

Doktori (Ph.D.) értekezés

# **A szívizkémia kezelésének lehetőségei**

**Írta:  
Dér Péter**

**Témavezető: Dr. Tószaki Árpád**

**Programvezető: Dr. Gergely Lajos**

DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI KAR  
GYÓGYSZERHATÁSTANI TANSZÉK  
DEBRECEN

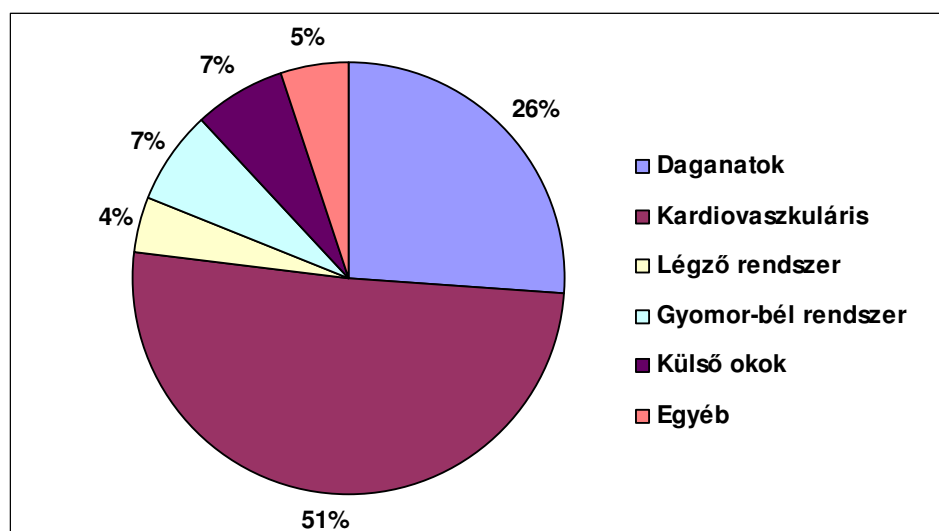
2008

## Az értekezés során használt rövidítések:

1XPC:	egy ciklusú prekondicionálás
2XPC:	két ciklusú prekondicionálás
3XPC:	három ciklusú prekondicionálás
4XPC:	négy ciklusú prekondicionálás
ACTH (4-10):	adrenocorticotrop hormon (4-10)
$\alpha$ -MSH:	alpha-melanocyta-stimuláló hormon
AF:	aorta kiáramlás
ATP:	adenozin trifoszfát
C:	kontroll
CF:	koronária átáramlás
DMTU:	dimetil-tiourea
DPPH:	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
eNOS:	endotheliális nitrogén monoxid szintetáz
GC:	tömegspektrometria
HC:	hiperkoleszterinémia
HO:	hemoxigenáz
HPTLC:	nagy felbontású vékonyréteg kromatográfia
HR:	szívfrekvencia
I/R:	iszkémia/reperfúzió
KHB:	Krebs-Henseleit puffer oldat
LVDP:	bal kamrai nyomás
LVdp/dt:	bal kamrai nyomás első deriváltja
NMR:	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NO:	nitrogén monoxid
PC:	prekondicionálás
POMC:	proopiomelanocortin
SOD:	szuperoxid-dizmutáz
TRP32:	thioredoxin related protein 32
TRX1:	thioredoxin1
TTC:	trifenil-tetrazolium
TUNEL:	terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP „nick end labeling”
VF:	kamrafibrilláció
VT:	kamrai tachycardia

## Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek világszerte a vezető halálokok közé tartoznak, annak ellenére, hogy megfelelő életmóddal jelentősen csökkenteni lehetne a kialakulásuk valószínűségét. A legfontosabb rizikófaktorok a dohányzás, a telített zsírokban gazdag táplálkozás, a mozgásszegény életmód, az elhízás, a magas vérnyomás, a magas koleszterinszint, a túlzott alkoholfogyasztás, a cukorbetegség. Magyarországon a halálozások több mint fele a szív- és érrendszeri betegségeknek tulajdonítható, ezek közül is az iszkémiás szívbetegség a legfőbb halálok (1. ábra). Az aggasztó statisztikai adatok indokolják a témakör részletesebb vizsgálatát azért, hogy pontosabb képet alkothassunk a betegség hátterében zajló mechanizmusokról.



1. ábra

A legfontosabb betegségcsoportok okozta halálesetek számának megoszlása Magyarországon 2002-ben

Az elmúlt három évtizedben nagyszámú tanulmány foglalkozott a iszkémia/reperfúzió indukálta szívizom károsodások mechanizmusának megértésével és kiterjedt kutatások folytak az iszkémiás károsodások hatékony kezelésének kidolgozása céljából. Így a kísérletes technikák és módszerek nagymértékben fejlődtek. Ennek ellenére az iszkémiás betegségek komplex kezelése továbbra is megoldatlan kérdés maradt.

Az iszkémia kialakulásának hátterében leggyakrabban valamilyen organikus szűkület, esetleg koronárispazmus áll, ami az érintett terület hipoperfúzióját eredményezi. A folyamat során a szívizomban az oxigén- és tápanyagellátás zavara, energetikai funkciózavar és a káros anyagcseretermékek felszaporodása következtében a funkciós paraméterek leromlása, majd sejtpusztulás (nekrózis ill. apoptózis) alakul ki. Az energetikai zavar hátterében

tulajdonképpen a miociták csökkent ATP termelése áll, ugyanis a glükóz aerob metabolizmusa leáll, így a sejtek csak anaerob glikolízis és oxigént igénylő zsírsavoxidáció révén jutnak energiához. Következésképp laktát felszaporodás, acidózis jön létre, amelyek az ATP hiánnyal együtt károsítják a sejtmembránt, és zavart okoznak az intracelluláris ionegyensúlyban. Az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  szint megnő a szarkoplazmatikus retikulumból történő kiürülés és az extracelluláris térből való beáramlás következményeként, amely aritmiák (extraszisztole, VT, VF) kialakulásának veszélyét hordozza magában.

Az évtizedek folyamán számos természetes anyagot és endogén komponenszt vizsgáltak, de viszonylag kevés figyelmet szenteltek az adrenocorticotrop hormon és fragmentumai – különösképp az adrenocorticotrop hormon (4-10) (ACTH (4-10) - hatásainak a posztisztkémiás szívfunkciókra és az infarktusos területre vonatkozólag. A melanocortinok ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH) egy nagyobb prekuzor molekula, a proopiomelanocortin (POMC) derivátumai. Az ACTH egy 39 aminosavat tartalmazó peptid, amelynek aktív fragmentuma a 13 aminosavból álló alfa-melanocytá-stimuláló hormon ( $\alpha$ -MSH), ezen belül helyezkedik el az ACTH (4-10). A melanocortinok hatásait a hét transzmembrán domainből álló, G proteinhez kapcsolt receptorok aktiválásával fejtik ki. Ezek a receptorok számos szervben megtalálhatók. Néhány éve az  $\alpha$ -MSH iszkémia/reperfúzió (I/R) indukálta károsodásokkal szembeni protektív hatásait írták le vesében (1), tüdőben (2), és agyszövetben (3). Továbbá publikálták, hogy az ACTH (1-24) és az  $\alpha$ -MSH kezelés hatására csökkent az aritmia előfordulása és a letalitás koronária okklúziós patkány modellben (4). Ezenkívül a melanocortin peptidek egy jellegzetes adrenalin-független gyulladáscsökkentő hatással is rendelkeznek, amelyet centrális és perifériás támadáspontokon fejtenek ki, meglehetősen komplex módon (5). Egy előző tanulmányunkban bemutatásra került, hogy a melanocortin peptidek pozitívan befolyásolták a miokardiális infarktus káros következményeit, úgymint az aritmiát, az apoptotikus és nekrosis okozta sejthalált és a károsodott szívfunkciót (6). Az  $\alpha$ -MSH, mint endogén derivátum, kétélű fegyverként viselkedhet a váratlan hormonális mellékhatások miatt. Az optimális cél egy olyan hasonló peptid vagy derivátum megtalálása, amely nem rendelkezik semmilyen adrenocorticotrop hatással. Kutatásaink során többek között arra szerettünk volna választ kapni, hogy az ACTH (4-10) rendelkezik-e kardioprotektív hatásokkal, az előbbieken említett mellékhatások nélkül.

Az I/R témakörének tárgyalása során, fontos említést tennünk egy, már évtizedek óta vizsgált jelenségről, a prekondicionálásról (PC). Ennek során a ciklikusan ismétlődő rövid idejű I/R epizódok toleranciát és védelmet alakítanak ki a szövetben egy később bekövetkező, máskülönben az életet veszélyeztető kimenetelű iszkémiával szemben. A PC jelenségét

először Murry és mtsai. írták le (7). Kutyaikon végzett kísérleteikben az 5 perc a. circumflex okklúziót és 5 perc reperfúziót követő 40 percnyi iszkémia során szignifikánsan csökkent az infarktusos terület nagysága a kontroll csoporthoz képest, ahol a prekondicionálás elmaradt. Ezt a jelenséget klasszikus vagy korai prekondicionálásnak nevezik. Az ún. késői prekondicionálás jelenségét a 90-es évek elején fedezték fel (8). Ennek során a prekondicionált szíveket csak 24 óra elteltével vetették alá a hosszabb idejű iszkémiának. A prekondicionált csoport funkciós paraméterei szignifikánsan jobbak voltak, mint a kontroll csoporté. Azóta a PC mechanizmusát a szívben széles körben vizsgálták és rámutattak, hogy intracelluláris mediátorok által szabályozott események egész sora megy végbe a PC kiváltotta stressz tolerancia kialakulása során. Az intracelluláris mediátorok (pl. nitrogén monoxid (NO), kalcium, adenozin, thioredoxin1 (TRX1) és reaktív szabadgyökök által kiváltott szignálok kaszkádja olyan stressz-rezisztens szívet eredményez, amely képes megvédeni magát a későbbi, végzetes kimenetelű iszkémiával szemben (9). Nemrégiben megállapították, hogy az intracelluláris messengerként ismert ceramidnak jelentős szerepe van a PC mechanizmusában (10, 11). A szfingomielinből képződő ceramid a kardiomiociták pusztulását idézi elő a I/R során (12). Egy tanulmányban leírták, hogy a TNF $\alpha$  mediálta PC, ceramid szignálmechanizmuson keresztül megy végbe (13). Egy másik publikáció szerint, a permeábilis, exogén ceramid csökkentette az infarktusos terület nagyságát, ami alátámasztja a ceramid szerepét a PC mechanizmusában (14). Egyre több bizonyíték van arra, hogy a ceramid a lipid raftok (membrán mikrodomainek) belsejéből fejt ki szignál mechanizmusát, amelyek olyan receptorszervező struktúrák, amelyek szfingolipidekben (szfingomielin, glikoszfingolipidek) és koleszterinben gazdagok (15). Fontos lipid raft struktúrájú képletek a „caveolák”. Ezek a plazma membrán 50 – 100 nm nagyságú, palack formájú betüremkedései és gyakran gyöngysorszerűen helyezkednek el a membránban. A caveolák szelektíven képesek felvenni a membránhoz kapcsolódó proteineket, kialakítva ezzel egy egyedülálló szignál-mikrodomaint, kontrollálva ezáltal a transzmembrán szignálmechanizmusokat (16). A caveolák a caveolinok jelenlétének meghatározásával különböztethetők meg a többi lipid raft domaintól. A caveolin három különféle 22 – 24 kDA molekulatömegű izoformáját határozták meg, melyek közül a caveolin-1 és -2 minden sejttípusban előfordul, míg a caveolin-3 csak az izomsejtekből mutatható ki (17). A caveolin-1, amely olyan nem-receptorhoz kötött tirozin-kinázok szubsztrátja, mint a Fyn, Abl vagy az Src, egy scaffolding protein és oxidatív stressz hatására foszforilálódik a tirozin 14-en a fent említett enzimek hatására (18). A tirozin-foszforiláció további szignálokat aktivál, kulcsszerepet játszva ezáltal a caveolákban lejátszódó szignálmechanizmusokban.

Az indukálható és endotheliális nitrogén monoxid szintetázok (iNOS, eNOS) által termelt NO szerepe a PC mechanizmusában jól ismert (**19, 20, 21, 22**). Mivel a NO szerepet játszik a ceramid szignáljában, továbbá a NOS a lipid raftokban és más caveolinban gazdag domáinkban kimutatható, kísérletet tettünk annak meghatározására, hogy milyen feladatot tölt be a ceramid-NO szignál az iszkémia és a prekondicionálás során.

A PC pontos hatásmechanizmusa a mai napig sem teljesen tisztázott és néha ellentmondásos magyarázatok látnak napvilágot. Fontos kiemelni, hogy a különböző állatokkal (nyúl, patkány, kutya vagy sertés) végzett kísérletek túlnyomó többségét egészséges, koronária vagy miokardiális sérülésektől mentes állatszívveken végezték. A kapott eredmények patofiziológiai és klinikai jelentősége ílymódon nem kellően megalapozott. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy a hiperkoleszterinemiás állatok szívei ugyanúgy adaptálódnak-e a prekondicionálás során az iszkémia indukálta károsodásokhoz, mint az egészséges szívszövet.

Az iszkémia során fellépő hipoperfúzió miatt oxidatív stressz alakul ki, amelynek folyamán az aktiválódott NADH-, xantin- és ciklooxidáz nagy mennyiségű szuperoxid aniont generál, amely membránkárosodást, sejtpusztulást idéz elő a szívszövetben. Az iszkémiát követő reperfúzió során szintén ezek a reaktív szabadgyökök felelősek az ún. reperfúzió-indukálta szívizomkárosodásért is. Ismert tény, hogy azon vegyületek (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz), melyek képesek befogni a szabad gyököket, kardioprotektív tulajdonságokkal rendelkeznek. Az étrendi antioxidánsok (alfa-tokoferol, aszkorbinsav, béta-karotin) valamint egyes kéntartalmú aminosavak fontos antioxidánsokként jöhetnek számításba. Ezen felül az extracelluláris folyadékban jelen levő ceruloplazmin, albumin, transferrin haptoglobin a védelem „második vonalát” képezi az oxidatív behatásokkal szemben (**23**). Emellett számos növényi eredetű struktúra is rendelkezik kardioprotektív tulajdonságokkal. A fitoszterolok például azáltal, hogy gátolni képesek a koleszterin abszorpcióját, csökkentik a plazma koleszterin és LDL szintjét. Omega-3-zsírsavval kombinálva pedig még hatékonyabban csökkentik a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikóját (**24**). Kísérleteinkben a Makhana antioxidáns hatását vizsgáltuk I/R modellen.

Az *Euryale ferox* (Nymphaeaceae család) - vagy más néven Makhana - sima levélfelülettel rendelkező, egynyári vagy évelő óriás vízililiom. A leveleket, csészeleveleket és a gyümölcsöt hajlott tövisek borítják (2. ábra). Az édes és fanyar ízű magvakat termő növény Kelet-Indiában őshonos, de évezredek óta termesztik Kínában is. A Makhana magok ehetőek, a sült magok rendkívül táplálóak és 77 % könnyen emészthető szénhidrátot tartalmaznak.



2. ábra  
Euryale ferox

A Makhana széleskörben alkalmazott növény a kelet-ázsiai gyógyászatban olyan betegségek gyógyításában, mint a krónikus hasmenés, vesebántalmak, fehér folyás vagy a lépelégtelenség (25). Azokról a mechanizmusokról, amelyek révén a növény kifejti terápiás hatásait, viszonylag keveset tudunk. Egy nemrégiben megjelent tanulmány kimutatta, hogy az Euryale ferox magvak kivonata jelentős antioxidáns aktivitással rendelkezik (26). A kísérletekhez a stabil szabadgyököt tartalmazó 1,1-difenil-2-pikrilhidrazint (DPPH) alkalmazták és az eredmények alapján elmondható, hogy a kivonatok relatíve magas oxigéngyök megkötő képességgel rendelkeznek. Vizsgálták továbbá az Euryale ferox kivonat hatásait oxidatív ágenseknek kitett kínai hörcsög tüdő fibroblaston is. A teljes (n-hexán, diklórmetán, etil-acetát, n-butanol keverék), az etil-acetátos illetve butanolos kivonatokkal kezelt sejtek megnövekedett ellenálló képességet mutattak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szabadgyökökkel szemben. Egy másik kísérletben mágneses magrezonancia spektroszkópiás (NMR) és tömegspektrometriás (MS) módszerekkel sikerült azonosítani az Euryale ferox glikolipidjeit (27). A száraz növényi kivonatból származó glikolipid keverékből a 24-metilkoleszt-5-enil-3β-O-piranoglikozid, 24-etilkoleszt-5-enil-3β-O-piranoglikozid és 24-etilkoleszt-5, 22-dienil-3β-O-piranoglikozid került azonosításra.

## Célkitűzések

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk izolált nyúl- és patkányszíveken. Munkánkat négy fő témakörre összpontosítottuk:

- I.** Vizsgálni kívántuk, hogy a prekondicionálás egészséges szíveken tapasztalt pozitív hatásai manifesztálódnak-e beteg (hiperkoleszterinémiás) szívekben is, és képes-e csökkenteni az infarktusz terület nagyságát az egészséges szívekben tapasztalt mértékben.
- II.** Célul tűztük ki a lipid raftok szerepének tisztázását a ceramid és a NO szignálfolyamataiban az iszkémia / reperfundált illetve prekondicionált szívekben.
- III.** Célkitűzéseink közé tartozott a Makhana kivonat kardioprotektív hatásainak vizsgálata a posztisztkémiás szívfunkciókra, az infarktusz terület nagyságára, és a redox folyamatokban jelentős szerepet betöltő TRX1 és TRP32 proteinek expressziójára. Célunk volt a Makhana kivonatok szabadgyök-befogó képességének vizsgálata is.
- IV.** Vizsgálni kívántuk továbbá, az ACTH (4-10) hatását a posztisztkémiás szívfunkciók felépülését, a reperfúzió indukálta aritmiák kialakulásának változását, valamint a miokardiális apoptózis mechanizmusát illetően. Választ kerestünk arra, hogy az ACTH (4-10) képes-e gátolni a programozott sejthalál folyamatát, és ha igen, mekkora dózis szükséges a gátláshoz. Tanulmányoztuk továbbá, hogy az ACTH (4-10) képes-e csökkenteni az infarktusz terület mértékét.

## **Módszerek és anyagok**

Kísérleteink első részében New-Zealand nyulakat (2,2-2,6 kg) használtunk. Az állatokat 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 publication no. 86-23, 1985).

### **a) A hiperkoleszterinémia kiváltása nyulakban**

Az azonos korú nyulak hiperlipidémiás csoportja 1.0 %-os koleszterinnel dúsított laboratóriumi eledelt, a kontroll csoport szintén egyidős tagjai pedig hagyományos koleszterinmentes eledelt kaptak (ad libitum). Az állatok etetése 8 héten keresztül történt. A 8 hét letelte után a szíveket izoláltuk.

### **Iszkémia/reperfúzió kiváltása prekondicionált nyúlszívekben**

A prekondicionálás (PC) az iszkémia/reperfúzió (I/R) egymás utáni, periodikus ismétlése annak ciklusszámától függően (1XPC, 2XPC, 3XPC, 4XPC). Jelen esetben a rövid periódus 5 perc globális iszkémiát, majd ezt követő 5 perc reperfúziót jelent. A PC-t a hiperkoleszterinémiás és a nem-hiperkoleszterinémiás, egészséges csoport nyulaival is elvégeztük (csoportonként 6 állat). A PC befejezése után a szíveket 30 perc globál iszkémiának vetettük alá, amit 120 perc reperfúzió követett. A ciklusok számát 1 és 4 között határoztuk meg a felhasznált irodalmak alapján (**28, 29, 30**).

További kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat (250–300 g) használtunk.

### **b) A lipid raftok szerepének vizsgálata**

A kísérleteket kétféle protokoll szerint végeztük. Az első esetben a szíveket 15 percig perfundáltuk Krebs-Henseleit pufferrel (KHB), szfingomielináz gátló hatású desipramine jelenlétében ill. anélkül. Ezt 30 perc iszkémia, majd 120 perc reperfúzió követte. A második esetben a szíveket a prekondicionálás protokollja szerint először négy cikluson át 5 perc iszkémiának és azt követően 10 perc reperfúzióknak vetettük alá, amit 30 perc iszkémia, majd 120 perc reperfúzió követett.

### c) Előkezelés Makhana kivonattal

A Makhana termékek közvetlenül a termelőtől kerültek beszerzésre (Bihar, India). A Makhana keverő berendezésben vizes kivonásnak vetették alá. A végső csapadékot ultrahangos keverővel keverték és alkohollal, valamint vízzel kivonatot képeztek. Az állatokat véletlenszerűen egy kezelt és egy kontroll csoportra osztottuk. A vizsgálatokhoz kétféle modellt alkalmaztunk. Az akut modellben a szíveket a Makhana kivonat három különböző dózissal (50 µg/ml; 125 µg/ml és 250 µg/ml) oldatával perfundáltuk. A krónikus modellben az állatokat 21 napon keresztül két különböző dózissal (250 mg/kg/nap és 500 mg/kg/nap) kezeltük perorálisan, gyomorszondán keresztül.

