± 2676). Ez a HO-1 emelő hatás azonban a hiperkoleszterinémia HO-1 csökkentő hatásánál gyengébbnek bizonyult, a HC+MMK I/R érték (4143 ± 2676) a Kontroll I/R értéknél (22754 ± 2761) szignifikánsan alacsonyabbnak adódott.

A meggyماغ-kivonat HO-1 emelő hatása szerepet játszhat a torakális ateroszklerózisban, szívultrahangos és haemodinamikai paraméterekben megfigyelhető kedvező hatásában.

COX protein szint és aktivitás

Egy, a HO-1 és a COX szint összefüggését vizsgáló tanulmányban, melyet streptozocinnal cukorbetegé tett patkányok veséjén végeztek, a HO-1 indukció a mitokondriális transzportfolyamatok és a COX szint emelkedésével járt együtt. Munkánk során - az előbb említett tanulmánnyal összhangban - a COX protein szint emelkedését észleltük meggyماغ-kivonat hatására. A 120 perc reperfúzió után a COX mennyisége (HC+MMK I/R: 18779 ± 4960) szignifikánsan magasabb (2.1-1.8-1.6 szorosa) volt mind a kontroll (Kontroll I/R: 8981 ± 2982), mind a koleszterindús táppal etetett állatok nyugalmi (HC nyugalmi I/R: 10148 ± 494) és iszkémia-reperfúziót követő (HC I/R: 11545 ± 3654) szívizmában mért értékekhez képest. A COX aktivitás 120 perc reperfúzió után a meggyماغ-kivonattal kezelt állatok esetében (HC+MMK I/R: $0,034 \pm 0,01$) hasonlóan bizonyult a kontroll állatok COX aktivitás értékéhez (Kontroll I/R: $0,037 \pm 0,009$), annak ellenére, hogy a 2x nagyobb COX protein mennyiség alapján magasabb enzim aktivitást vártunk.

Iszkémia-reperfúziót követően, a kontroll (Kontroll I/R: 8981 ± 2982) és HC állatok (HC I/R: 11545 ± 3654) szívizmában mért közel azonos mennyiségű COX fehérje mellett (16. ábra), a koleszterin dús táppal etetett állatok esetén (HC I/R: $0,022 \pm 0,009$) a kontroll állatokénál (Kontroll I/R: $0,037 \pm 0,009$) alacsonyabb COX aktivitást mértünk.

A fentiek alapján a hiperkoleszterinémia csökkent COX aktivitást okoz. A csökkent COX aktivitás pontos mechanizmusa mindmáig tisztázatlan. Feltehető, hogy a COX aktivitás megváltozott szabályozása, esetleg az emelkedett ROS szint állhat a háttérben.

VEGF változások

A VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) jelentős szerepet játszik az endotélium regenerációjában és az iszkémia utáni neovaszkularizációban. Saját adataink alapján - a várakozásokkal ellentétben - a szívizom VEGF protein mennyiségében nem volt szignifikáns különbség a normál, a csak koleszterindús táppal etetett és a meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok között. A fenti eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy nyúlban a hiperkoleszterinémia okozta változások háttérében, továbbá a meggy-mag-kivonat jótékony hatása mögött a VEGF-től független mechanizmusok állnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink igazolták, hogy 2%-os koleszterint tartalmazó táppal etetett nyúlban, hiperkoleszterinémias állapot hozható létre. A szérumban a koleszterinszint mértéke a behatási idővel egyenesen arányos. 40 hetes etetést követően a szérumban a koleszterinszint és a kialakult patofiziológiai eltérések alapján familiáris hiperkoleszterinémia megfelelő állatmodellt kapunk. Az így kiváltott hiperkoleszterinémia következtében a behatási idővel egyenesen arányos a torakális ateroszklerózis mértéke.

16 hét után a szívultrahanggal mérhető paraméterekben csak diasztolés diszfunkció észlelhető. 40 hét után a súlyos koronária ateroszklerózis következtében miokardiális infarktusok alakulnak ki, melyek súlyos szisztolés diszfunkciót okoznak. A csökkent bal kamra funkció in vivo echokardiográfiával és ex vivo izolált szívizom preparátumon is mérhető.

A szívizom COX szintje és aktivitása normál táppal etetett állatokban az idő függvényében csökken, koleszterindús táppal etetett állatoknál a kezdeti csökkenést követően emelkedik, a 12. héten nagyon alacsony, a 40. héten az ugyanaddig normál táppal etetett állatokéval azonos értéket vesz fel. A hiperkoleszterinémia azonos mennyiségű COX protein mellett csökkent COX aktivitást okoz. Iszkémia-reperfúzió a COX mennyiségét nem befolyásolja.

