

## Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Dr. Lekli István

Témavezető: Dr. Tótsaki Árpád



Debreceni Egyetem

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

**Témavezető:**

Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

**A szigorlati bizottság elnöke:**

Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

**A szigorlati bizottság tagjai:**

Dr. Szentmiklósi József, PhD. kandidátus

Prof. Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora

**A védési bizottság elnöke:**

Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

**Opponensek:**

Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

Prof. Dr. Ferdinandy Péter, az MTA doktora

**A védési bizottság tagjai:**

Dr. Szentmiklósi József, PhD. kandidátus

Prof. Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora

**A védés helye ideje:**

2010.06.08-án 13 órakor a DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika

## **Bevezetés:**

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

Az iszkémia kiváltó oka általában valamilyen szervi eredetű érelzáródás, illetve érszűkület vagy koronáriaspazmus lehet, mely révén az adott szövetrész perfúziója lecsökken, illetve teljes elzáródás esetén meg is szűnik, ezáltal zavar áll be az adott szívizomrész oxigén és tápanyagellátásában. Az iszkémia okozta zavar a szubsztrát illetve oxigén ellátásban káros anyagcseretermékek felszaporodását eredményezi, melynek következtében kezdetben funkciózavar jön létre, majd a sejtek elhalása következik be, nekrozis vagy apoptózis útján. A folyamat háttérében az egyik kiváltó ok a csökkent oxigén kínálat miatt a glükóz aerob metabolizmusának

leállása. Iszkémia során az aerob glikolízist felváltja az anaerob glikolízis, mely nem képes a sejtek ATP igényét fedezni. A másik fontos következménye az anaerob glükolízisnek, hogy felszaporodik a sejtekben a tejsav, amely csökkenti az intracelluláris pH-t. A pH csökkenésével a miofilamentumok kalcium érzékenysége lecsökken. Továbbá a csökkenő pH fokozza a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter aktivitását ezzel emelve az intracelluláris  $\text{Na}^+$  szintet, ez csökkenti a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  cserét, ami fokozza a kalcium felhalmozódást a sejtekben.

Az iszkémia során a sejtek illetve az érintett miokardium túlélésében elengedhetetlen feltétel a reperfúzió, melynek kezdetén a megindult véráram következtében az érintett miokardium telítődik „friss” vérrel és helyreáll az oxigén, illetve a tápanyag kínálat. A reperfúzió kezdetén a nagymértékben redukálódott mitokondriális elektrontranszport lánc komponensei és a helyreállt oxigén kínálat miatt hirtelen nagy mennyiségű ROS (reactive oxygen species) termelődik, amelyet a meggyengült védekező antioxidáns rendszerek nem képesek semlegesíteni. A keletkező ROS károsítja a lipideket (lipid peroxidáció), amely károsítja a citoplazma, illetve a különböző sejtorganellek membránját. A fehérje láncok károsodása különböző kulcsfontosságú enzimek, illetve proteinstruktúrák funkcióvesztéséhez vezethet. Továbbá az oxidatív stressz károsíthatja mind a genomiális mind a mitokondriális DNS-t, ami különböző mutációkhoz, illetve a DNS töréséhez is vezethet. Mindezen károsodások a sejtek sérüléséhez, illetve elhalásához vezethetnek.

Reperfúzió során a pH, illetve az ATP szint visszaáll a fiziológiás közelébe ám az intracelluláris kalcium szint magas, ezt tovább fokozza a nátrium túltelítődés következtében a reperfúzió első periódusában „fordított”

módban működő  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  antiporter. A sejtek anyagcseréjének rendeződése folyamán a  $\text{Ca}^{++}$  túltelítődés átmegey a  $\text{Ca}^{++}$  ionok oszcillációjában a sejt plazma és sarcoplazmatiucus reticulum között. A folyamat következtében magas  $\text{Ca}^{++}$  csúcsok alakulnak ki egymást követően a sejtekben. A reperfüzió kezdetén a  $\text{Ca}^{++}$  túltelítődés egy fokozott kontraktilis állapotot idéz elő, továbbá növeli az aritmiák kialakulásának valószínűségét, illetve kalciumfüggő proteolitikus folyamatok indulnak el.