### d) ACTH 4-10 előkezelés

A kísérletek során a patkányok 1-1 csoportját 50 µg/ttkg ill. 200 µg/ttkg koncentrációjú ACTH 4-10 oldattal kezeltük elő, melyet subcutan (s. c.) injektáltunk 12 órával az iszkémia / reperfúzió kiváltását megelőzően. A kontroll állatok ugyanezt az oldatot kapták, de hatóanyag nélkül.

### Izolált dolgozó szív preparátum

A nyulakat ketamin/xilazin (40/5 mg/ttkg) keverékével, a patkányokat nátrium-pentobarbitállal (60 mg/ttkg) altattuk, majd ezt követően iv. heparint adtunk (patkány: 500 IU/kg, nyúl: 1000 IU/kg) a trombusok kialakulásának megelőzésére. A mellkas megnyitása után a szívet kimetsztük és hideg perfúziós oldatba helyeztük. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonalison keresztül ún. „dolgozó-perfúziós” készüléken perfúziós oldattal perfundáltuk. A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit puffer volt, melynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.7 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 10 glükóz. Az oldatot előzőleg 95 % O<sub>2</sub> és 5 % CO<sub>2</sub> keverékével telítettük (pH: 7.4, 37 °C). A szíveket 5 percig Langendorff-módszer szerint perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával volt egyenértékű (10 kPa) (31). A mosási periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk és regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP) illetve egyes esetekben ennek első deriváltját (LVdp/dt) (31). Ezt követően a szíveket 30 perc teljes (totál) iszkémiát követő 120 perc reperfúzió alá vetettük. A reperfúzió során (a 10., 30., 60. és

120. percben) regisztráltuk a szív előbbieken említett funkciók paramétereit (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt).

### **A szívfunkciók mérése**

A szívfunkciók paramétereinek mérésekor a koronária áramlást adott időegység alatt (1 perc) a szívről lecsöpögő KHB mennyiségeként határoztuk meg, az aorta kiáramlást flowméterrel, az LVDP, HR, LVdp/dt értékeit pedig Gould p23XL transducer (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH, USA) segítségével detektáltuk. A jelek felerősítésére Gould 6600 szignál erősítőt (Gould Instrument System Inc., Valley View, OH, USA) alkalmaztunk. A paraméterek monitorozását Cordat II real-time software (Triton technologies, San Diego, CA, USA) segítségével végeztük.

### **Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata**

A szívet a 120 perc regionális iszkémia leteltével 1 %-os trifenil-tetrazolium (TTC)-oldattal festettük meg az aorta-kanül oldalágán keresztül (**32, 33**). Ezután a szíveket  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd a fagyott miokardiumból éles pengével metszeteket készítettünk az apikobazális tengelyre merőleges síkban. A metszetek tömegét megmértük, és szárítás után két üveglap közé helyezve szkenneltük őket és egy planimetriás software (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA.) segítségével meghatároztuk valamennyi metszet infarktusos területének értékét. Ezen területértékeket megszoroztuk a metszetek tömegeivel, és az eredményeket összegeztük. Végül az infarktusos területek nagyságát százalékosan fejeztük ki az infarktust szenvedett szívizom tömege és az össztömeg hányadosaként.

### **A caveolinban gazdag membránfrakciók izolálása**

A szíveket proteáz koktélt tartalmazó nátrium karbonát puffer oldatban (pH 11,0) homogenizáltuk Polytron homogenizáló készülékkel (Brinkman Instruments, Westbury, NY, USA). A homogenizátumot ultrahanggal kevertettük, majd 2 ml 90% szaccharóztartalmú MBS (25mM Mes, pH 6.5, 0.15 M NaCl) oldat hozzáadásával 45 % szaccharóz koncentrációra állítottuk be. Ezután ultracentrifugacsőbe helyeztük (**34**). Egy 35 %-os diszkontinuus szaccharóz grádienszt hoztunk létre felette (4 ml 5 % szaccharóz oldat/ 4 ml 35 % szaccharóz MBS-ben oldva, amely 250 mM Nátrium karbonátot tartalmaz.) és 39 000 fordulatszámon centrifugáltuk (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Az 5 és 35 % szaccharóz határfelületén elhelyezkedő fénytörő, caveolinban gazdag részt leválasztottuk a további vizsgálatokhoz.

### **Immunoprecipitálás caveolin-1-el**

A vizsgálathoz az Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA) által küldött Immunoprecipitation starter Pack-et használtuk, követve annak útmutatásait. A teszthez caveolin-1 ellen termelt poliklonális antitestet (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) használtunk. Ezután a Western blot analízist eNOS antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) végeztük.

### **Ceramid és szfingozin-1-foszfát meghatározás a caveolinban gazdag membránfrakciókból**

A ceramid és bomlástermékeinek analízisét egy, már korábban beállított nagy felbontású vékonyréteg kromatográfiás (High Performance Thin-layered Chromatography, HPTLC) módszer segítségével hajtottuk végre (35).

### **Antibody array**

A teszthez használt lemezek egyenként 512 különböző antitestet tartalmaznak. Egy kísérlethez két lemez szükséges (36, 37). 100 mg bal kamrai szövetet homogenizáltunk 1 ml kivonó / jelölő oldatban (a kit része) (BD Biosciences Clontech, Paolo Alto, CA, USA). A fehérje-koncentráció meghatározása után a mintákat 1.1 mg fehérje/ml koncentrációra hígítottuk. A Cy3 és Cy5 festékekhez (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 110 ml kivonó / jelölő oldatot adtunk. A felülúszókat külön-külön mindkét festékkal megjelöltük, majd a felesleges festéket leszűrtük. A kezelt csoportból származó, Cy5-el jelölt mintát elegyítettük a kontroll csoportból származó, Cy3-al jelölt mintával és ugyanezt tettük a kezelt csoportból származó, Cy3-al jelölt és a kontroll csoportból származó, Cy5-el jelölt mintával. Minden mintakeverékből 20 mg proteint inkubáltunk 30 percig az antibody array lemezekkel, majd sorrendben 7 különböző pufferrel mostuk őket. A lemezeket megszáritottuk és azonnal szkenneltük (Perkin-Elmer Life Sciences Scannary Express). A Cy3 és Cy5 jelzésekre külön-külön szkennelt képeket Imagene szoftver (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA) segítségével egyesítettük és analizáltuk (36, 37). A lemezeken ismétlődő értékeket átlagoltuk és egy belülről normalizált arányt (INR) számítottunk a BD Biosciences weboldaláról letöltött Microsoft Excel lapon. Az eredmények ábrázolását Silicon Genetics Gene Spring szoftverrel végeztük.

### **Szabadgyök-fogó tulajdonság mérése**

A „scavenger” aktivitást a szuperoxid-anionra 10 mU/ml szuperoxid-dizmutázzal (SOD), a hidroxil-gyökre pedig 500 µg/ml dimetil-tioureával (DMTU) hasonlítottuk össze. A szuperoxid-aniont kémiai indukáltuk xantinból (100 µM) xantin-oxidáz enzim (8 mU) hozzáadásával, reakciós puffer (10 mM foszfát puffer, pH 7,4, 10 µM etilén-diamin-tetraacetát: EDTA 1 ml-ben) jelenlétében. A hidroxil-gyök előállításához szükséges puffer az előbbi pufferhez képest még 100 µM etilén-diamin-tetraacetátot (EDTA) és 100 µM FeCl<sub>3</sub>-ot is tartalmazott.

### **A kardiomiociták apoptózisának meghatározása**

A formaldehiddel fixált bal kamrákat paraffinba ágyasztuk, 4 µm széles metszeteket készítettünk, majd xilén és etanol oldatokkal deparaffineztük. Az apoptotikus sejtek immunhisztokémiai detektálását TUNEL módszerrel végeztük. Ennek során a digoxigeninnel megjelölt dUTP, dezoxinukleotidil-transzferáz közreműködésével beépül a DNS láncba. A beépült nukleotidot birkában termelt, poliklonális anti-digoxigenin antitesttel inkubáltuk, majd nyúlban termelt FITC-konjugált, anti-birka IgG-al, mint másodlagos antitesttel kezeltük. A metszeteket (n=5) PBS-el háromszor átmostuk, normál nyúl szérummal blokkoltuk és monoklonális egér α-szarkomerin-aktinhoz specifikusan kötődő antitesttel inkubáltuk, majd nyulból származó TRITC-konjugált anti-egér IgG-al festettük (200:1).

### **Az endothel sejtek apoptózisának mérése**

Az endothel sejtekben az apoptózis detektálásához készített metszeteket először TUNEL módszer szerint festettük. Ezután a mintákat először nyúl poliklonális anti-von Willebrand faktorról, mint elsődleges antitesttel, majd TRITC-konjugált kecske eredetű anti-nyúl IgG-al, mint másodlagos antitesttel inkubáltuk. A fluoreszcens festést konfokális lézer mikroszkóppal jelenítettük meg. A jellegzetes képek jól mutatják a von Willebrand pozitív endothel sejteket (a citoszól élénkpirosra festődött), melyek TUNEL festődést nem mutattak (a zöld festődés hiányzik a nucleusból) és a TUNEL pozitív sejteket egyaránt (1200x nagyítás).

### **A kaszpáz-3 aktivitás mérése immunhisztokémiai módszerrel**

A metszeteket először biotinilált kecske anti-kaspáz-3 antitessel (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1:1000 higítás) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. Ezt követően a metszetek 50 percig biotinilált nyúl antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) (1:100 higítás)

kezeltük, majd szobahőmérsékleten 4 órára avidin-biotinilált-peroxidáz komplexbe (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) (1:100 hígítás) helyeztük. A kísérleteket diaminobenzidin kromogén reakció zárta (38). A metszeteket minden antitestkezelés előtt 50 percre 10 % normál kecske szérumba helyeztük. Minden inkubálás folyamatos mozgítás közben zajlott, az antitesteket 10 mM foszfát pufferoldatban (PBS, pH 7.4) oldottuk, amely 0.1 % Triton X-100-at és 1 % normál nyúl szérumot (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tartalmazott.

### **Western blot analízis**

A Clontech extrakciós oldatban oldott proteinhez (50 ill. 100 µg) egyenlő mennyiségű SDS puffert adtunk, majd 10 percig forrásban tartottuk. Ezután a fehérjéket 12 %-os SDS poliakrilamid gélen, „running” pufferben (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3) 200 V feszültség alatt szeparáltuk. Molekulasúly standardként Precision plus Protein Kaleidoscope standardet (10 µl) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) használtunk. A gélt ezután 100 V feszültség alatt nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) vittük át „transzfer” pufferben (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20 % (v/v) metanol, pH 8.3). Miután a membránt TBS-T-vel blokkoltuk ((50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl) és 0.1 % (v/v) Tween-20, valamint 5 % (w/v) non-fat dry milk), a blottokat a primer antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A membránokat a TBS-T-vel történő mosást követően 1 órán át a másodlagos antitesttel inkubáltuk (1:2000 hígítás TBS-T és 5 % (w/v) non-fat dry milk). Végül a blottokat ECL Detection Reagents 1 és 2 (Amersham Biosciences, NJ, USA) segítségével hívtuk elő és Kodak X-OMAT filmre exponáltuk.

### **Statisztikai analízis**

Az ACTH 4-10 és a prekondicionálás hatásainak vizsgálataiban során a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP), az infarktusos terület, valamint a Kaspáz-3 és HO-1 aktivitás értékeinek összehasonlításakor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „kétutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e eltérés a különböző csoportok adatai között. Az észlelt különbségeket ezután Bonferroni-teszttel vizsgáltuk. A VF és a VT nem parametrikus eloszlást követ, ezért ezen paraméterek összehasonlításakor khí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és a kezeletlen (kontroll) csoportok összehasonlításakor. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a  $p < 0,05$ .

A lipid raftok vizsgálataiban során a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt) az apoptotikus kardiomiocitaszám, az infarktusos terület, valamint a ceramid és szfingozin-1-

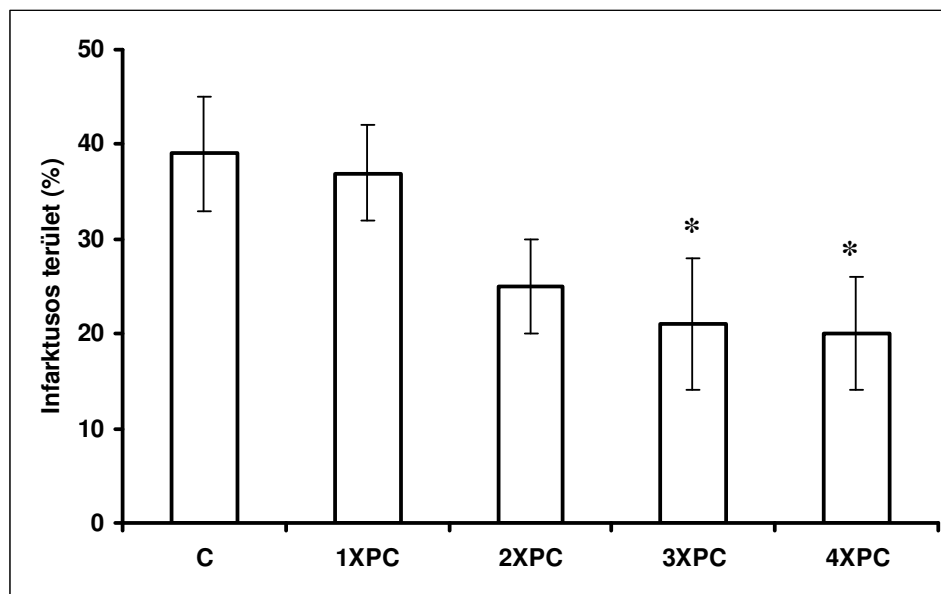
foszfát értékeinek összehasonlításakor szintén a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Majd Bonferroni-teszttel kiegészített variancia analízisnek vetettük alá a kapott adatokat a szignifikancia elemzésére.

A Makhana esetében a szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP, LVdp/dt) és az infarktusos terület értékeinek összehasonlításakor is a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. A gyógyszerrel kezelt csoportok értékeit a kezeletlen csoportéval Bonferroni korrekcióval kiegészített módosított t-teszttel hasonlítottuk össze.

# Eredmények

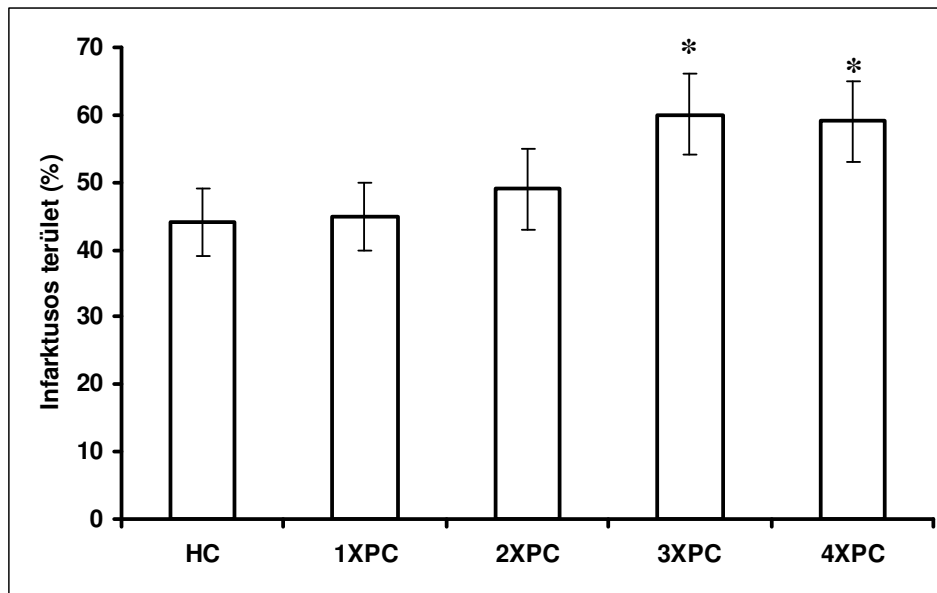
## I. Prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára

A kontroll (C) állatok szíveinek közel 40 %-a infarktust mutatott 30 perc iszkémia és az azt követő 120 perc reperfúziót követően. A PC ciklusainak számától függően, az infarktusos terület nagysága fokozatosan csökkent (3. ábra). Az egészséges, nem-hiperkoleszterinémiás állatok szíveinek tehát előnyös volt a PC, hiszen a 3XPC és a 4XPC szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét. A hiperkoleszterinémiás állatokon (HC) elvégezve a kísérletet azt tapasztaltuk, hogy a prekondicionálás ciklusszámától függően az infarktusos terület mérete növekedett (4. ábra). A HC-ás csoportban tehát a remélt protektív hatás elmaradt. Vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy míg a PC a nem-hiperkoleszterinémiás szíveken (C) jótékony hatásúnak bizonyult, addig a beteg (HC) szíveken szignifikáns módon növelte az infarktusos terület nagyságát.



3. ábra

A prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára azonos korú, nem-hiperkoleszterinémiás, izolált nyúl szív-modellben



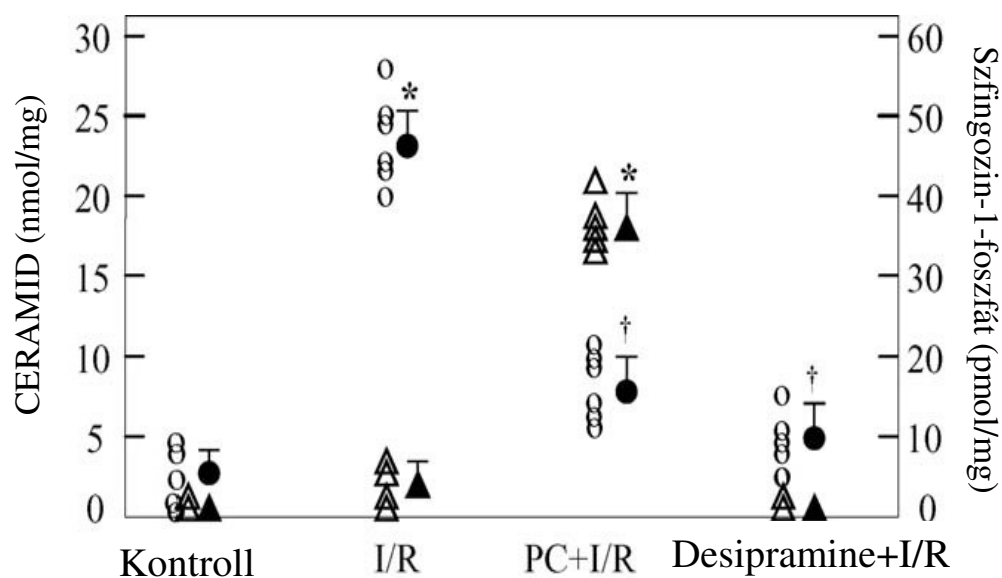
4. ábra

A prekondicionálás hatása az infarktusz terület nagyságára azonos korú, hiperkoleszterinémias, izolált nyúlszív-modellben

## **II. A lipid raftok szerepe**

### ***Az I/R és a PC hatásai a ceramid és szfingozin-1-foszfát felhalmozódásra a caveolákban***

A ceramid és a szfingozin-1-foszfát mennyiségét mértük az izolált caveolin frakcióban. Amint az 5. ábrán látható, jelentős mennyiségű ceramid kapcsolódott a caveolákhoz az I/R után. Szignifikánsan (kb. 3-szor) kevesebb ceramid található a caveolae frakcióban, ha a szívét előzőleg prekondicionáltuk. A prekondicionálásnak alávetett szívekben a ceramid mennyiségének csökkenése együtt járt a szfingozin-1-foszfát tartalom növekedésével. Ebből arra következtethettünk, hogy a PC triggereli a ceramid lebontását és ezáltal növeli a szfingozin-1-foszfát felhalmozódását a caveolákban. Az előzetesen desipramine-nal perfundált szívekben a szfingozin-1-foszfát felhalmozódása nem volt kimutatható.