A hiperkoleszterinémia a miokardiális HO-1 szintet a behatási idővel párhuzamosan csökkenti.

Szignifikáns VEGF változást a hiperkoleszterinémia vizsgálatunkban nem okozott.

A meggy-mag-kivonat addíció a 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés kapcsán szignifikáns mértékben csökkenti a szérumban a koleszterinszintet, a torakális ateroszklerózis mértékét, csökkenti a bal kamra diasztolés diszfunkció kialakulását. Globális iszkémia-reperfúziót követően csökkenti az így kialakult szívizom infarktus méretét, javítja az aorta kiáramlást és koronária átáramlást. A meggy-mag-kivonat növeli a miokardiális HO-1 és COX szinteket, a VEGF-re nincs hatással.

Vizsgálatainkban hiperkoleszterinémias állatmodell segítségével igazoltuk a magas koleszterinszint idő-függő aterogén hatását, valamint hiperkoleszterinémias állapotban a meggy-mag-kivonat koleszterinszint csökkentő és kardioprotektív tulajdonságait.

Eredményeink alapján hiperkoleszterinémias állapotban, mint például a familiáris hiperkoleszterinémia, a meggy-mag-kivonat reális kiegészítő terápiás lehetőséget jelenthet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy ilyen munka megírása hosszú folyamat végeredménye. Mint minden nagyobb eredmény eléréséhez, ehhez is a számtalan apró lépés vezet. Hogy a sors, a szerencse, a véletlenek összjátéka, vagy a Jóisten keze van e mögött, mindenki saját életnézete alapján ítéli meg. Erről, mint sok minden másról, én nem sokat tudok, csak annyit, hogy a munkám írása kapcsán Vaszilij Grosszman „Élet és sors” című művét olvastam. De ez már csak a befutó, a célszalag előtti néhány méter. Hogy idáig eljutottam, sok mindenki segített, akár évekkel azelőtt, hogy ebbe a munkába fogtam volna. Ha nem is végeláthatatlan azoknak a sora, akiknek köszönetet mondanék, de mégsem említhetek mindenkit név szerint, muszáj mértéket tartani.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tószaki Árpád egyetemi tanárnak (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett tanszéken.

Köszönöm témavezetőm, Dr. Juhász Béla egyetemi adjunktus (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), továbbá a tanszék minden dolgozója baráti segítségét munkám során.

Köszönök mindent:

Szüleimnek, akik egész életemben támogattak, nehéz helyzetemben segítettek.

Gyermekeimnek, Gergelynek és Csongornak, akikből a szünni nem akaró energiát nyertem.

Dr. Karsai Dénesnek, gyerekkori barátomnak, akire felnézek és büszke vagyok, aki bármikor felhívhat, és bármikor felhívhatok.

Bélteky Márta matematika tanárnőmnek, akitől azt tanultam, hogy „ha valamit érdemes csinálni, akkor azt érdemes jól csinálni”. Ezt próbáltam, lehetőség szerint munkámban szem előtt tartani.

Prof. Dr. Édes Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Klinika dolgozója lehessek, és munkahelyemen termékeny táptalajt biztosított mind a betegellátás, mind a tudományos munka magas színvonalú végzésére.

Dr. Hegedűs Idának, aki a szívultrahang transzducert először a kezembe adta, mert attól kezdve az echokardiográfia „rabja” vagyok, nem tudok, és nem is akarok szabadulni tőle.

Dr. Bódi Annamáriának, aki lényeglátásával, hatalmas klinikai tapasztalatával, rövid-velős megjegyzéseivel segítette fejlődésem. A kisállat echokardiográfia felé az ő munkássága terelt.

Dr. Csapó Kálmánnak és Dr. Brugós Lászlónak, első főnökeim, akiktől a betegellátás lényegét, a szakma iránti alázatot tanultam.

Munkatársaimnak, akik türelemmel voltak munkám elkészítése kapcsán a mindennapokban.

Dr. Tóth Zsuzsanna Eszternek, aki gondoskodó szeretetével, hasznos tanácsaival, észrevételeivel segítette munkámat.