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

Az oxidatív stressz megváltoztatja a kardiomiociták metabolizmusát, különböző szignáltranszdukciós utakat, illetve bizonyos gének expresszióját. Ez a megváltozott redox környezet tehát nagy szerepet játszik az I/R-indukálta károsodások kialakulásában. Ismeretes az a tény hogy a szabadgyökfogyó tulajdonságú molekulák rendelkeznek kardioprotektív hatással. A sejtek fel vannak szerelve különböző védekező antioxidáns rendszerekkel, amelyek normál esetben képesek a keletkező ROS semlegesítésére. Ezek mellett jó néhány növényi származék is rendelkezik szabadgyökfogyó tulajdonsággal, illetve kardioprotektív hatással. A Közép- és

Dél-Amerikában őshonos farkascseresznye (*Withania somnifera*) megvédi a szívmot mind az I/R mind az izoprenalin-indukálta károsodásokkal szemben. Hasonlóan a farkascseresznyéhez a Dél-Ázsiában honos bengáli-birs is védelmet nyújtott az izoprenalin-indukálta károsodások ellen. Ezek mellett számos más növényi kivonatról, illetve növényi származékról mutatták már ki, hogy rendelkeznek kardioprotetív hatással. A növények kardioprotektív hatásaiban nagy szerepet játszanak a flavonoidok, antocianidok, polifenolok, szabad telítetlen zsírsavak, magas rosttartalom és egyéb más biológiailag aktív komponensek.

A meggy mag hazánkban elsősorban, mint a meggy felhasználásának mellékterméke jelenik meg. Azonban a meggy mag szilárd fázisának analízise során kiderült, hogy a meggy mag szilárd frakciója is tartalmaz több biológiailag aktív komponenset, mint pl.: különböző polifenolokat, flavonoidokat, növényi zsírsavakat, pro- és antocianidokat, transz-rezveratrolt, illetve kisebb mennyiségben más biológiailag aktív komponenseket. Szabó és munkatársai (2004, Invest Ophthalmol Vis Sci) kimutatták, hogy a meggy magkivonattal kezelt állatok retinája ellenállóbb az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben, a protektív hatás háttérében a hemoxigenáz-1 (HO-1) rendszert azonosították be. Ezek mellett a meggy magkivonattal történő kezelés megakadályozta I/R után a  $Ca^{++}$  és  $Na^{+}$  ionok intracelluláris felhalmozódását valamint az intracelluláris  $K^{+}$  ion vesztést. Mivel a hemoxygenáz rendszer kardioprotektív szerepe ismert a kardiovaszkuláris rendszerben, valamint az intracelluláris ionok megfelelő szinten tartása nagy jelentőségű az I/R indukálta károsodások kivédésében, ezért döntöttünk amellett, hogy megvizsgáljuk vajon a meggy magkivonatnak

van-e hasonlóan kedvező hatása az iszkémia/reperfúzió-indukálta szívizom károsodásokkal szemben.

A megfelelő táplálkozás fontosságának hangsúlyozásában és a különböző növényi eredetű anyagok vizsgálatában fontos tényező volt az úgynevezett „Francia paradox” jelenségének felismerése, és a hátterének vizsgálata. A „Francia paradox” szerint a francia emberek sem fogyasztanak kevésbé zsíros ételeket, illetve a francia konyhában is megtalálhatóak olyan alapanyagok, amelyeket nem tartanak egészségesnek, azonban átlagosan 4 évvel élnek tovább, mint az amerikaiak. Továbbá a miokardiális infarktus kialakulásának a gyakorisága, illetve a koronária megbetegedések száma is kb. 40 %-kal alacsonyabb, mint az amerikaiaké vagy más hasonlóan fejlett országban élőké. A „Francia paradox”-ért legalább részben a polyfenolokban gazdag vörösbortfogyasztást teszik felelőssé. Egy-két pohár vörösbort elfogyasztása csökkenti a kardiovaszkuláris, cerebrovaszkuláris és perifériás vaszkuláris megbetegedések kialakulásának a kockázatát. Ezek mellett csökkenti különböző daganatos megbetegedések kialakulásának valószínűségét, illetve lassítja a különböző neurodegeneratív megbetegedések progresszióját. A vörösbortban megtalálható kb. 500 különböző antioxidáns hatóanyag közül napjainkban a rezveratrolt és a proantocianidineket tartják elsősorban felelősnek a kedvező hatásokért.