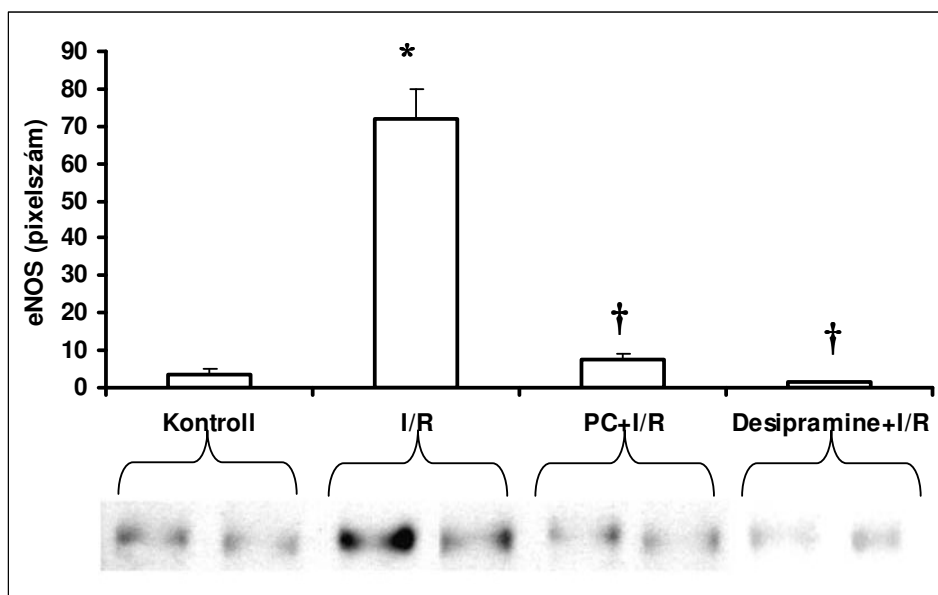


5. ábra

A ceramid és a szfingozin-1-foszfát termelődése az I/R szívizom caveolinban gazdag membránfrakcióiban; minden csoportban 6 szívet vizsgáltunk, ceramid átlag: tömör kör; Szingozin-1-foszfát átlag: tömör háromszög (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, †  $p < 0,05$  a I/R csoporthoz viszonyítva)

### ***Az I/R és a PC hatásai az eNOS és caveolin-1 kapcsolódására***

A caveolin-1 elleni antitesttel immunprecipitált frakció eNOS expressziójának Western blot analízise kimutatta, hogy az eNOS fokozott mértékben kapcsolódik a caveolin-1-hez I/R során (6. ábra). A kapcsolódás mértéke jelentősen csökkent (mintegy tizedére), ha a szíveket előzőleg prekondíciónak vetettük alá. Ez az eredmény arra utal, hogy a PC fokozza az eNOS felszabadulását a caveolákból. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor gátoltuk a ceramid képződést desipramine előzetes perfúziójával, amelyet a pufferben oldottunk fel.



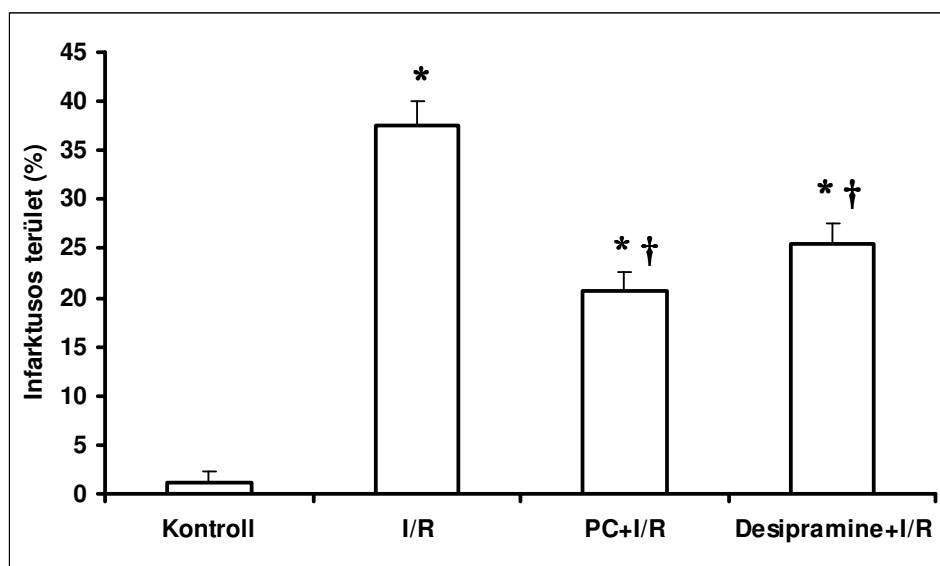
6. ábra

Caveolin-1-el asszociált eNOS protein expressziójának mennyisége

(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva, † p < 0,05 a I/R csoporthoz viszonyítva)

### A PC kardioprotektív hatásai

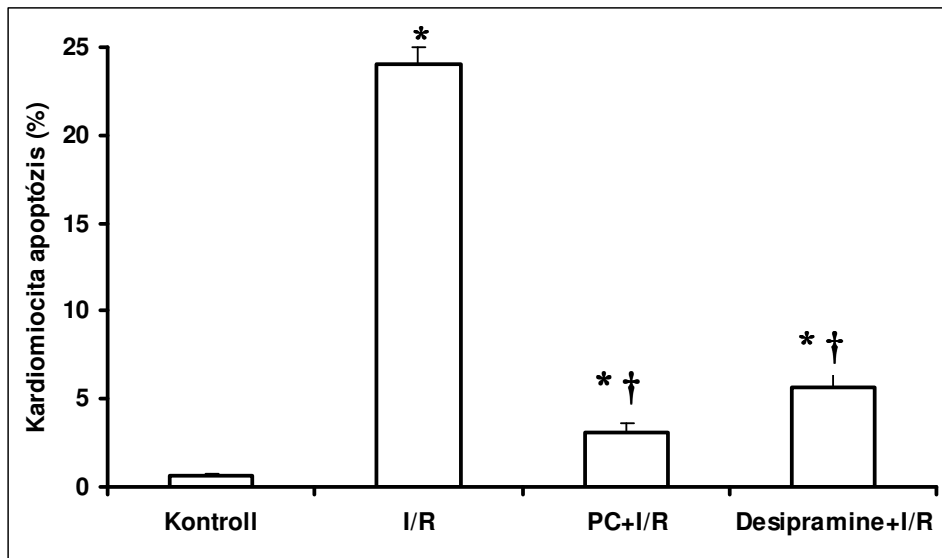
Az I/R jelentős szövetskárosodást hozott létre, ami nagy kiterjedésű infarktusos területben ( $37.6 \pm 2.4$  %) és fokozott mértékű kardiomiocita apoptózisban nyilvánul meg ( $24 \pm 1$  %). Mind a desipramine, mind a PC csökkentette a szövetskárosodást, amit a kisebb mértékű infarktusos terület (PC:  $20.7 \pm 1.9$  %; desipramine:  $25.6 \pm 2$  %) és apoptózis (PC:  $3.1 \pm 0.5$  %; desipramine:  $5.6 \pm 0.9$  %) bizonyít (7, 8. ábra).



7. ábra

Az infarktusos területek mértéke I/R és prekonkondicionált szívekben

(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva, † p < 0,05 a I/R csoporthoz viszonyítva)



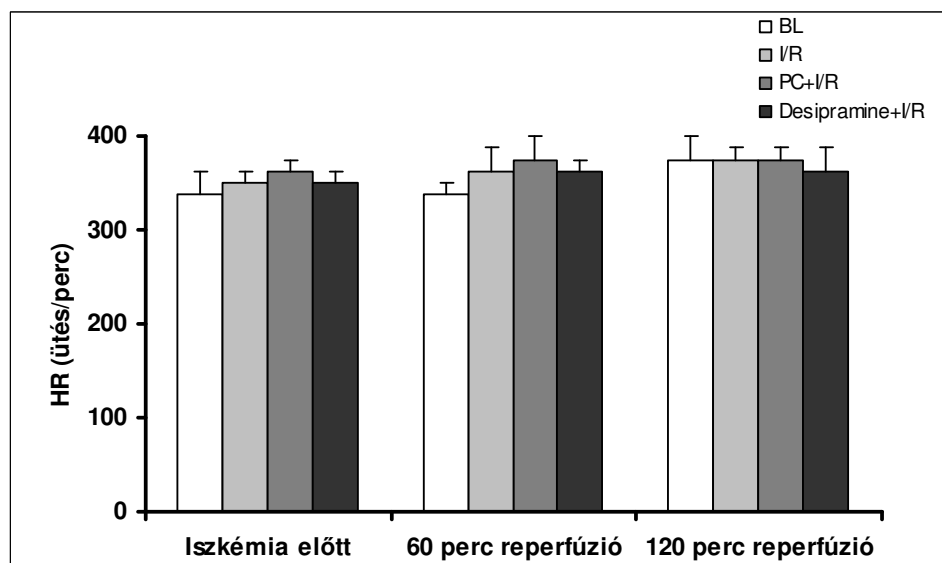
8. ábra

A kardiomiociták apoptózisának mértéke I/R és prekondicionált szívekben

(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, †  $p < 0,05$  a I/R csoporthoz viszonyítva)

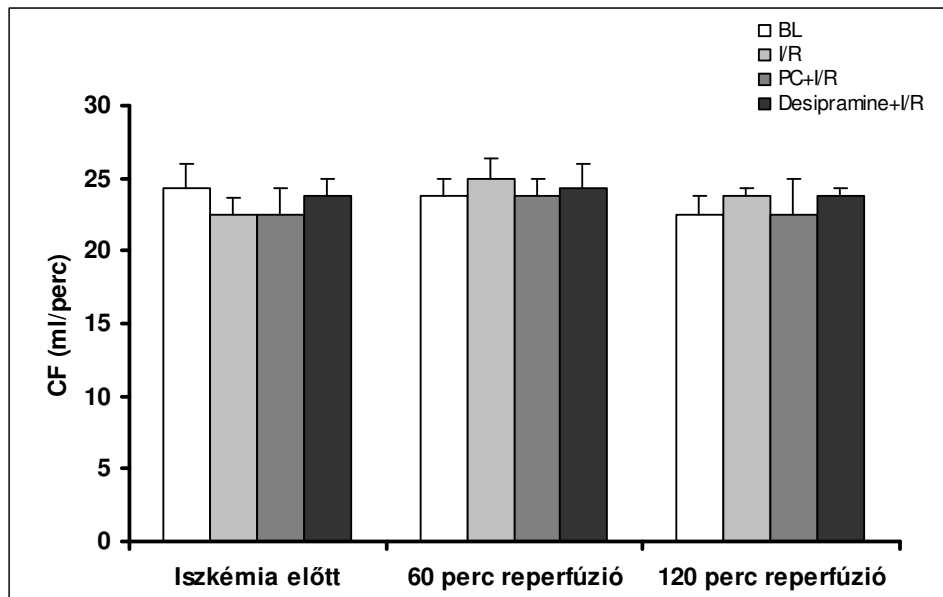
### *Szívfunkációs paraméterek*

Sem a szívfrekvencia, sem pedig a koronária átáramlás értékei nem mutattak jelentős változást az egyes csoportok adatait vizsgálva (9, 10. ábra).



9. ábra

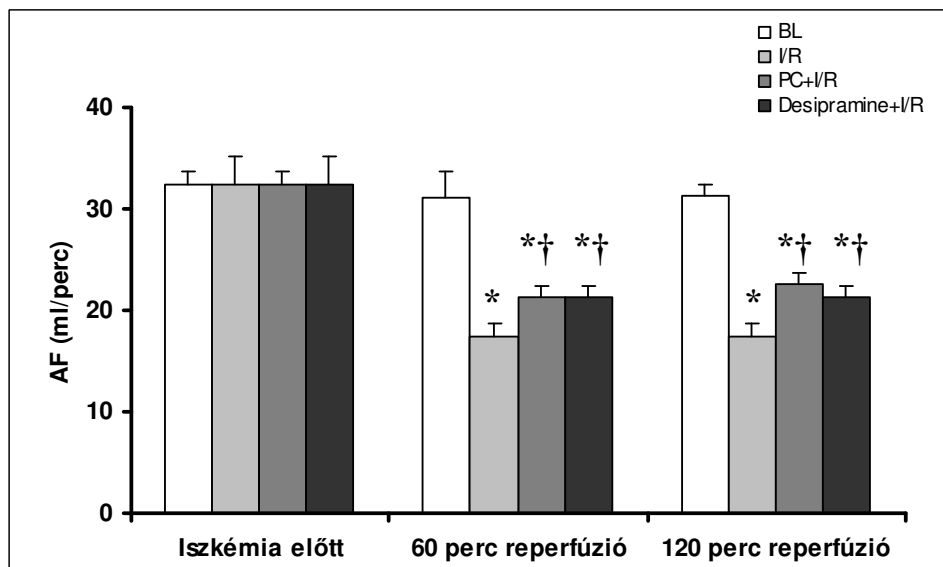
A szívfrekvencia alakulása az I/R és prekondicionált szívekben



10. ábra

A koronária átáramlás alakulása az I/R és prekondicionált szívekben

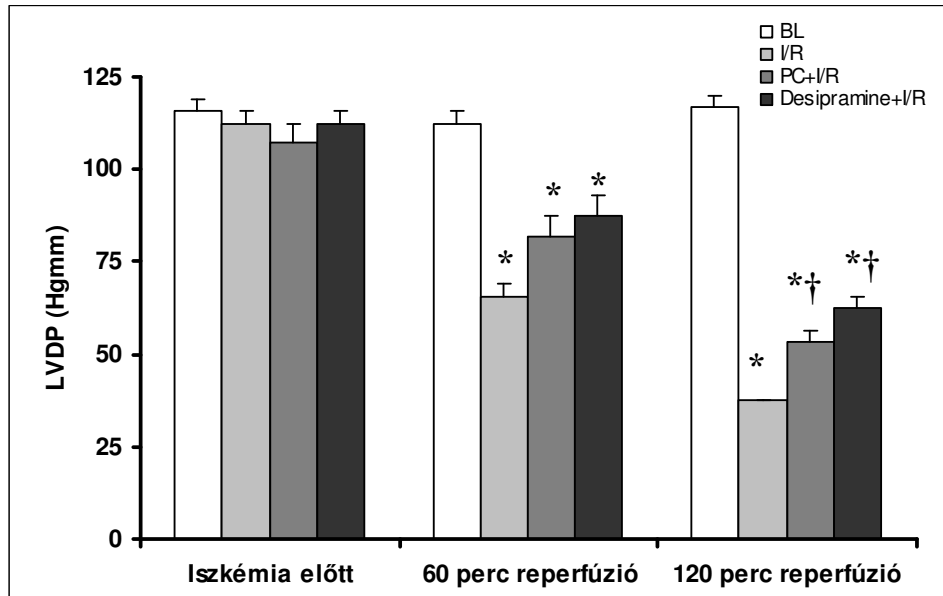
Az aorta kiáramlás, a bal kamrai nyomás és annak deriváltja minden csoportban csökkent a reperfúzió folyamán. Azonban a csökkenés mértéke szignifikánsan kisebb volt a PC csoportban a reperfúzió 60. és 120. percében. Az I/R okozta szívizom károsodás mértéke desipramine hatására kissé csökkent (11, 12, 13. ábra).



11. ábra

Az aorta kiáramlás értékei az I/R és prekondicionált szívekben

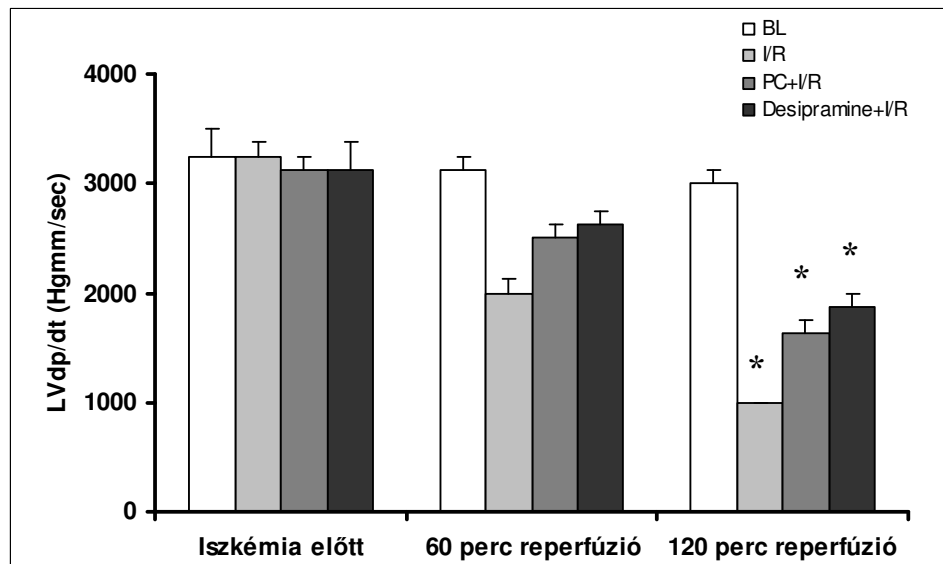
(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, †  $p < 0,05$  a I/R csoporthoz viszonyítva)



12. ábra

A bal kamrai nyomás alakulása I/R és prekondicionált szívekben

(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, †  $p < 0,05$  a I/R csoporthoz viszonyítva)



13. ábra

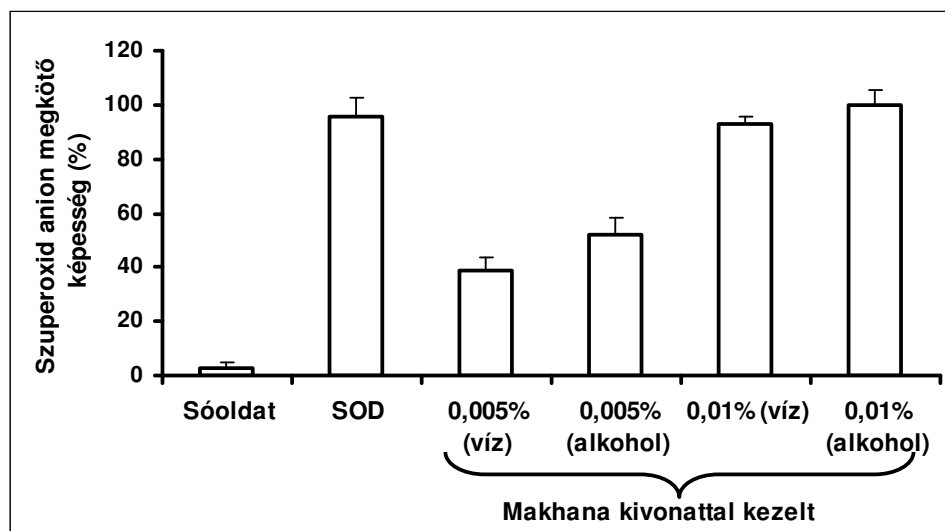
A bal kamrai nyomás első deriváltjának alakulása az I/R és prekondicionált szívekben

(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, †  $p < 0,05$  a I/R csoporthoz viszonyítva)

### III. A Makhana hatásai

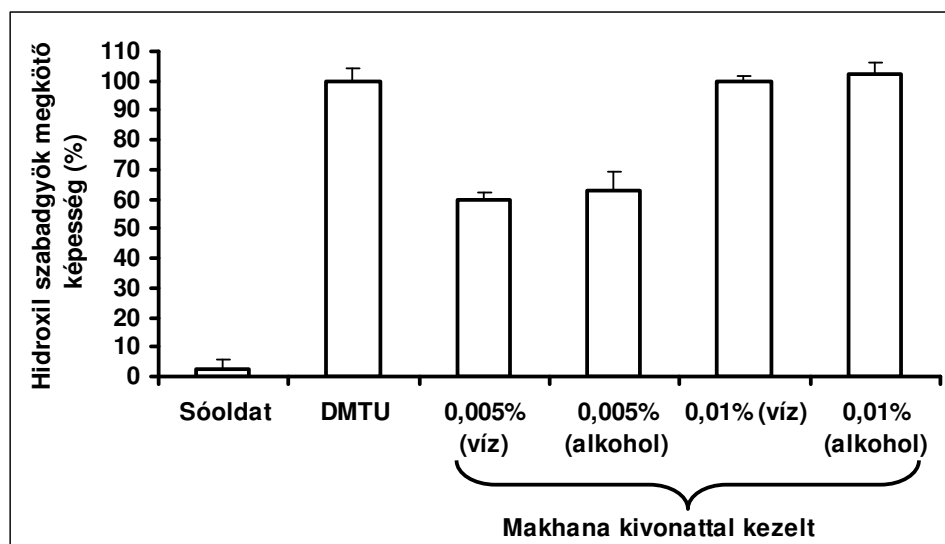
#### *Szabadgyök-fogó tulajdonság*

A szabadgyök-fogó tulajdonságot a szuperoxid dizmutázhoz (SOD), a hidroxil szabadgyök megkötő képességet a dimetil tioureához (DMTU) viszonyítottuk, melyeknek kapacitását 100 %-nak vettük. A Makhana kivonat két különböző koncentrációban került alkalmazásra. A 0.005 % koncentrációban a vizes kivonat 39 %-al, az alkoholos kivonat 52 %-al csökkentette a szuperoxid-anion mennyiségét (14. ábra). A 0.01 % koncentrációban pedig a vizes kivonat 93 %-al, az alkoholos kivonat 100 %-al csökkentette a szuperoxid-anion mennyiségét. A 0.005 % koncentrációnál a vizes kivonat 60 %-kal, az alkoholos kivonat 63 %-al csökkentette a hidroxil-szabadgyök mennyiségét (15. ábra). A 0.01 % koncentrációnál pedig, mind a vizes kivonat, mind pedig az alkoholos kivonat közel 100 %-al csökkentette a hidroxil-szabadgyök képződését.