Tudományos munkánkat részben az Európai Unió által támogatott Új Magyarországért pályázatok és Nemzeti Kiválóság Program keretei között, illetve segítségével finanszíroztuk. Az angol nyelvű publikációk elfogadását nagymértékben segítő formába öntéséért, javításáért Stephanie C. Fox-nak tartozom köszönettel.

A munka anyagi háttérét a következő pályázatok biztosították: OTKA (78223, 104017, K-83478, K-75883); TAMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007; TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045; TAMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001; TAMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0024; Magyar Tudományos Akadémia Thrombosis és Haemostasis munkacsoportja (MTA-DE Vasc. Biol. 11003); Debreceni Egyetem



Iktatószám: DEENKÉTK/401/2013.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kertész Attila Béla

Neptun kód: S5APBH

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

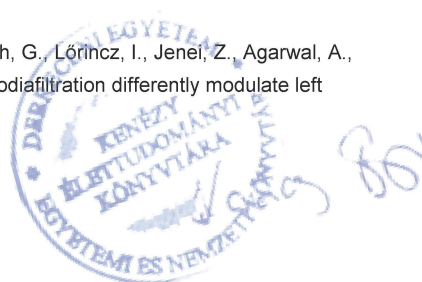
Mtmt azonosító: 10037250

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Juhász, B., **Kertész, A.**, Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D.D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF:3.311 (2012)
2. **Kertész, A.**, Bombicz, M., Priksz, D., Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D.D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: Time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF:2.464 (2012)

További Közlemények

3. Czifra, Á., Páll, A., Kulcsár, J., Barta, K., **Kertész, A.**, Paragh, G., Lőrincz, I., Jenei, Z., Agarwal, A., Zarjou, A., Balla, J., Szabó, Z.: Hemodialysis and hemodiafiltration differently modulate left ventricular diastolic function.
BMC Nephrol. 14 (1), 76-82, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2369-14-76>
IF:1.644 (2012)



4. **Kertész, A.B.**, Édes, I.: Fabry disease cardiomyopathy: From genes to clinical manifestations.
Curr. Pharm. Biotechnol. 13 (13), 2477-2484, 2012.
IF:2.69
5. Domokos É., Kardos L., Bednárszky I., Bene O., Bódi A., Daragó A., Fülöp T., Homoródi N., Péter A., Rácz I., Hegedűs I., **Kertész A.B.**: Az interventrikuláris szeptum mérése echokardiográfiával: Mérési különbségek és klinikai következményeik.
Cardiol. Hung. 41, 15-20, 2011.
6. Juhász, B., Das, D.K., **Kertész, A.**, Juhász, Á., Gesztelyi, R., Varga, B.: Reduction of blood cholesterol and ischemic injury in the hypercholesteromic rabbits with modified resvaratrol, logevinex.
Mol. Cell. Biochem. 348 (1-2), 199-203, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0615-2>
IF:2.057
7. Petrovski, G., Das, S., Juhász, B., **Kertész, A.**, Tósaki, Á., Das, D.K.: Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy.
Antioxid. Redox Signal. 14 (11), 2191-2200, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3486>
IF:8.456
8. Constantin T., Székely A., Ponyi A., Gulácsy V., Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Medvecz M., Fiedler O., Széchei R., Varga E., Rudas G., **Kertész A.**, Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mohamed M., Rákóczi É., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség - terápiás útmutató.
Orv. Hetil. 151 (31), 1243-1251, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28796>
9. Constantin T., Rákóczi É., Ponyi A., Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Csíkós M., Fiedler O., Széchei R., Varga E., Rudas G., **Kertész A.**, Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mahdi M., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség: Diagnosztikai útmutató.
Orv. Hetil. 151 (7), 243-249, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28795>
10. Rácz I., Szabó G., Kolozsvári R., Fülöp L., Bódi A., Péter A., **Kertész A.**, Balogh L., Hegedűs I., Ungvári T., Édes I., Kőszegi Z.: A falmozgászavar változása akut miokardiális infarktusban a tünetektől a revaszkularizációig eltelt idő függvényében.
Cardiol. Hung. 40 (2), 104-109, 2010.

11. Tóth Z., Nagy-Baló E., **Kertész A.**, Clemens M., Herczku C., Tint D., Kun C., Édes I., Csanádi Z.:
Pitvarfibrilláció kezelése a pulmonalis vénák krioballon-izolációjával: Középtávú eredmények az
első 55 beteg alapján.
Orv. Hetil. 151 (5), 163-171, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28798>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20.622

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5.775**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok
bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports
Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.12.17