A rezveratrol (3,5,4'-trihydroxystillbene) egy polifenol, melynek egyre több kedvező biológiai és egészségmegőrző hatást tulajdonítanak, a kemoprevenziótól a kardioprotekcióig. Először 1940-ben Takaoka izolálta a hunyor gyökeréből (*Veratrum grandiflorum*). Számtalan tanulmány választotta célkitűzésének a rezveratrol hatásmechanizmusának vizsgálatát. A rezveratrol képes kötődni az ösztrogén receptorokhoz és azokon keresztül

módosítja különböző a DNS szintézishez és a sejt ciklushoz kapcsolódó fehérjéket, mint pl. p53 és Rb/E2F, valamint különböző ciklineket és ciklinfüggő kinázokat. Továbbá hatással van a stressz válasz illetve a sejt proliferációban szerepet játszó transzkripciós faktorokra, mint pl. NF- $\kappa$ B, AP1 és Egr1. Ezen hatások részben különböző MAP kinázokon (mitogen-activated protein kinasés), illetve tirozin kinázokon keresztül mediálódnak és vezetnek a túlélési, illetve apoptotikus faktorok módosulásához (pl. Bcl-2 fehérje család), valamint bizonyos enzimek, úgymint a ciklooxigenáz (COX), nitrogénoxid szintáz (NOS), továbbá I-II fázisú detoxifikáló enzimek módosításához. Ezek mellett a rezveratrol befolyásolja bizonyos transzkripciós kofaktorok expresszióját, illetve aktivitását is, ilyenek pl. a p300 és a sirtuin-1.

A különböző közleményekből, amelyek a rezveratrol hatását vizsgálták az iszkémia/reperfúzió okozta szívizomkárosodások ellen kiderült, hogy több egymás melletti mechanizmus játszik alapvető szerepet a kardioprotektív hatások kialakulásában. Kimutatták, hogy a rezveratrol növeli az i-NOS, e-NOS és az n-NOS szintet, és ellazítják az izolált aorta gyűrűk simaizmát, valamint csökkentik a szívizom károsodását. Valószínűleg ez a tulajdonsága is szerepet játszik az in vivo antioxidáns sajátosságaiban, illetve az hogy képes a kataláz szintjének a megemelésére. Továbbá kimutatták, hogy gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik. Jelentősen csökkentette I/R után a pro-adhéziós molekulák szintjét. Továbbá prekondicionálja a szíveket az A<sub>1</sub> és az A<sub>3</sub> receptorok aktiválásán keresztül. Az A<sub>1</sub> receptorhoz kapcsolódó hatás a PI3K-Akt-Bcl-2 túlélési útvonal aktiválása, míg az A<sub>3</sub> receptorokhoz köthető a CREB függő Bcl-2 útvonal aktiválása. Ezek mellett a rezveratrol módosítja különböző MAP kinázok

aktivitását, valamint növeli a HO-1, a Trx-1 (thioredoxin-1) és a VEGF (vascular endothelial growth factor) szintjét elősegítve a neovaszkularozációt az infarktusos területen.

A diabetes egy nagyon fontos rizikófaktor mely sok szövődménnyel járhat és súlyosbíthatja az iszkémiás megbetegedéseket. A diabétesz ezen tulajdonságaiért több tényező is felelős, ezek közül kiemelendő a megnövekedett oxidatív stresszt, a növekedett trombózis hajlamot, valamint az endoteliális diszfunkciót. Kísérletes körülmények között tartósan magas szénhidrát tartalmú táplálék inzulin rezisztenciát okoz normál, illetve Zucker Obese állatokban, és endoteliális diszfunkció alakul ki. Mivel a rezveratrol képes az endoteliális diszfunkció, valamint az I/R-indukálta károsodások ellen védelmet nyújtani a normál állatok szívében, ezért feltételeztük, hogy képes lehet az elhízott állatok szívét is védeni az I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Ezért rezverattal kezelt elhízott állatok szívét vetettük alá 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúciónak külön cukorterheléssel vagy anélkül, és vizsgáltuk, hogy a rezveratrol hogyan hat a testsúlyra és a vércukorszintre, valamint a posztiszkémiás szívfunkciókra.