14. ábra

A Makhana „scavanger” hatása a szuperoxid anionra

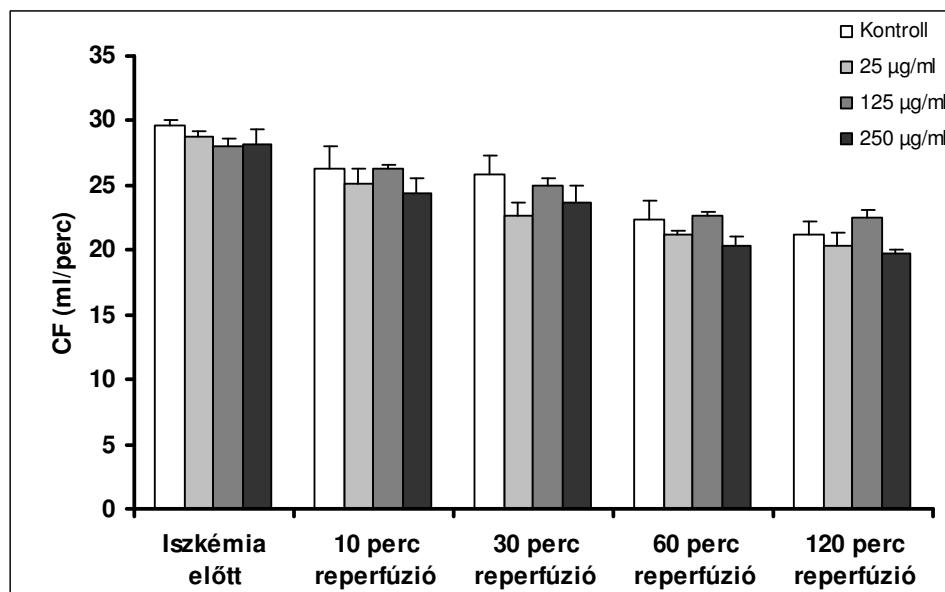


15. ábra  
A Makhana „scavenger” hatása a hidroxil szabadgyökökre

### A Makhana hatása a szívfunkciókra

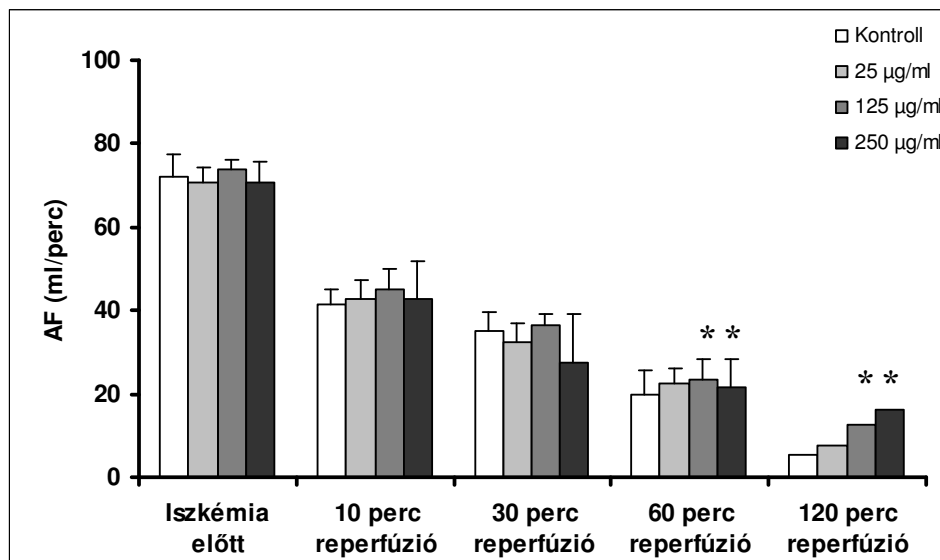
#### Akut modell

Az akut modellben a szíveket a Makhana kivonat három különböző dózisé (50 µg/ml; 125 µg/ml és 250 µg/ml) oldatával perfundáltuk. Az alapértékeket tekintetve nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Nem volt jelentős különbség a koronária átáramlás értékekben sem a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest a reperfúzió folyamán (16. ábra).



16. ábra  
A Makhana akut hatása a koronária átáramlásra  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

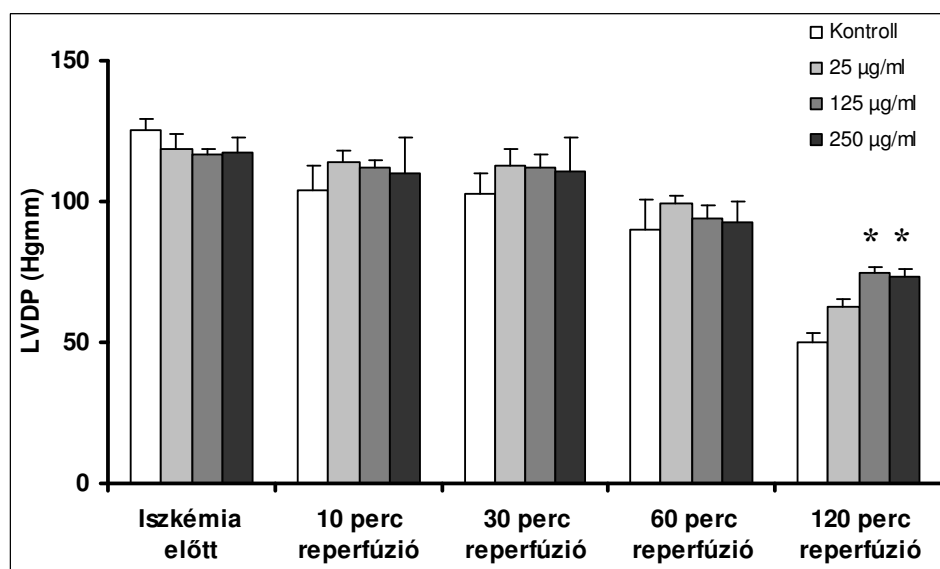
A Makhana kardioprotektív hatását bizonyítja az aorta kiáramlás figyelemreméltó változása az iszkémiát követő reperfúzió 60. perce után. Az aorta kiáramlás az alkalmazott magasabb dózisok esetében (125 µg/ml és 250 µg/ml) szignifikánsan magasabb volt a reperfúzió 60. és 120. percében (17. ábra).



17. ábra

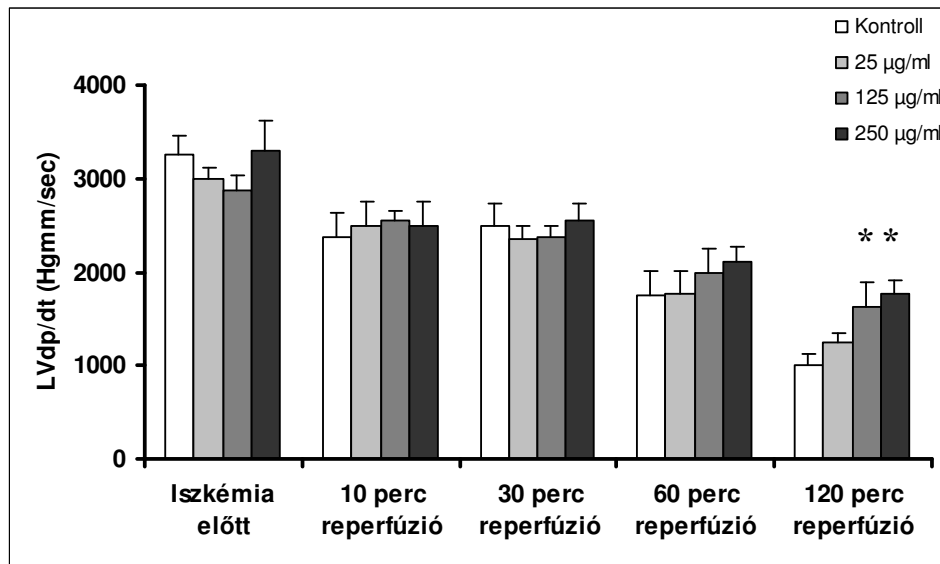
A Makhana akut hatása az aorta kiáramlásra  
 (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)

Az LVDP és LVdp/dt paraméterek mindkét fent említett koncentrációnál a reperfúzió 120. percében mutattak szignifikáns javulást (18, 19. ábra).



18. ábra

A Makhana akut hatása a bal kamrai nyomásra  
 (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)

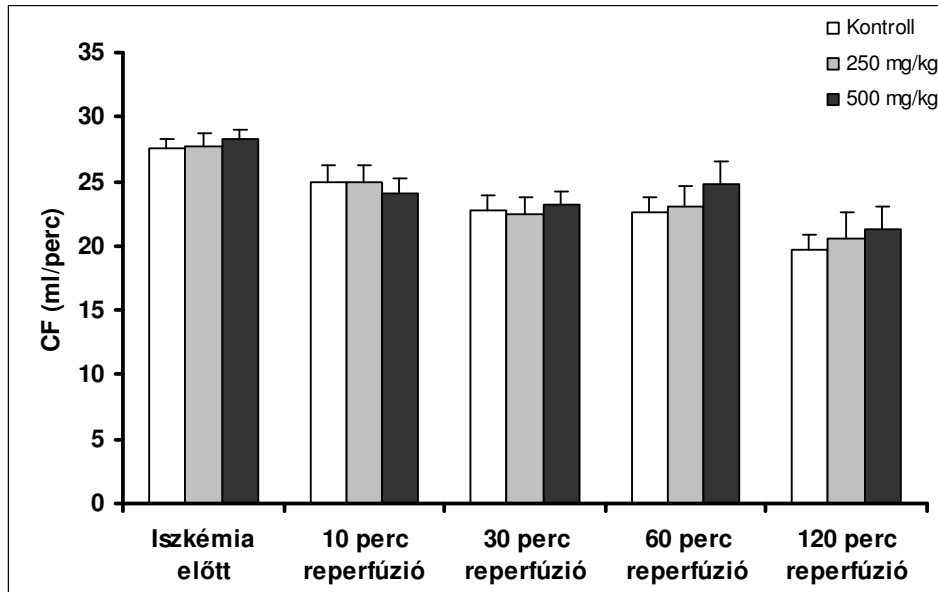


19. ábra

A Makhana akut hatása a bal kamrai nyomás deriváltjára  
 (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)

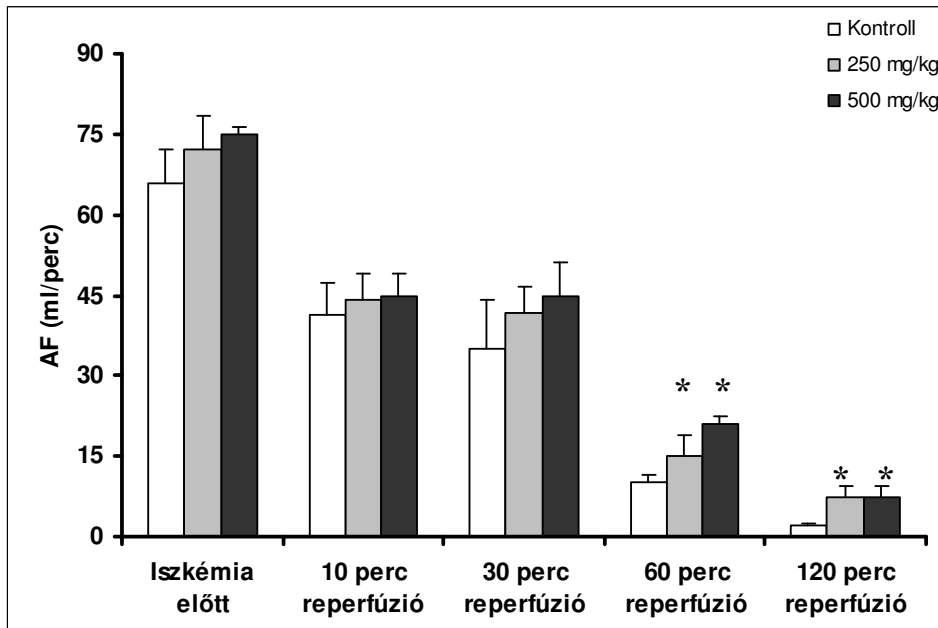
### ***Krónikus modell***

A krónikus modellben az állatokat 21 napon keresztül két különböző dózissal (250 mg/kg/nap és 500 mg/kg/nap) kezeltük perorálisan, gyomorszondán keresztül. Ahogyan az akut modell esetében, ebben a modellben sem volt különbség az alapértékek közt négy csoportban, nem volt jelentős különbség az iszkémiát követően a koronária átáramlás értékekben sem a két kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva (20. ábra). A Makhana kardioprotektív hatása a reperfúzió végén figyelhető meg, amely azt mutatja, hogy a szívfunkciók felépülése folyamatosan és lassan következik be. Az aorta kiáramlás szignifikánsan javult a reperfúzió 60. és 120. percében mindkét dózis alkalmazásakor (21. ábra). A bal kamrai nyomás a reperfúzió 120. percében javult, de csak a magasabb, 500 mg/kg dózis esetében (22 ábra). Az 500 mg/kg dózis a reperfúzió 120. percében javította az  $LV_{max}dp/dt$  értékét is (23. ábra).



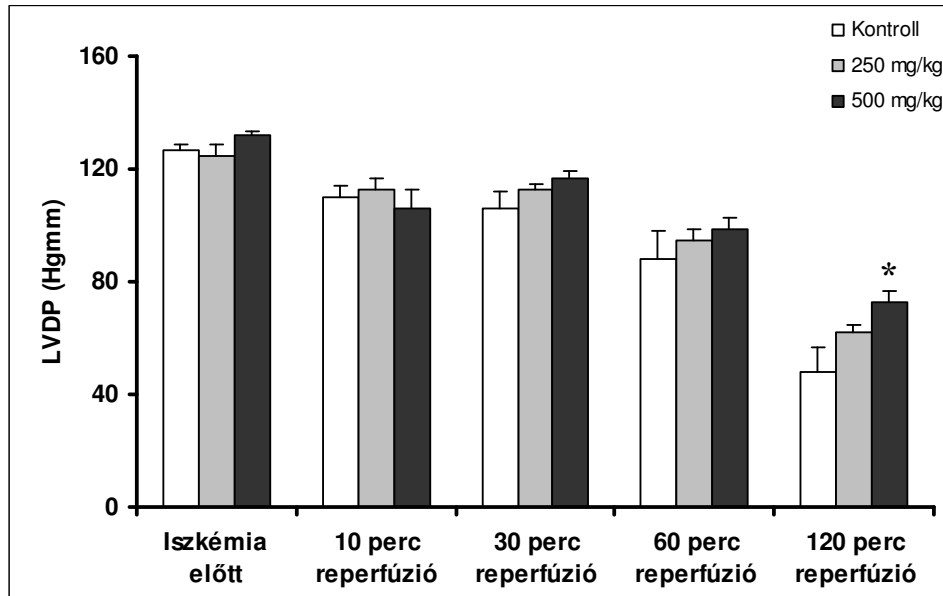
20. ábra

A krónikus Makhana előkezelés hatásai a koronária átáramlásra  
 (\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)



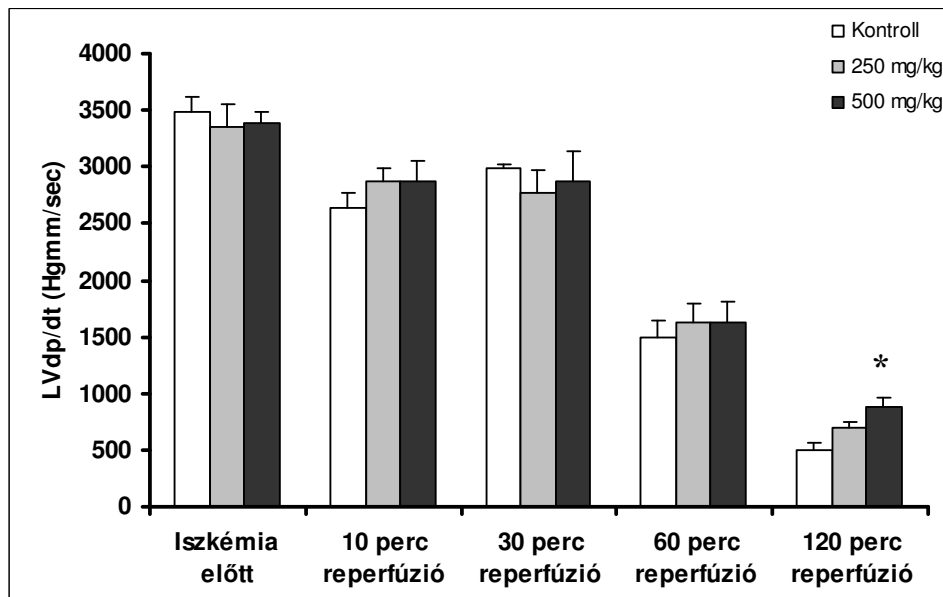
21. ábra

A krónikus Makhana előkezelés hatásai az aorta kiáramlásra  
 (\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)



22. ábra

A krónikus Makhana előkezelés hatásai a bal kamrai nyomásra  
 (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)



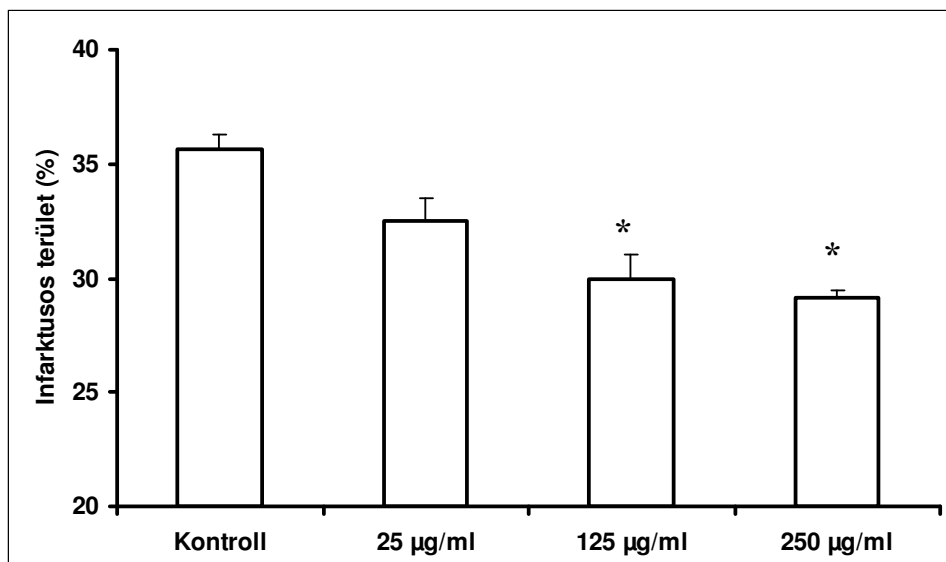
23. ábra

A krónikus Makhana előkezelés hatásai a bal kamrai nyomás deriváltjára  
 (\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)

### ***A Makhana hatása az infarktusos terület nagyságára***

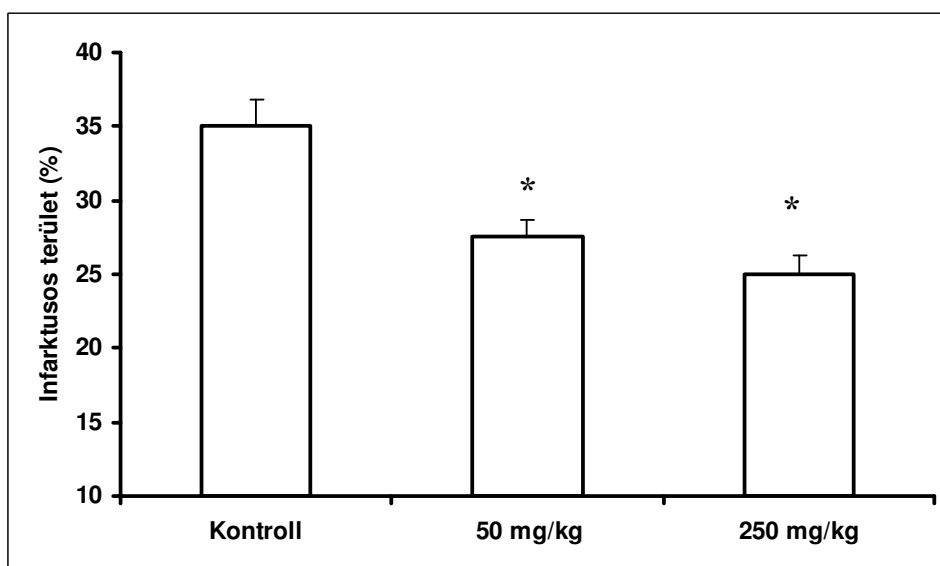
Az infarktusos terület nagysága csökkent mind az akut, mind a krónikus modell kezelt csoportjaiban a kontrollhoz viszonyítva ( $35.6 \pm 0.7$  ill.  $35 \pm 1.9$  %). Amint azt a 24. ábra

mutatja, az akut modellben mind a 125 µg/ml (30 ± 1 %), mind az 250 µg/ml dózis (29.1 ± 0.4 %) csökkentette az infarktusos terület nagyságát. Bár a 25 µg/ml dózis is befolyásolta az infarktusos terület mértékét, de a változás nem volt szignifikáns. A krónikus modellben mindkét alkalmazott dózis (50 mg/kg: 27.5 ± 1.3 %; 250 mg/kg: 24.9 ± 0.4 %) szignifikánsan csökkentette az infarktusos területet a kontroll csoporthoz viszonyítva (25. ábra).



24. ábra

A Makhana akut hatása az infarktusos területek nagyságára  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva )

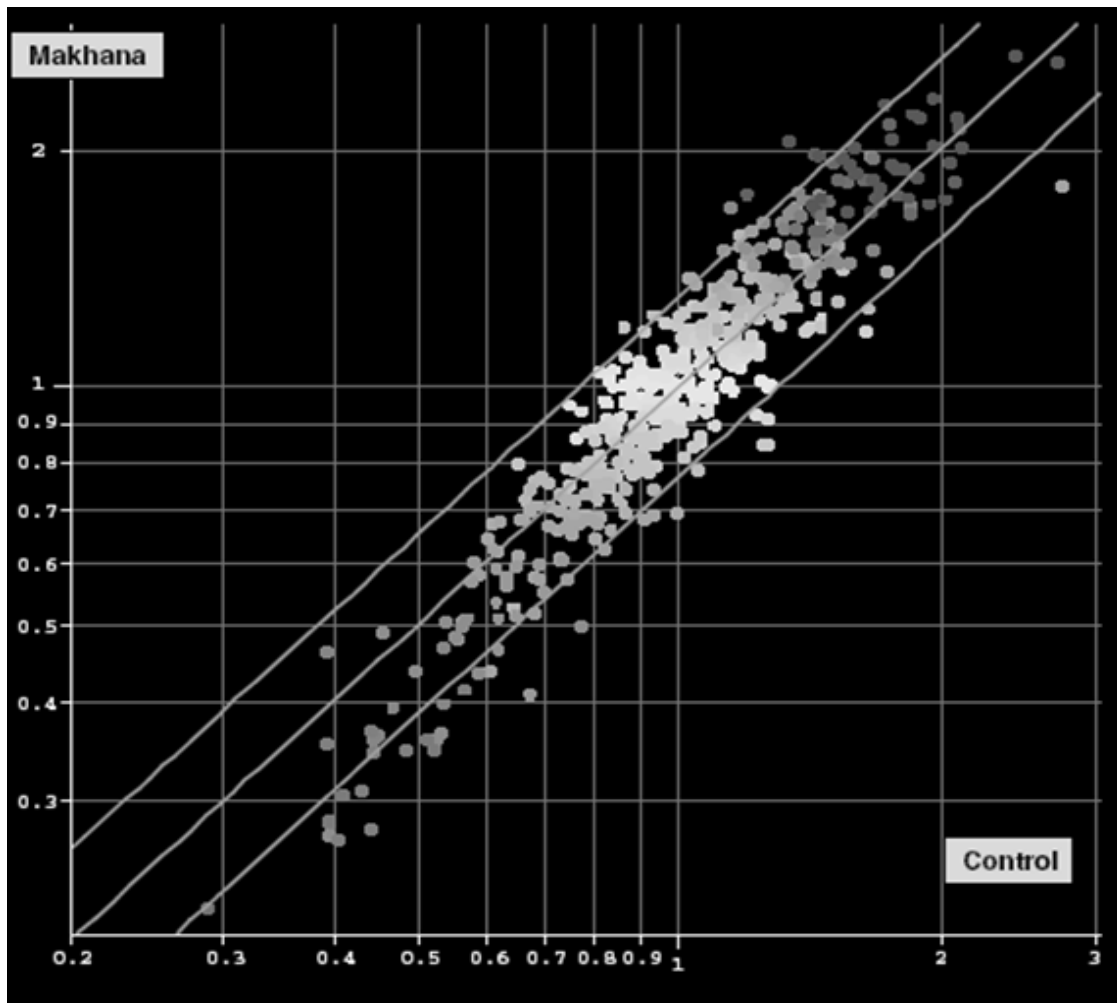


25. ábra

A Makhana krónikus hatása az infarktusos területek nagyságára  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva )

### ***Antibody array és Western blot analízis***

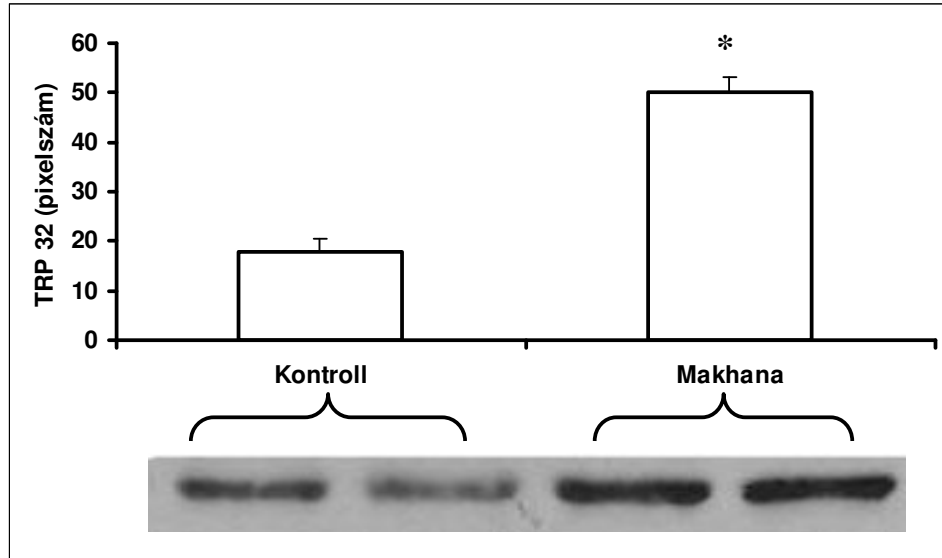
A Makhanával kezelt szívszövetekben nagyobb mennyiségben expresszáldó proteinek vizsgáltunk közismert adatbázisok (SwissProt, LocusLink) segítségével és két, a kardioprotektív hatás kialakulásában fontos szerepet játszó proteint vetettünk alá megerősítő bizonyítékul Western blot analízisnek. Az antibody array analízissel kimutattuk a TRP32 enzim „up”regulációját (26. ábra) a jelintenzitás „scatter” plotja alapján.



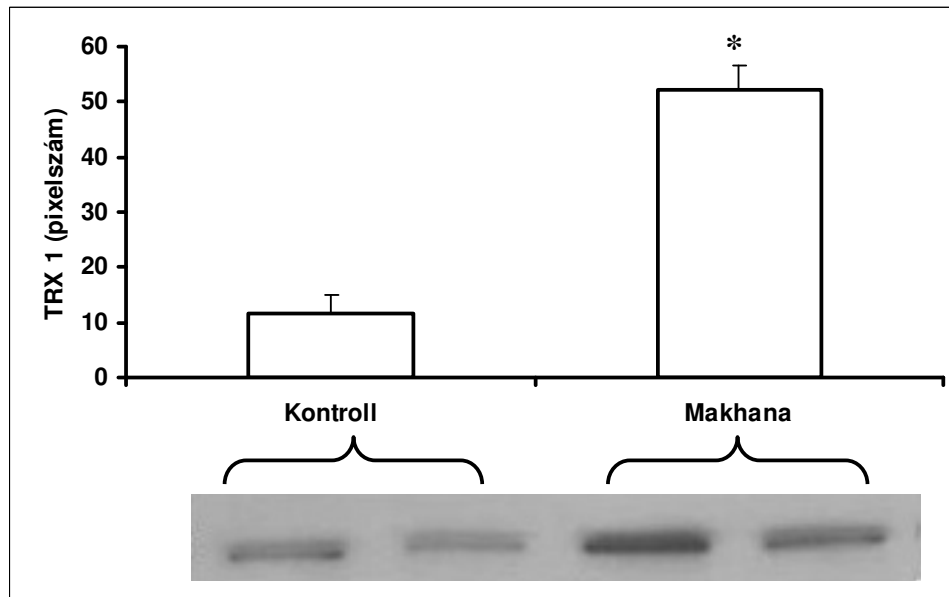
26. ábra

A normalizált enzim jelintenzitások scatter plot formában ábrázolva

A Western blot vizsgálatok alapján a TRP32 enzim aktivitása 2.8-szer, a TRX1-é pedig 4.5-szer volt nagyobb a kezelt szívekben a kontroll értékhez viszonyítva (27, 28. ábra).



27. ábra  
A TRP32 protein Western blot analízise iszkémia/reperfundált szívekben  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva )

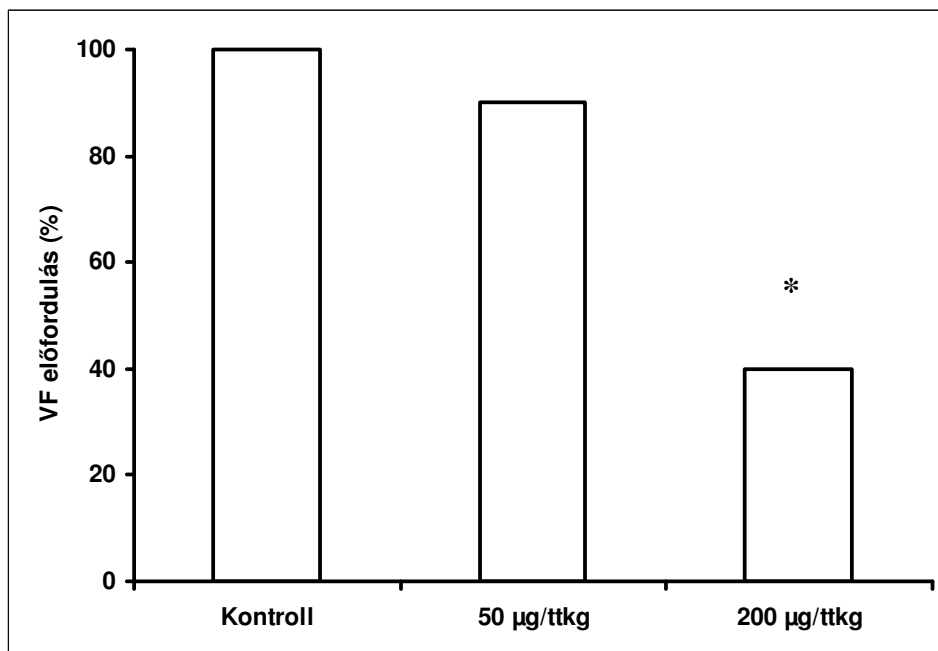


28. ábra  
A TRX1 protein Western blot analízise iszkémia/reperfundált szívekben  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva )

## **IV. Az ACTH 4-10 hatásai**

### ***Az ACTH (4-10) hatása a kamrai aritmiára***

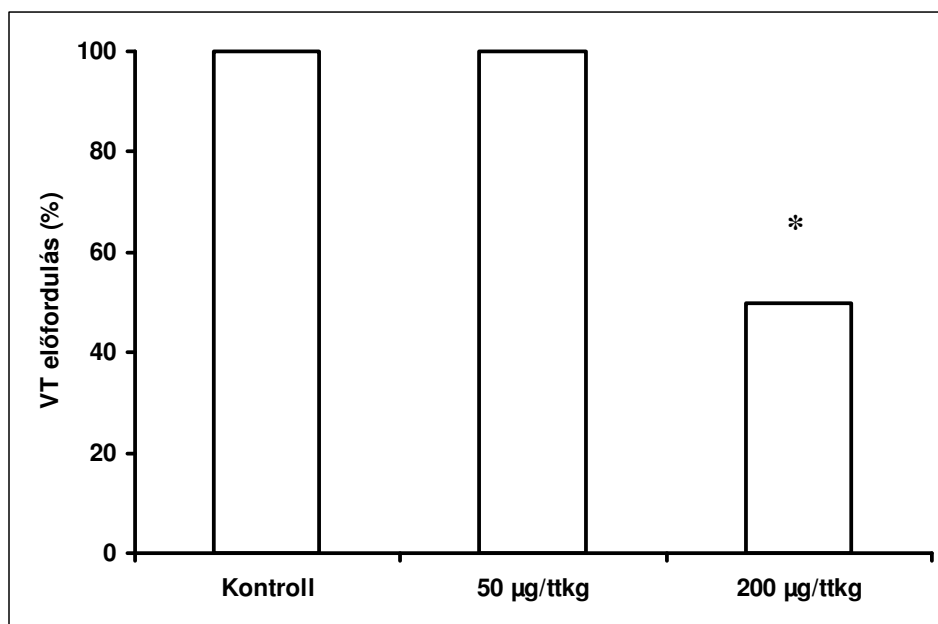
A 29. ábra jól mutatja, hogy a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció előfordulása az 50 µg/ttkg dózis esetében 90 %-ra, a 200 µg/ttkg dózis esetében pedig 40 %-ra csökkent a kezeletlen kontroll csoportban előforduló 100 %-os értékhez képest.



29. ábra

Az ACTH (4-10) hatása a kamrafibrilláció előfordulására  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

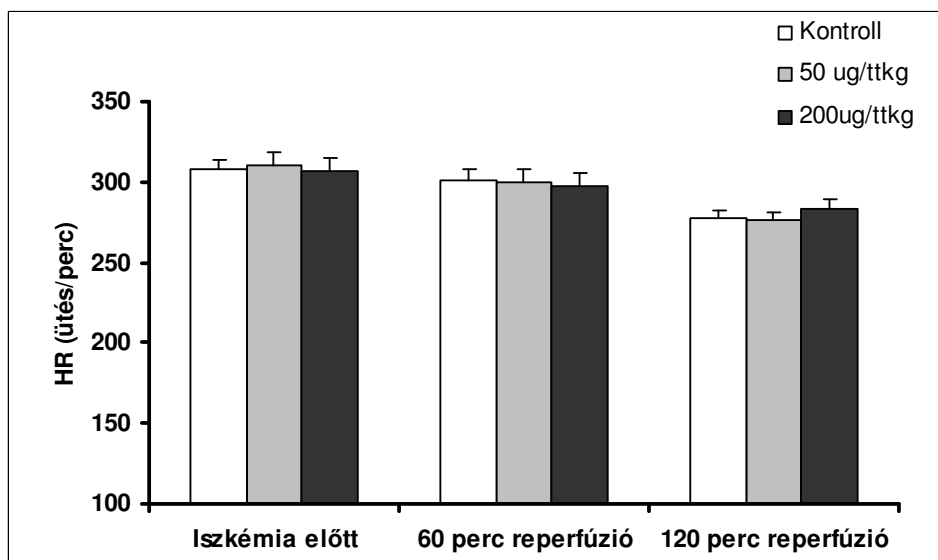
A kamrai tachycardia előfordulását az 50 µg/ttkg dózis nem, a 200 µg/ttkg dózis viszont 50 %-kal csökkentette, amit a 30. ábra mutat. Jelen adataink arra engednek következtetni, hogy az ACTH (4-10) nagyobb dózisban alkalmazva fejt ki a VT és a VF előfordulását csökkentő hatását, habár a protektív hatás kevésbé kifejezett, mint az az  $\alpha$ -MSH (ACTH 1-13) esetében tapasztalható volt (6).



30. ábra  
Az ACTH (4-10) hatása a kamrai tachycardia előfordulására  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva )

### ***Az ACTH (4-10) hatása a szívfunkciókra***

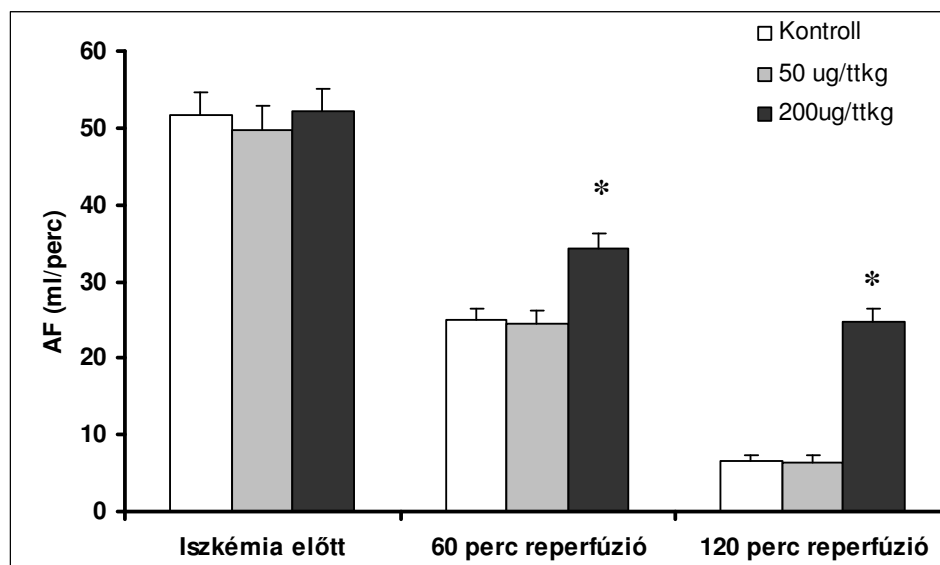
Általában véve az ACTH (4-10) előkezelés hatására a posztisztkémiás szívfunkciók javulást mutattak a kezeletlen kontroll csoport értékeihez képest. Ez a VT és VF előfordulást csökkentő tulajdonságra vezethető vissza. Érdekes módon a szívfrekvenciára az ACTH (4-10) egyik alkalmazott dózisa sem fejtett ki jelentős hatást (31. ábra).



31. ábra  
Az ACTH (4-10) hatása a szívfrekvenciára

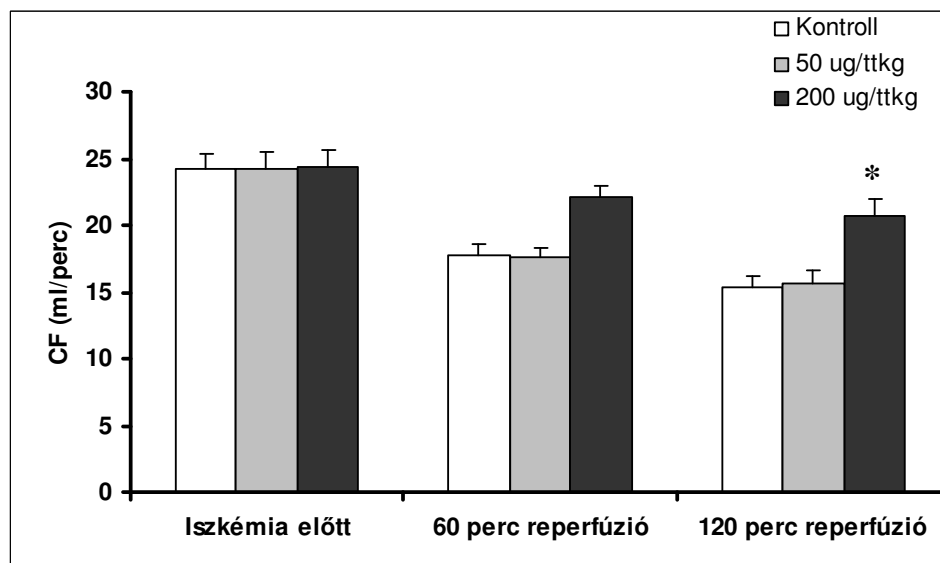
Az aorta kiáramlás a 200 µg/ttkg dózis alkalmazásakor jelentős mértékben javult a reperfúzió 60. és 120. percében egyaránt (AF:  $34.3 \pm 2$  ml/perc ill.  $24.75 \pm 1.8$  ml/perc) a

kontroll csoporthoz képest ( $25 \pm 1.4$  ml/perc ill.  $6.5 \pm 0.9$  ml/perc). Az alkalmazott kisebb dózissnál ( $50 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ ) szignifikáns javulást nem tapasztaltunk (32. ábra).

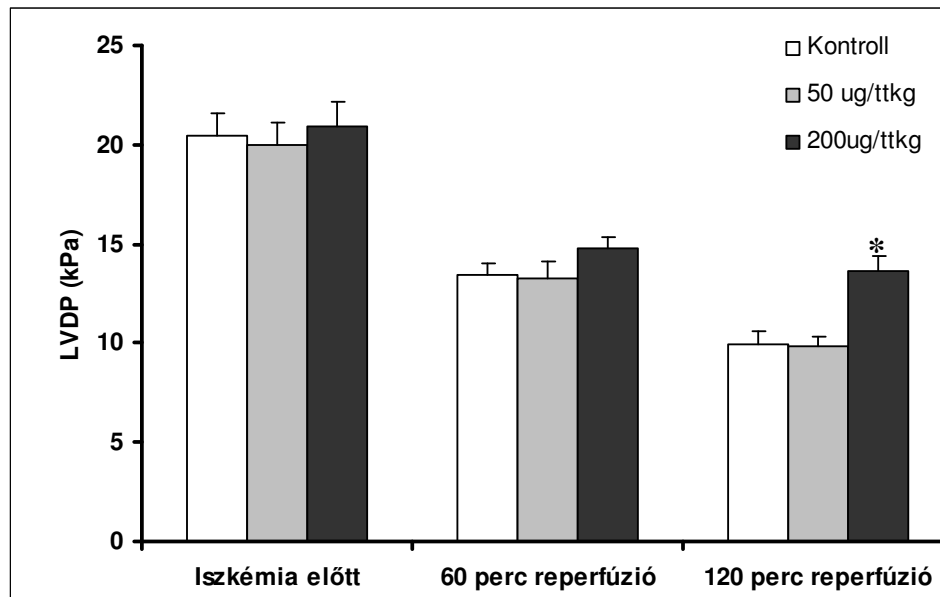


32. ábra  
Az ACTH (4-10) hatása az aorta kiáramlásra  
(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A koronária átáramlást (33. ábra) és a bal kamrai nyomást (34. ábra) tekintve szintén a  $200 \mu\text{g}/\text{ttkg}$  dózis bizonyult hatékonyabbnak. Bár a fent említett tényezők csak a reperfúzió 120. percében javultak jelentős mértékben (CF:  $20.7 \pm 1.3$  ml/perc, LVDP:  $13.65 \pm 0.7$  kPa) a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (CF:  $18.3 \pm 0.9$  ml/perc, LVDP:  $9.97 \pm 0.7$  kPa).



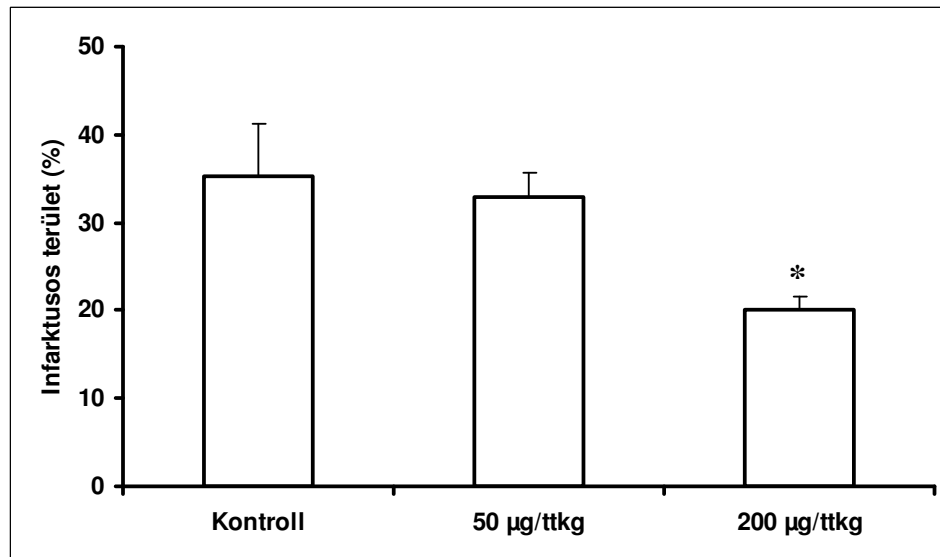
33. ábra  
Az ACTH (4-10) hatása a koronária átáramlásra  
(\*  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva)



34. ábra  
 Az ACTH (4-10) hatása a bal kamrai nyomásra  
 (\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

### ***Az ACTH (4-10) hatása az infarktusos terület nagyságára***

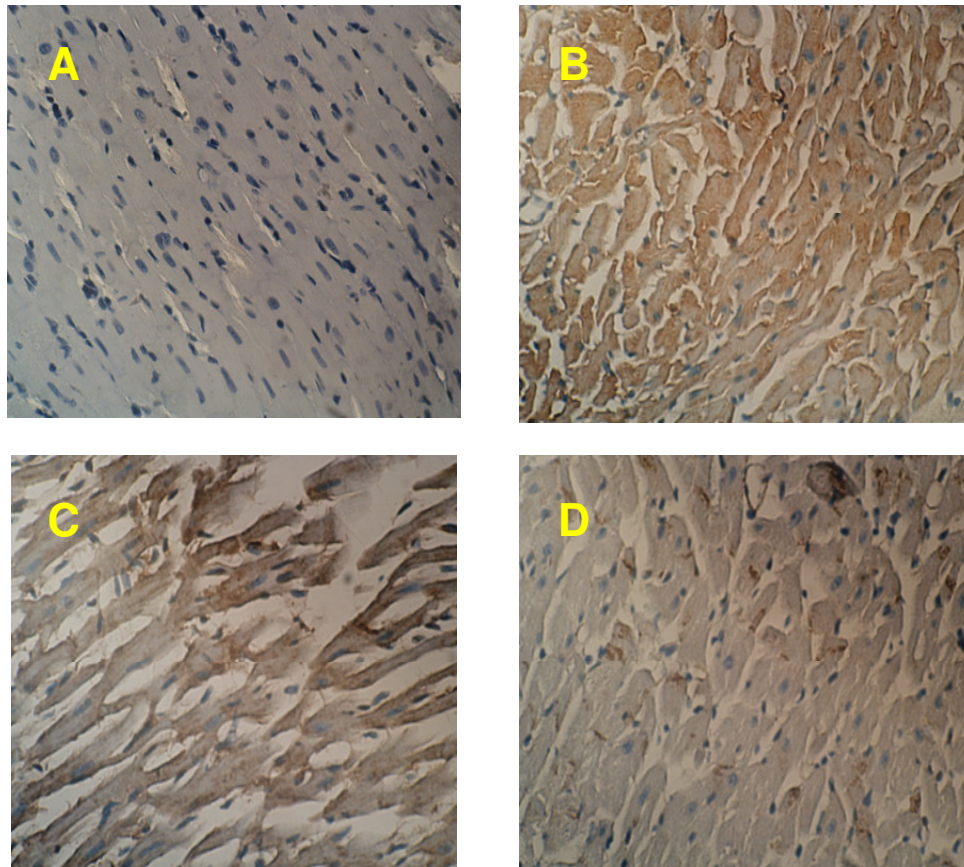
A 35. ábrán látható, hogy az infarktusos terület nagysága  $35.3 \pm 6 \%$  volt a kontroll csoportban. A  $200 \mu\text{g/ttkg}$  ACTH (4-10)-el kezelt szívek esetében ez az érték  $20.16 \pm 1.5 \%$  volt, ami jelentős mértékű csökkenés. A kisebb,  $50 \mu\text{g/ttkg}$  dózis esetében szignifikáns javulás nem volt észlelhető ( $33.0 \pm 2.6 \%$ ) (8. ábra).



35. ábra  
 Az ACTH (4-10) infarktusos területek nagyságára gyakorolt hatása  
 (\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

### ***Az ACTH (4-10) hatása a kaszpáz-3 aktivitásra***

Kaspáz-3 aktivitás csökkenést figyeltünk meg a kezelt szívekből kapott mintákban 30 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően. Az immunoreaktív kaszpáz-3 főként a kardiomiociták és a kapillárisok simaizom sejtjeinek citoplazmájában figyelhető meg. A 36. ábra mutatja a kaszpáz-3 aktivitás mértékét az egyes kezelt ill. kezeletlen szívekből származó mintákban. A kaszpáz-3 aktivitás csökkenését a kezelt szívekben a barna festődés intenzitásának csökkenése jelzi. A kaszpáz-3 aktivitás csökkenését Western blot analízissel is alátámasztottuk.



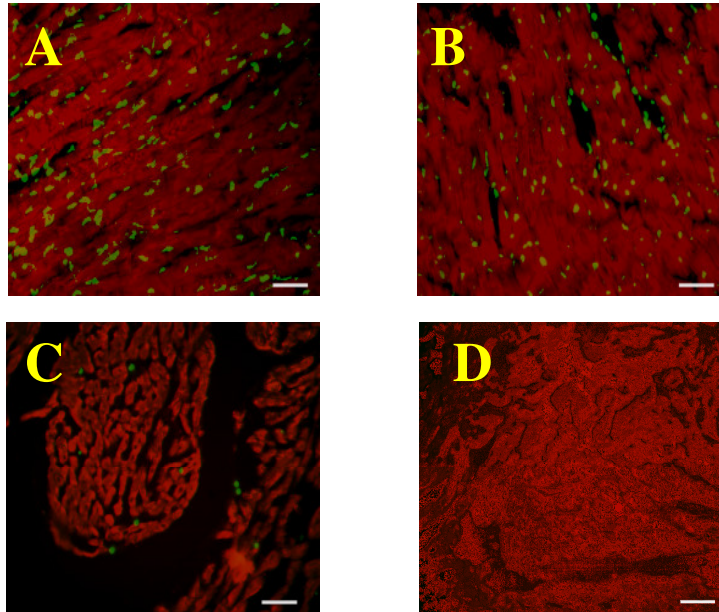
36. ábra

Kaspáz-3 aktivitás immunhisztokémiai vizsgálata

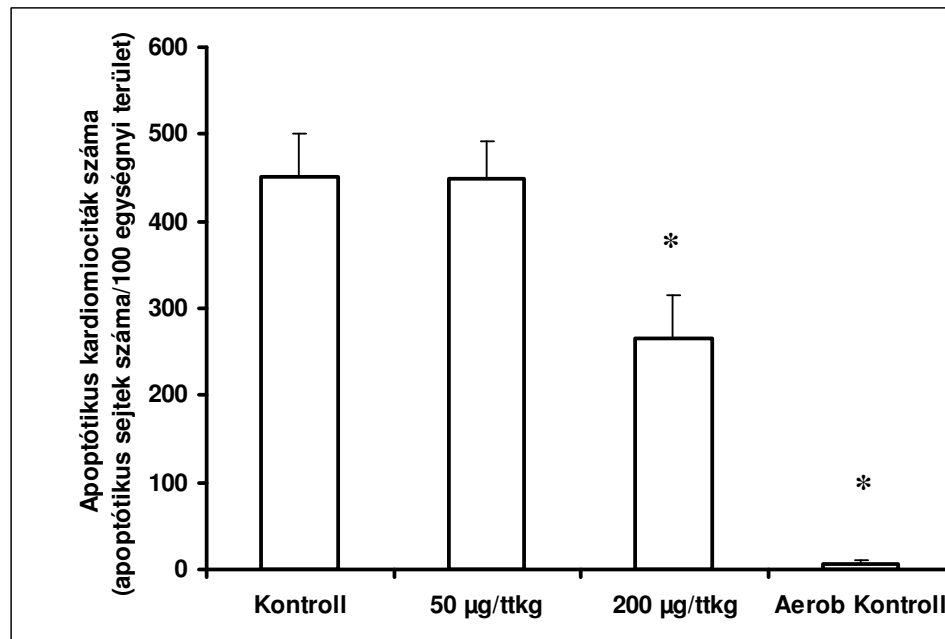
A: iszkémia nélküli kontroll; B: iszkémia / reperfundált kezeletlen kontroll; C: iszkémia / reperfundált 50 µg/kg ACTH (4-10)-el kezelt miokardium; D: iszkémia / reperfundált 200 µg/kg ACTH (4-10)-el kezelt miokardium

### ***Az ACTH (4-10) hatása a kardiomiociták és az endothel sejtek apoptózisára***

Hasonlóan az infarktusz terület csökkenéséhez, az apoptotikus kardiomiociták száma is szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz ( $451 \pm 49.6$  apoptotikus sejt/100 egységnyi terület) viszonyítva, ha a szívet előzetesen az ACTH (4-10) nagyobb, 200  $\mu\text{g}/\text{tkg}$  dóziséval kezeltük elő ( $266.25 \pm 49.14$  apoptotikus sejt/100 egységnyi terület). Az ACTH (4-10) kisebb dózisa (50  $\mu\text{g}/\text{tkg}$ ) nem nyújtott szignifikáns védelmet (37. ábra).



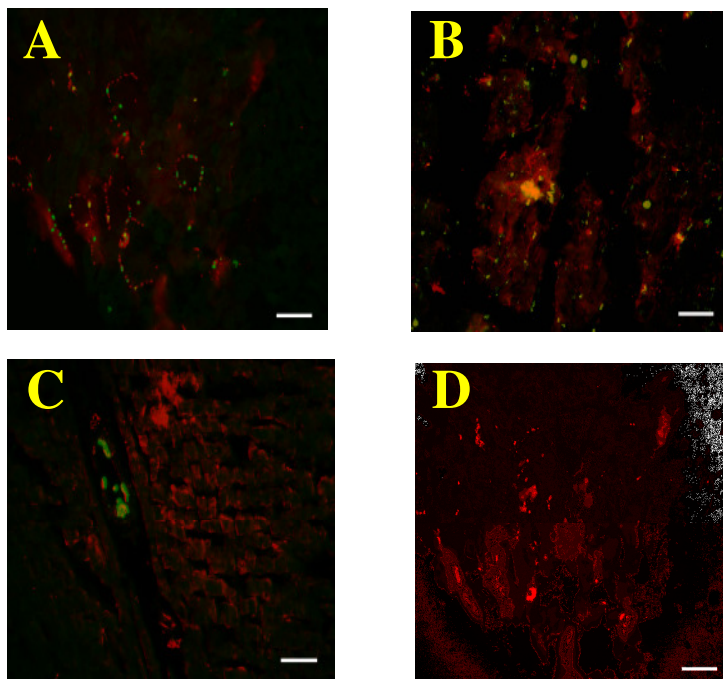
A: iszkémia / reperfundált, anaerob kontroll, B: 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ACTH (4-10)-el kezelt miokardium  
C: 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ACTH (4-10)-el kezelt miokardium, D: iszkémia nélküli, aerob kontroll



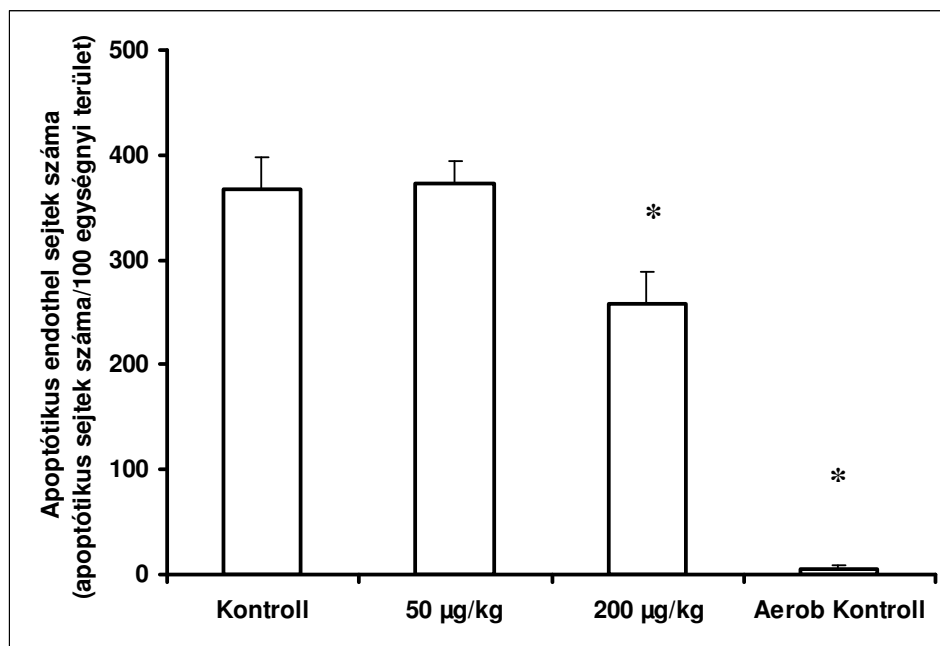
37. ábra

Az ACTH (4-10) a kardiomiociták apoptózisára gyakorolt hatásának vizsgálata TUNEL módszerrel (\*  $p < 0,05$  a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva)

A 38. ábrán látható, hogy az endothel sejtek tekintetében hasonló irányú változás figyelhető meg. A kontroll csoportnál mért értékekhez képest ( $366.6 \pm 31.3$  apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület) az alkalmazott magasabb dózisban az ACTH (4-10) szignifikánsan csökkentette az apoptózis mértékét ( $257.5 \pm 31.2$  apoptotikus sejtszám/100 egységnyi terület).



A: iszkémia / reperfundált, anaerob kontroll, B: 50 µg/kg ACTH (4-10)-el kezelt miokardium  
C: 200 µg/kg ACTH (4-10)-el kezelt miokardium, D: iszkémia nélküli, aerob kontroll



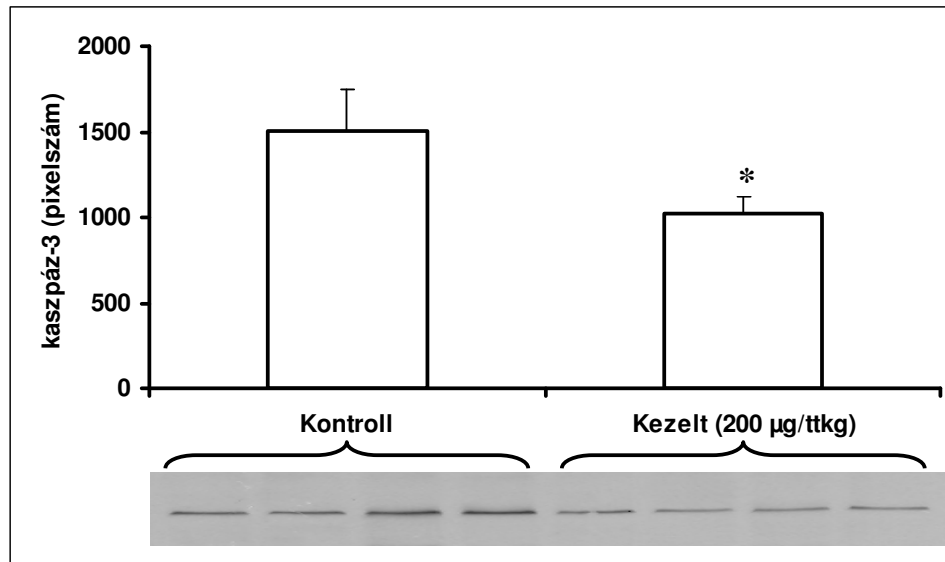
38. ábra

Az 50 és 200 µg/kg dózisú ACTH (4-10) endothel sejtek apoptózisára gyakorolt hatásának vizsgálata TUNEL módszerrel

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

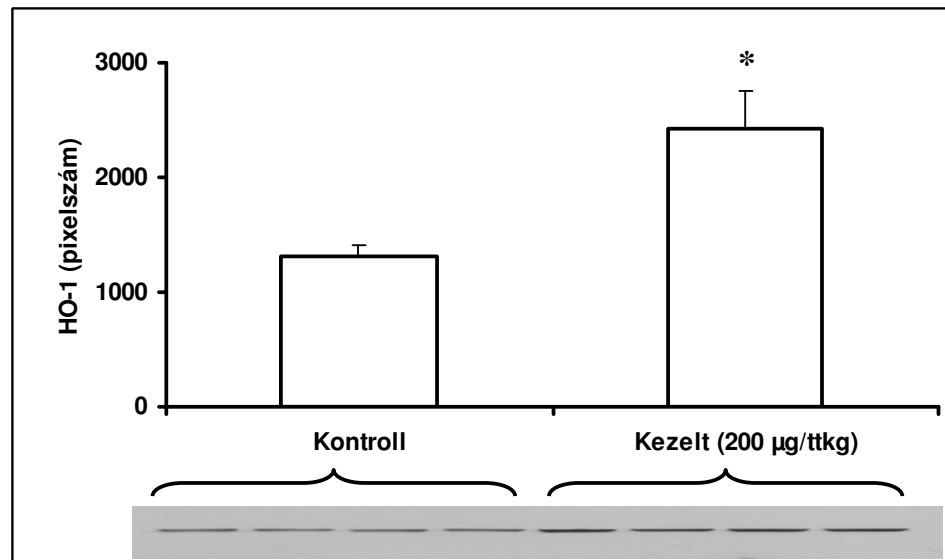
### Az ACTH (4-10) hatása a kaszpáz-3 és a HO-1 expressziójára

Az iszkémia / reperfúzió indukálta kaszpáz-3 expresszió a nagyobb dózisu ACTH (4-10) előkezelés hatására csökkent (39. ábra). A Western blot analízis megerősítette a szemikvantitatív immunhisztokémiás vizsgálatok eredményeit. A továbbiakban vizsgáltuk az ACTH (4-10) előkezelés hatásait a HO-1 szignálfolyamataira. A 40. ábra jól mutatja, hogy a 200 µg/ttkg dózisu előkezelés eredményeképp a HO-1 expresszió szignifikáns mértékben (kb. 1.8-szeresére) megnövekedett.



39. ábra

200 µg/kg dózisu ACTH (4-10) hatása a kaszpáz-3 expressziójára  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)



40. ábra

200 µg/kg dózisu ACTH (4-10) hatása a HO-1 expressziójára  
(\* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

## **Diszkusszió**

### **a.) Prekondicionálás hatása az infarktusz terület nagyságára**

Már több évtizede vizsgálják a korai és késői prekondicionálás jelentőségét (7, 39, 40, 41). Az igen nagyszámú tanulmány alapján elmondható, hogy a jelenség inkább összetett mechanizmusok interakciójából jön létre, mintsem, hogy egyetlen folyamat egyedül lenne felelős a kardioprotektív hatásokért. Az alábbiakban összefoglaljuk a legfontosabbakat, természetesen a teljesség igénye nélkül:

Az  $\alpha$ -adrenoceptorok (42), a protein tirozin kinázok (43), a foszfolipáz D (44), a delta-opioid receptorok (45, 46), a bradikinin (47), a prostanoidok (48, 49, 50) és az angiotenzin receptorok (51) szerepe mind igazolást nyert a prekondicionálás folyamatának kiváltásában és szabályzásában. Ezek mellett mégis a két legfontosabb szabályzó mechanizmusnak az ATP-szenzitív  $K^+$  csatornák és az adenzin ill. az adenzin-receptorok működését tarják (52, 53, 54, 55).

Kísérleteinknek nem volt alapvető célja a hatásmechanizmusok feltérképezése. Mivel a PC jelenségét túlnyomórészt csak egészséges szíveken tanulmányozták, ezért feladatunknak tekintettük inkább annak vizsgálatát, hogy a PC pozitív hatásai érvényesülnek-e előzőlegesen megbetegedett (hiperkoleszterinémias) szíveken és képes-e csökkenteni az infarktusz terület nagyságát.

Amint azt már említettük, viszonylag kevés információ áll rendelkezésre a jelenségről beteg (diabétesz, hipertrófia, arterioszklerózis) szívekben. Leírták például, hogy a szívinfarktus prognózisa diabéteszben szenvedő betegeknél lényegesen rosszabb a magasabb halálozási arány miatt, mint a nem-diabéteszesek között (56). Érdekes említést tenni egy másik tanulmányról, melyben arra a megállapításra jutottak, hogy a diabéteszes szívekben a prekondicionálás kardioprotektív hatásának elmaradása a mitokondriális  $K_{ATP}$ -csatornák diszfunkciójára vezethető vissza, amely egy, az egészséges szívektől eltérő szignál-transzdukciós útvonalat eredményez (57).

Ahhoz, hogy meghatározzuk a hiperkoleszterinémia befolyását a PC előnyös hatásaira, az infarktusz területek nagyságát hasonlítottuk össze azonos korú, hiperkoleszterinémias és nem-hiperkoleszterinémias nyulak izolált szíveiben 30 perc iszkémia és 120 perc reperfüzió után. Eredményeink jól mutatják, hogy a PC hatására az infarktusz területek nagysága a hiperkoleszterinémias csoportban a ciklusok számától függően szignifikánsan megnőtt. A hiperkoleszterinémia előrehaladtával, 8 hét után szívelégtelenség jelei alakultak ki még az I/R-t és a PC-t megelőzően.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a hiperlipidémia és/vagy hiperkoleszterinémia károsan befolyásolja a PC hatásait, bár a folyamat pontos okát még nem ismerjük. Úgy tűnik, hogy a szérum/membrán lipidek akkumulációja és redistribúciója illetve a mitokondriális és a szarkolemma membrán mikroviszkozitásának megváltozása inkább felelősek, mint a szérum magas lipoprotein szintje és az ateroszklerózis, mert a miociták morfológiája már tíz napos koleszterindús diéta esetén is változást mutatott (58, 59).

Összefoglalva, eredményeink rámutattak, hogy a folyamatosan fennálló hiperlipidémia megszünteti a PC kardioprotektív hatásait az I/R során, valamint, hogy a PC csak az egészséges szívsvövet képes megvédeni az iszkémia/reperfúzió szövetkárosító hatásaitól.

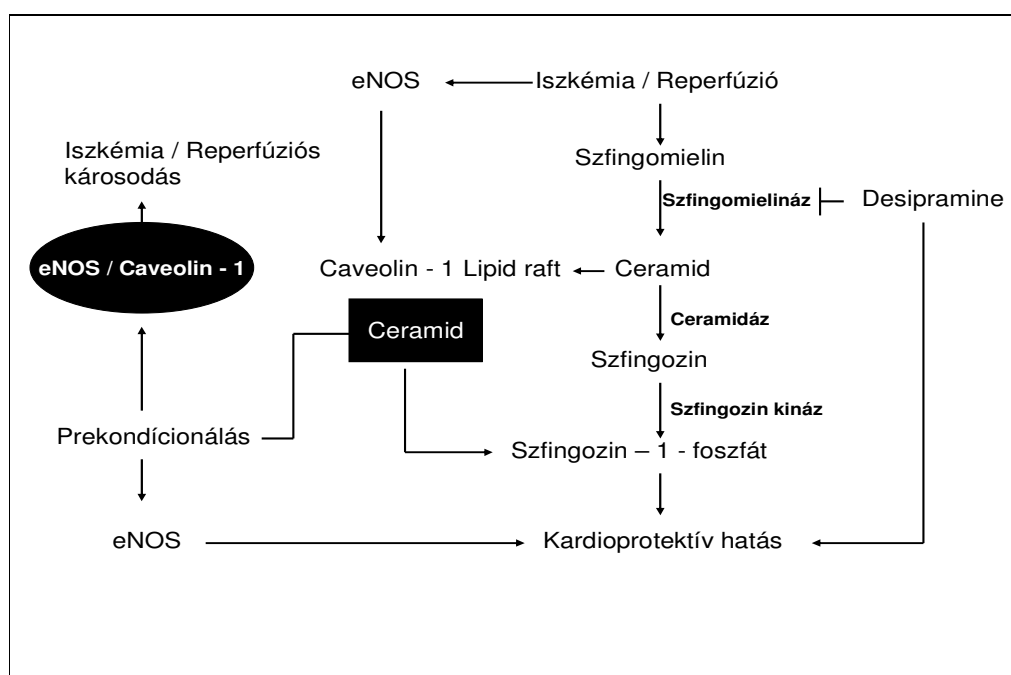
## **b.) A lipid raftok szerepe**

Kísérleteink kimutatták, hogy I/R hatására jelentős mennyiségű ceramid halmozódik fel a caveolinban gazdag membránban. A megnövekedett mennyiségű eNOS pedig asszociálódik a Caveolin-1-el. A PC hatására a ceramid mennyisége csökken, míg metabolitja, a szfingozin-1-foszfát felhalmozódik. A caveolin-1-hez kapcsolódott eNOS mennyisége csökken, ha a szívet előzőleg PC-nak vetettük alá. Ha a ceramid képződést desipramine-al gátoljuk, az előzőekhez hasonlóan a ceramid mennyiségének és az eNOS-Caveolin-1 kapcsolódás csökkenését figyelhetjük meg, de a szfingozin-1-foszfát felhalmozódása nélkül. Mind a PC, mind pedig a desipramine hatására javult a szívfunkció, csökkent az infarktusos terület nagysága és a kardiomiocita apoptózis mértéke. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az I/R hatására emelkedik ugyan az eNOS mennyisége, de a Caveolin-1-hez való kapcsolódás miatt, ez a szív számára nem jelent hasznot. A PC során csökken az eNOS-Caveolin-1 kapcsolódás és nő a szabad eNOS mennyisége, ezáltal pedig NO szabadulhat fel.

A NO szerepe az I/R során már régóta vitatott kérdés. Annak ellenére, hogy a NO mennyisége nő I/R során (60), az exogén NO kardioprotektív hatása bizonyított (61, 62). Ez azzal magyarázható, hogy a NO felszabadulás a reperfúzió során csökken (63). Jelen eredményeink magyarázatot adhatnak a NO paradox viselkedésére. Kísérleteink rámutattak arra, hogy a I/R hatására felszabaduló NO-t a miokardium nem képes hasznosítani, mert az eNOS asszociálódik a Caveolin-1-el. Úgy tűnik, hogy a PC, legalábbis részben, triggereli az eNOS felszabadulását, ezáltal a felszabadult NO elérhetővé válik a szívsvövet számára a reperfúzió során.

A miociták membránjában elhelyezkedő szfingomielin az I/R során lebomlik és ceramid valamint szfingozin képződik. Az előbbi szerepet játszik az I/R okozta

szívizomkárosodásban (64). A szfingomielin hidrolízisét a szfingomielinázok katalizálják, amelyek hidrolizálják a foszfodiészter kötést. Ennek révén ceramid és foszfokolin keletkezik. Jelen tanulmány arra is rámutatott, hogy a ceramidképződés fokozódott a reperfúzió során az iszkémiás szívszövetben. Nemrég bizonyították a desipramine kardioprotektív hatását, amelyet a ceramid képződés gátlása révén fejt ki. Normál körülmények közt a ceramid gyorsan metabolizálódik és szfingozin, majd szfingozin-1-foszfát keletkezik. Ez utóbbi szintén rendelkezik kardioprotektív hatással (65). A szfingozin-1-foszfát „túlélő szignált” közvetít a PI-3 kináz, az Akt és a Bcl-2 aktiválásával (66). A szfingomielin metabolizmusának folyamatát a 41. ábra mutatja. A folyamatot követve könnyű belátni, hogy a ceramid felhalmozódása a szfingozin-1-foszfát csökkenését vonja maga után, ami I/R során általánosan előforduló jelenség.



41. ábra

Korábbi kísérletekben rámutattak arra, hogy az I/R együtt jár a foszfolipidek metabolizmusával és a foszfoinozítid válasz létrejöttével (11, 12). Jelen vizsgálataink megerősítették megállapításainkat, valamint rámutattak arra, hogy a szfingomielin lebomlása caveolákban megfigyelhető ceramid felhalmozódást eredményez. A proapoptotikus tulajdonsággal bíró ceramid (67, 13) funkciózavarokat indukál az iszkémiás szívben. Mára bizonyítást nyert, hogy a szfingomielin metabolizmusánál keletkező anyagok fontos szerepet játszanak a programozott sejthalál folyamatában (68).

A kísérletek során az iszkémiát követően a szívfunkciós paraméterek romlottak, ahogyan az várható volt. A romlás hátterében a kontraktilitás csökkenése és a sejtpusztulás áll. Mind a desipramine, mind a PC javított a funkciós paramétereken. Fontos megemlíteni azonban, hogy bár a desipramine és a PC rendelkezik kardioprotektív tulajdonsággal, ez irányú hatásmechanizmusaik eltérnek egymástól. A desipramine csökkenti a ceramid képződését, ami valószínűleg hatással van a lipid raftok képződésére. A PC pedig stimulálja a ceramid lebomlását, ami a kardioprotektív hatással bíró szfingozin-1-foszfát képződését eredményezi. A szfingozin-1-foszfát a szfingozin kináz enzim közreműködésével szfingozin foszforilálódásával jön létre, ami pedig a ceramid metabolitja. A szfingozin-1-foszfát a ceramidtól eltérően túlélő szignált közvetít és védi a sejteket a ceramid mediálta apoptózissal szemben (15). Ezen felül a szfingozin-1-foszfát, mint szekunder messenger számos biológiai folyamatban szerepet játszik (pl. stimulálja a növekedési faktorokat, citokineket, oxidált LDL-t) (16).

Mind a PC, mind pedig a desipramine gátolja az eNOS kapcsolódását a Caveolin-1-el. Nemrég rámutattak arra, hogy a ceramid a lipid raftokon belül lokalizálódik (69). Egy másik publikáció pedig beszámol arról, hogy a raft mikrodomainekben a stressz indukálta változások módosítják a tirozin kináz receptor szignál transzdukciós folyamatait, azáltal, hogy a ceramid modulálja a Caveolin-1 működését (70). Jelen kísérleteink azt a nézetet is alátámasztják, hogy a ceramid-caveolin-1 interakció a lipid raft membránján belül történik.

### **c.) A Makhana kezelés hatásai**

Kísérleteinknek több említésre méltó eredménye van. Először is, a Makhana akár akut módon alkalmazzuk az izolált szívek közvetlen perfúziójával, akár krónikusan - amikor a kísérleti állatokat 21 napon át perorálisan kezeltük - rendelkezik kardioprotektív hatással, amit a magasabb posztiszkémiás szívfunkciós adatok és az infarktusz terület csökkenése támaszt alá. A Makhana kivonat dóziszfüggő módon kötötte meg a szuperoxid anionokat és a hidroxil gyököket. Fontos továbbá megemlíteni, hogy két, a redoxreguláció folyamataiban fontos protein (TRP32, TRX1) is indukálódott a kezelt szívekben.

A Makhana (*Euryale ferox*) régóta széleskörben alkalmazott növény a keleti gyógyászatban. Olyan betegségek gyógyításában használják, mint például a krónikus hasmenés, vesebántalmak, a fehér folyás vagy a lép elégtelen működése. Nemrégiben kimutatták, hogy a Makhana kivonat jelentős mértékű szabadgyök-megkötő tulajdonsággal rendelkezik, ezen kívül javítja az oxidatív ágenseknek kitett kínai hörcsög tüdő fibroblast sejtek életképességét (26). A Makhana kivonat dóziszfüggően növelni képes olyan antioxidáns

enzimek aktivitását, mint az SOD, kataláz és glutation peroxidáz. Mivel az oxidatív szabadgyökök nagymértékű termelődése és az antioxidáns tartalékok csökkenése kulcsszerepet játszik az iszkémia/reperfúzió okozta szívizom károsodások patofiziológiájában, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Makhana ellenállóbbá teszi-e a szívet az iszkémia/reperfúzió okozta szívizom károsodásokkal szemben. Az eredményeink rámutattak arra, hogy a Makhana mind akutan, az iszkémiás történés előtt adva, mind krónikusan, perorális előkezeléssel, javította a posztiszkémiás kamrai felépülést és csökkentette az infarktusos terület nagyságát. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a Makhana már extrém kis koncentrációban (0.005 %) képes megkötni a szuperoxid anionok és a OH<sup>-</sup> szabadgyökök csaknem 100 %-át.

Számos közlemény foglalkozik olyan redox proteinek kardioprotektív szerepével, mint az ubikviter thioredoxin. Egy nemrégiben megjelent tanulmányban leírták a TRX1 protein szintjének jelentős csökkenését iszkémiás szívizomban (71). Ha a szív prekondicionálással adaptálódik az iszkémiás stresszhez, a TRX1 expressziója megnövekszik. Az expresszió gátlása csökkent posztiszkémiás kamrai felépülést és megnövekedett infarktusos területet eredményez a prekondicionált szívben. Ezt a tényt alátámasztja, hogy a TRX1 enzimet overexpresszáló egérszívek ellenállóbbak voltak az iszkémia/reperfúzió okozta károsodásokkal szemben a vad típusú szívekhez viszonyítva (71).

Az emlős sejtekben ugyancsak ubikviter TRP32, egy 32 kDA nagyságú, az N-terminális végen TRX domainnel rendelkező protein (72). Az enzim funkciója még nem teljesen feltárt, de valószínűleg a citoplazmában levő fehérjék és transzkripciós faktorok redox regulációjában játszik szerepet. A DNS-kötő transzkripciós faktor NFκB például tiol-redox szabályzás alatt áll (73) és a TRP32 fokozza az NFκB p50-es alegységének DNS-kötő és transzkripciós aktivitását (74). Az NFκB pedig szerepet játszik a miokardium iszkémiához való adaptációjának folyamatában.

#### **d.) Az ACTH (4-10) hatásai**

Az iszkémiát követő reperfúzió kétségkívül előfeltétele az érintett sejtek túlélésének, de nem zajlik minden káros következmény nélkül. A reperfúziós folyamat egyes komponensei átmenetileg megnövelhetik a kamrai aritmiák előfordulásának valószínűségét, amelyek a szívfunkciós paraméterek romlását eredményezik. Mindezek ismeretében alapvető fontosságúnak látszik a szívszövet védelme az iszkémia/reperfúzió nyomán létrejövő károsodásokkal szemben. Az utóbbi években számos faktorról derült ki, hogy fontos szerepet

játszik az I/R folyamatában, ezen faktorok egymáshoz való viszonyáról azonban számos esetben vitatott és ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre.

Előzőleg már bizonyítást nyert, hogy bizonyos melanocortinok (pl.  $\alpha$ -MSH) képesek pozitívan befolyásolni a miokardiális iszkémia káros következményeit. Kísérleteinkben azt kívántuk tanulmányozni, hogy az  $\alpha$ -MSH egy kisebb fragmentumával, az ACTH (4-10)-el történő előkezelés védelmet nyújt-e a szívszövet számára az I/R káros hatásaival szemben. Ennek érdekében vizsgáltuk, hogy az ACTH (4-10) javítja-e a posztisztkémiás szív funkcióit, csökkenti-e a reperfúzió során kialakuló kamrai fibrilláció és tachycardia előfordulását, csökkenti-e az infarktusz terület nagyságát, csökkenti-e a szívizom- és endothelsejtek apoptotikus pusztulását, valamint hatással van-e a kaszpáz-3 aktivitására és a HO-1 enzim szignálfolyamataira. A melanocortinok ezirányú hatásainak mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, bár az utóbbi időben megjelentek publikációk, amelyek magyarázattal szolgálnak ezekre (**75, 76**). Úgy tűnik, hogy az adrenocorticotrop hormonok protektív hatásai részben a szabad gyökök képződésének gátlására, részben pedig gyulladáscsökkentő tulajdonságaikra vezethető vissza. A gyulladáscsökkentő hatás a MCR-1 és MCR-3 receptorokhoz kapcsolódik (**77, 78**). Továbbá a melanocortinok ezen hatása összefüggésbe hozható egyes gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) csökkent termelődésével, valamint az IL-10 és IL-8 gyulladásgátló mediátorok fokozott termelődésével (**79**). A melanocortinok immunrendszerben betöltött szerepe rendkívül összetett és csak részben feltárt. Ismert például, hogy az exogén  $\alpha$ -MSH gátolja a LPS indukálta TNF- $\alpha$  felszabadulását a vérben in vitro körülmények között (**80**). Ismert továbbá, hogy a POMC-t és derivátumait számos sejt – monocyták, melanocyták, endothel sejtek - termeli. Ezek alapján logikusnak tűnik feltételezni, hogy az  $\alpha$ -MSH és más ACTH fragmentumok szerepet játszanak egyes gyulladáskeltő mediátorok felszabadulásának csökkentésében a szívben és más szervekben egyaránt (**81, 82**).

A miokardiumban kialakuló programozott sejthalál összefüggésbe hozható mind az I/R során létrejövő károsodással, mind pedig számos olyan extrém mértékű mechanikai igénybevétellel, amely fokozott kamrai terheléssel jár. Mind in vitro, mind in vivo körülmények között a hipoxia és az iszkémia aktiválni képesek a kardiomiocitákban és az endothel sejtekben a programozott sejthalált. Az apoptózis gyakran kialakul akut és krónikus szövetkárosodások folyamán, a folyamatért felelős szignáltranszdukciós lépések még nem teljesen ismertek. Az apoptózis molekuláris mechanizmusa meglehetősen bonyolult és változatos, valamint igen sok faktorról feltételezhető, hogy fontos szerepet játszik az apoptotikus és a nekrotikus folyamatokban egyaránt. Egy korábbi kísérletben már bizonyítást

nyert, hogy az  $\alpha$ -MSH gátolni képes az apoptótikus sejtpusztulást (6). Jelen kísérleteinkben pedig a His-Phe-Arg-Trp „magot” ugyancsak tartalmazó ACTH (4-10) antiapoptótikus hatásait vizsgáltuk kardiomiocitákban és endothel sejtekben. A kaszpáz-3 szerepe a programozott sejthalál folyamatában ma már jól ismert. Ez a faktor a kaszpáz-9 hatására aktiválódik, amit viszont a citokróm-c, a mitokondriumok vagy kaszpáz-8 aktivál (83). Továbbá a kaszpáz-3-at az alábbiak is aktiválják: a bcl-2 család, a bax (84), a TNF- $\alpha$ , a TNF- $\alpha$  receptor (83), a Fas/FasL valamint a jobb kamrai dysplasia és a végstádiumú szívszélhűdés (85, 86, 87). Nemrég publikálásra került, hogy specifikus inhibitorral gátolt kaszpáz aktivitás következtében csökken az infarktusz terület nagysága a patkányszívekben a koronária artéria lekötését követően (88), de az ok-okozati összefüggés a kaszpáz-3 aktivitás és a szívfunkciók között még nem teljesen tisztázott (85). Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az ACTH (4-10) jótékony hatásai a kaszpáz-3 aktivitáscsökkentő tulajdonságra vezethetők vissza, ezáltal, vagy legalábbis részben emiatt, az apoptózis okozta sejtpusztulás is kisebb mértékű lesz. Ezt támasztják alá az immunhisztokémiai, TUNEL és Western blot vizsgálatok eredményei is.

Az apoptózis csökkenésének másik oka lehet a HO-1 protein fokozott expressziója. A HO-1 indukálása igen fontos védelmi tényezőnek tűnik az iszkémia/reperfundált szívizomban. A hemoxigenáz enzim szerepe jól ismert számos kórképben (I/R, hipertenzió, kardiomiopátia, szerv transzplantáció, endotoxémia, immunszuppresszió) (89). Zou és mtsai kimutatták, hogy a reperfüzió első órájában történő  $\alpha$ -MSH kezelés hatására nő a HO-1 expressziója bélszövet I/R modellben (90). A HO-1 antiapoptótikus hatásainak pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. Egy lehetséges magyarázat lehet, hogy a bilirubin védelmet biztosít a kardiomiociták számára az oxidatív károsodásokkal szemben (91, 92). Ezért vizsgáltuk azt, hogy az ACTH (4-10) előkezelés hatással van-e a HO-1 működésére kísérleti modellünkben. Eredményeink rámutattak arra, hogy az előkezelés hatására növekszik a HO-1 expresszió a szívszövetben, amely egy alapvető mechanizmusa lehet az ACTH (4-10) kardioprotektív hatásának.

## Összegzés

A szívizom I/R egyike a kardiális morbiditás és mortalitás általános okozóinak. A szív csökkent oxigénellátása és reperfúziója súlyos klinikai következményekkel jár. Vizsgálataink során az iszkémia majd a reperfúzió indukálta károsodások farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk.

Kísérleteink első részében arra kerestük a választ, hogy a PC védő hatásai kifejeződésre jutnak-e előzetesen már megbetegített (hiperkoleszterinemiás) szívekben is. Azt tapasztaltuk, hogy a 3XPC ill. a 4XPC szignifikáns mértékben növelte az infarktusos terület kiterjedését a hiperkoleszterinemiás csoportban. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a PC csak az egészséges szívszövetet képes megvédeni az iszkémiától. A beteg miokardiumban nem figyelhetők meg a PC előnyös hatásai.

Kísérleteink második részében arra kerestük a választ, hogy milyen szerepet játszanak a lipid raftok a ceramid és a NO szignálfolyamataiban iszkémiás illetve prekondicionált szívekben. Eredményeink megerősítik azt a koncepciót, hogy a ceramid az I/R során hajlamos a lipid raftokkal asszociálni, amelyekben az eNOS kapcsolódik a Caveolin-1-el és ezáltal hozzáférhetetlenné válik a szívizomszövet számára. A PC fokozza a ceramid lebontását, ezáltal fokozódik a kardioprotektív szfingozin-1-foszfát termelődése és az eNOS felszabadulás a caveolákból. Továbbá eredményeink egyfajta magyarázatot nyújtanak a NO ellentmondásos viselkedésére az iszkémia/reperfundált és a prekondicionált szívizomszövetben. Az I/R ugyanis csökkenti a felhasználható NO mennyiségét azáltal, hogy az eNOS kötődik a Caveolin-1-hez. A PC pedig felbontja ezt a kötődést és a NO hozzáférhetővé válik a szív számára.

A dolgozat harmadik része a Makhana lehetséges kardioprotektív hatásait vizsgálta akut illetve krónikus modellen. A kísérleteink során kapott eredmények rámutatnak, hogy a Makhana legalább két különféle mechanizmus révén fejt ki kardioprotektív hatásait. Az egyik azon alapul, hogy a Makhana képes megkötni az iszkémia/reperfúzió során keletkezett reaktív szabadgyököket. Az antibody array segítségével kimutattuk, hogy a Makhánával krónikusan kezelt szívekben fokozódott a TRX1 és TRP32 enzimek expressziója. Ez arra enged következtetni, hogy a Makhana a szív redox státuszát is modulálja. Ezirányú eredményeinket Western blot analízissel is alátámasztottuk.

Kísérleteink utolsó részében az ACTH (4-10) hatását vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a 200 µg/ttkg ACTH (4-10) előkezelés szignifikáns javulást idézett elő a szívfunkciós paraméterekben, csökkentette az infarktusos terület nagyságát ill. a

kardiomiociták és endothel sejtek apoptózisának mértékét is. Az alacsonyabb koncentráció (50 µg/ttkg) szignifikáns javulást nem okozott a posztisztkémiás károsodások megelőzésében. Mivel jelen kísérletben az ACTH (4-10) az iszkémiát megelőzően került alkalmazásra, további vizsgálatokra van szükség annak érdekében, hogy még pontosabb képet kapjunk a hatásmechanizmusról, valamint, hogy megtaláljuk a leghatékonyabb ACTH fragmentumot, hormonális mellékhatások nélkül.

## **Summary**

Cardiac ischemia/reperfusion is among the most common causes of morbidity and mortality. Decreased oxygen supply and perfusion can cause serious injuries. The overall aims of our studies were to investigate pharmacological approaches capable of reducing ischemia/reperfusion induced damage.

In the first part of our experiments, we examined the effects of preconditioning (PC) on the infarct size in isolated rabbit hearts with hypercholesterolemia. The results clearly show that 3XPC and 4XPC significantly increased the infarct size in group with hypercholesterolemia. In conclusion, the PC is only effective on “healthy heart” and the beneficial effects of PC cannot be seen in hearts with hypercholesterolemia.

In the second part of our study, we examined the role of lipid rafts in ceramide and NO signaling in the ischemic and preconditioned hearts. Our results confirm the concept that ceramide can associate with lipid rafts, where eNOS, which is induced by I/R, become associated with caveolin-1 consequently the generated NO become unavailable to the heart tissue. PC can increase the metabolism of ceramide, thus, the generation of the cardioprotective sphingosine-1-phosphate and the release of eNOS from caveolae are also increasing. Furthermore, our results can give an explanation for the dichotomy of NO behaviour in the heart during I/R and PC. I/R decreases the availability of NO for the heart tissue by the association of eNOS with caveolin-1. The process of PC can dissociate this and makes NO available again.

In the third part of our study we focused on the cardioprotective effects of Makhana in acute and chronic model. The results of our study suggest that Makhana has two different cardioprotective properties. First Makhana has potent reactive oxygen scavenging activity. The antibody array test results showed that the expression of TRX1 and TRP32 proteins are increased in chronic model. These points to the fact that Makhana can modulate the redox state of the heart by this way. These results were also confirmed by Western blot analysis.

In the last part of our study, we examined the effect of the treatment of ACTH (4-10). Our results demonstrate that the ACTH (4-10) in 200 µg/kg dose can improve the postischemic cardiac function, decrease the infarct size and reduce the number of apoptotic cardiomyocytes and endothelial cells. The lower concentration of ACTH (4-10) (50 µg/kg) could not reduce the cardiac failure significantly. Considerably more experimentation will be needed in the field of ischemia/reperfusion-induced injury in order to establish the most helpful cardioprotective ACTH fragment without any adrenocorticotrophic side-effects.

## **Irodalom**

1. Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L, Housini I, and Star RA.  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 1165-1172.
2. Deng J, Hu X, Yuen PS, and Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 749-756.
3. Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Leone S, Bazzani C, Minutoli L, Bitto A, Cainazzo MM, Marini H, Zaffe D, Botticelli AR, Pizzala R, Savio M, Necchi D, Schioth HB, Bertolini A, Squadrito F, Guarini S. Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology* 2006; 147: 1126-1135.
4. Bazzani C, Guarini S, Botticelli AR, Zaffe D, Tomasi A, Bini A, Cainazzo MM, Ferrazza G, Mioni C, Bertolini A. Protective effect of melanocortin peptides in rat myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1082-1087.
5. Getting SJ. Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 447-449.
6. Vecsernyes M, Juhasz B, Der P, Kocsan R, Feher P, Bacskay I, Kovacs P, Tosaki A. The administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur J Pharmacol* 2003; 470: 177-183.
7. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
8. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours following brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 1264-1272.
9. Das DK. Thioredoxin regulation of ischemic preconditioning. *Antioxidants Redox Signaling* 2004; 6: 405-12.

10. Cui J, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of ceramide in ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 770-7.
11. Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol* 2000; 278: C144-C153.
12. Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, Melkonyan HS, Piot C, Wolfe CL, Tomei LD, Hannun YA, Umansky SR. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1997; 151: 1257-63.
13. Ginis I, Schweizer U, Brenner M, Liu J, Azzam N, Spatz M, Hallenbeck JM. TNF-alpha pretreatment prevents subsequent activation of cultured brain cells with TNF-alpha and hypoxia via ceramide. *Am J Physiol* 1999; 276: C1171-C1183.
14. Goodman Y, Mattson MP. Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults and amyloid b-peptide toxicity. *J Neurochem* 1996; 66: 869-72.
15. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 643-65.
16. Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PS, Lisanti MP. Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 103-10.
17. Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 542-8
18. Park H, Go Y-M, Darji R, Choi J-W, Lisanti MP, Maland MC, Jo H. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol* 2000; 278: H1285-H1293.
19. Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81: 42-52.
20. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: a role of nitric oxide. *Am J Physiol* 2002; 282: H1990-H1995.
21. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1897-918.

22. Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol; an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol* 2002; 282: H1996-H2003.
23. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods in Enzymology* 1994; 233: 601-610.
24. Normen L, Shaw CA, Fink CS, Awad AB. Combination of phytosterols and omega-3 fatty acids: A potential strategy to promote cardiovascular health. *Current Med Cardiovasc Hematological Agents* 2004; 2: 1-12.
25. McGuffin M, Hobbs C, Upton R (eds). American products association's botanical safety handbook. Boca Raton: FL CRC Press 1997; pp51
26. Lee SE, Ju EM, Kim JH. Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed. *Exp Mol Med* 2002; 34: 100-106.
27. Zhao H, Zhao S, Sun C, Guillaume D. Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and mass spectroscopy. *J Lipid res* 1989; 30: 1633-1637.
28. Chen W, Glasgow W, Murphy E, Steenbergen C. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H2094–H2101.
29. Gysembergh A, Lemaire S, Piot C, Sportouch C, Richard S, Kloner RA, Przyklenk K. Pharmacological manipulation of Ins(1,4,5)P3 signaling mimics preconditioning in rabbit heart. *Am J Physiol* 1999; 277: H2458–H2469.
30. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, and Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl): II369–II375.
31. Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Kisin E, Kagan VE, Maulik N, Das DK. Hypoxic preconditioning preserves antioxidant reserve in the working rat heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 133-140.
32. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of nitric oxide. *Am J Physiol* 2002; 282: H1988-H1995.
33. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 160-169.

34. Song KS, Li S, Okamoto T, Qutriilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with Caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 1996; 271: 9690-7.
35. Cordis GA, Yoshida T, Das DK. HPTLC analysis of sphingomyelin, ceramide and sphingosine in ischemic/reperfused rat heart. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 16: 1189-93.
36. Mathur P, Kaga S, Zhan L, Das DK, Maulik N. Antibody array technique reveals overexpression of important DNA-repair proteins during cardiac ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 99-102.
37. Mathur P, Kaga S, Zhan L, Das DK, Maulik N. Potential candidates for ischemic preconditioning-associated vascular growth pathway revealed by antibody array. *Am J Physiol* 2005; 288: H3006-H3010.
38. Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung E H, Egashira N, Mishima K, 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* 2004; 75: 1967-1968.
39. Baxter, G.F., Marber, M.S., Patel, V.C., Yellon, D.M. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 1994; 90: 2993–3000.
40. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 222–224.
41. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditionig: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* 1997; 92: 159-167.
42. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA. Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation* 1994; 90. 1023–1028.
43. Hattori R, Otani H, Uchiyama T, Imamura H, Cui J, Maulik N, Cordis GA, Zhu L, Das DK. Src tyrosine kinase is the trigger but not the mediator of ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2001; 281: H1066–H1074.

44. Cohen MV, Liu Y, Liu GS, Wang P, Weinbrenner C, Cordis GA, Das DK, Downey JM. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* 1996; 94: 1713–1718.
45. Dickson EW, Blehar DJ, Carraway RE, Heard SO, Steinberg G, Przyklenk K. Naloxon blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1751–1756.
46. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1355–1362.
47. Kositprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1355–1362.
48. Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 226–231.
49. Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Protective effects of preconditioning of the ischemic myocardium involve cyclo-oxygenase products. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 1020–1023.
50. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Han H, Langenbach R, Dawn B, Bolli R. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 525–537.
51. Fryer RM, Auchampach JA, Gross GJ. Therapeutic receptor targets of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 520–525.
52. Auchampach, J.A., Grover, G.J., Gross, G.J. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 1054–1062.
53. Gross GJ. The role of mitochondrial K(ATP) channels in the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning in dogs. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 939–940.
54. Schwartz LM, Welch TS, Crago MS. Cardioprotection by multiple preconditioning cycles does not require mitochondrial K(ATP) channels in pigs. *Am J Physiol* 2002; 283: H1538–H1544.

55. Wang Y, Kudo M, Xu M, Ayub A, Ashraf M. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 2037–2046.
56. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CD, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T, Braunwald E, Jaffe AS. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 49-57.
57. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:711-718.
58. Hexeberg S, Willumsen N, Rotevatn S, Hexeberg E, Berg RK. Cholesterol induced lipid accumulation in myocardial cells of rats. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 442–446.
59. Venter H, Genade S, Mouton R, Huisamen B, Harper IS, Lochner A. Myocardial membrane cholesterol: effects of ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1271–1286.
60. Novalija E, Hogg N, Kevin LG, Camara AK, Stowe DF. Ischemic preconditioning: triggering role of nitric oxide-derived oxidants in isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 593-600.
61. Pagliaro P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci* 2003; 73: 2137-49.
62. Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003; 278: 27256-66.
63. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N, Cordis GA, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Das DK. L-Arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 1275-81.
64. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 1998; 335: 465-80.

65. Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 2003; 10: 73-80.
66. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl-2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 1999; 274: 20296-300.
67. Jarvis WDJ, Fornari FA, Browning JL, Gerwitz DA, Kolesnick RN, Grant SG. Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 31685-92.
68. Miura T, Kawamura S, Tatsuno H, Ikeda Y, Mikami S, Iwamoto H, Okamura T, Iwatate M, Kimura M, Dairaku Y, Maekawa T, Matsuzaki M. Ischemic preconditioning attenuates apoptosis through protein kinase C in rat hearts. *Am J Physiol* 1999; 277: H1997-H2001.
69. Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kürthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 2003; 9: 322-30.
70. Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin-1 mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1507-14.
71. Turoczi T, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: An insight with transgenic mice overexpressing Trx 1. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 695-704.
72. Kawashima S, Sakamaki K, Yonehara S. Purification, molecular cloning, and characterization of TRP32, a novel thioredoxin-related mammalian protein of 32 kDa. *J Biol Chem* 1998; 273: 19160-19166.
73. Myrset AH, Bostad A, Jamin N, Lirsac PN, Toma F, Gabrielsen OS. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J* 1993; 12: 4625-4633.
74. Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF $\kappa$ B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3821-3839.

75. Van Bergen P, Janssen PM, Hoogerhout P, De Wildt DJ, Versteeg DH. Cardiovascular effects of gamma-MSH/ACTH-like peptides: structure-activity relationship. *Eur J Pharmacol* 1995; 294: 795-803.
76. Versteeg DH, Van Bergen P, Adan RA, De Wildt DJ. Melanocortins and cardiovascular regulation. *Eur J Pharmacol* 1998; 360: 1-14.
77. Getting SJ, Christian HC, Lam CW, Gavins FN, Flower RJ, Schioth HB, Perretti M. Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. *J Immunol* 2003; 170: 3323-3330.
78. Getting SJ, Di Filippo C, Christian HC, Lam CW, Rossi F, D'Amico M, Perretti M. MC-3 receptor and the inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarct. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 845-853.
79. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. The role of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 87-93.
80. Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. Alpha-melanocyte stimulating hormone in modulation of inflammatory reactions. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003; 1: 101-108.
81. Airaghi L, Lettino M, Manfredi MG, Lipton JM, Catania A. Endogenous cytokine antagonists during myocardial ischemia and thrombolytic therapy. *Am Heart J* 1995; 2: 204-211.
82. Airaghi L, Garofalo L, Cutuli MG, Delgado R, Carlin A, Demitri MT, Badalamenti S, Graziani G, Lipton JM, Catania A. Plasma concentrations of alpha-melanocyte-stimulating hormone are elevated in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1212-1216.
83. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
84. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
85. Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 17: 9977-82.

86. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1190-1196.
87. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 14: 8144-9.
88. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.
89. Tosaki A, Das DK. The role of heme oxygenase signaling in various disorders. *Mol Cell Biochem* 2002; 232: 149-157.
90. Zou L, Sato N, Attuwaybi BO, Kone BC. Delayed administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone or combined therapy with BAY 11-7085 protects against gut ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2003; 20: 469-475.
91. Vulapalli SR, Chen Z, Chua BH, Wang T, Liang CS. Cardiospecific overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: 688-694.
92. Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D, Carey D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 1991; 69: 683-688.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tósaki Árpád témavezetőmnek és Prof. Dr. Dipak K. Dasnak (University of Connecticut) támogatásukért, hasznos tanácsaikért, valamint, hogy Ph.D. tanulmányaim alatt végig biztosították számomra a megfelelő tudományos és anyagi háttérrel.

Köszönöm mindenkinek a segítségét, aki hozzájárult értekezésem létrejöttéhez. Külön köszönöm Dr. Juhász Béla egyetemi tanársegédnek a disszertáció létrejöttéhez nyújtott nélkülözhetetlen gyakorlati és elméleti segítségét.

Köszönöm szüleim segítségét és támogatását, végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom páromnak, Ágnesnek, aki mindvégig mellettem állt, biztatott, és aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

## Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

### *Közlemények:*

1. **Der P**, Cui J, Das DK. (2006) Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in ischemic and preconditioned hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40(2), 313-20  
**IF: 4.859**
2. Juhasz B, **Der P**, Szodoray P, Gesztelyi R, Lekli I, Bak I, Antal M, Maulik N, Tosaki A, Vecsernyes M. (2007) Adrenocorticotropic hormone fragment (4-10) attenuates the iszkémia/reperfúzió induced injury in isolated rat hearts. *Antioxid. Redox Signal.* 9(11) 1851-1861 **IF: 4.491**
3. Das S, **Der P**, Raychaudhuri U, Maulik N, Das DK (2006) The effect of Euryale ferox (makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* 289(1-2), 55-63 **IF: 1.862**
4. Juhasz B, **Der P**, Turoczy T, Bacskay I, Varga E, Tosaki A. (2004) Preconditioning in Intact and Previously Diseased Myocardium: Laboratory or Clinical Dilemma? *Antioxid. Redox Signal.* 6, 325-333. **IF: 3.763**

## Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

1. Karsai D, Zsuga J, Juhasz B, **Der P**, Szentmiklosi AJ, Tosaki A, Gesztelyi R. (2006) Effect of nucleoside transport blockade on the interstitial adenosine level characterized by a novel method in guinea pig atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47(1) 103-9 **IF: 1.576**
2. Gesztelyi R, Zsuga J, Juhasz B, **Der P**, Vecsernyes M, Jozsef Szentmiklosi A. (2004) Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull. Math. Biol.* 5, 1439-53 **IF: 1.485**
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, Tosaki A. (2003) Heme oxygenase-1-related

carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 17: 2133-2135 **IF: 7.172**

4. Vecsernyes M, Juhasz B, **Der P**, Kocsan R, Feher P, Bacskay I, Kovacs P, Tosaki A. (2003) The administration of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 177-83. **IF: 2.352**