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

életű fehérjéit, makromolekuláit vagy akár egész sejt organelleumait, így például mitokondriumokat, riboszómákat, vagy peroxiszómákat.

Az autofágiának három formáját különböztetjük meg, a makroautofágiát, a mikroautofágiát, és a chaperon mediált autofágiát. A makroautofágia a legaktívabb formája az autofágiának, ahol kezdetben egy izolációs membrán formálódik, amely növekszik és kialakul a kettős membrán struktúra amelyet autofagoszómának hívnak. Az autofagoszóma körbevesz citoplazma részeket, bizonyos kóros fehérjéket vagy akár egész sejtorganelleumokat is, ezt követően egyesül egy lizoszómával és kialakul az autofagolizoszóma. Normál körülmények között az autofágia fontos szerepet játszik a sejtek homeosztázisában, és katabolikus energiaforrásként szolgál éhezés alatt. A jelenséget szívizomsejtekben először 1976-ban írták le. A tanulmány szerint a szívizomsejtektől átmenetileg megvonták az oxigén és glükóz ellátást, majd ezt visszaállították és az indukálta az autofágiát. Ezt követően izolált Langendorff nyúl szíven megfigyelték, hogy az autofágia fokozódása kapcsolatban áll a szív funkcionális felépülésével I/R követően. Yan és munkatársai (2005, Proc Natl Acad Sci U S A) megállapították, hogy a krónikusan iszkémiás miokardiumban az autofagoszómák száma emelkedett az élő szívizomrészeken és alig detektálható az elhalt miokardiumban, valamint az autofágia mértékének emelkedésével csökkent az apoptotikus sejtek száma. Opipari és munkatársai (2004, Cancer Res) leírták, hogy a rezveratrol képes indukálni az autofágiát bizonyos daganatos sejtvonalakon. Ezek alapján döntöttünk amellett, hogy megvizsgáljuk, hogy a rezveratrol indukálta kardioprotektív hatásokban szerepet játszik-e az autofágia jelensége. A tanulmányban vizsgálni kívántunk egy másik növényi származékot a  $\gamma$ -tokotrienolt. A közelmúltban megjelent tanulmányunkban

beszámoltunk arról, hogy a  $\gamma$ -tokotrienol képes védelmet nyújtani a szíveknek I/R indukálta károsodásokkal szemben. Előző tanulmányainkban a különböző tokotrienol izomereket hasonlítottuk össze, eredményeink szerint a  $\gamma$ -tokotrienol rendelkezik a legjelentősebb kardioprotektív hatással. Korábbi tanulmányunkban kiderítettük azt is, hogy a  $\gamma$ -tokotrienol aktiválja az Akt túlélési útvonalat. Egy másik tanulmány szerint a  $\gamma$ -tokotrienol képes autofágiát indukálni patkány pankreász stellate sejtekben. Mivel mind a két hatóanyag képes autofágiát indukálni és az Akt túlélési útvonalta aktiválni ezért tanulmányunkban vizsgálni kívántunk, hogy a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol együtt adva rendelkezik-e valamilyen szinergista hatással.

### **Célkitűzések:**

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

- I. Vizsgáltuk a meggy mag szilárd fázisának hatásait a poszt iszkémiás szívfunkciók felépülésére, az iszkémia-reperfúzió indukálta kamrai aritmiák és kamrai fibrilláció kialakulásának csökkentésére, valamint a miokardiális infarktus és apoptózis mérséklésére. Vizsgáltuk, hogy a meggy mag kivonatával történő kezelés képes-e csökkenteni a kaszpáz-3 aktivitást a szívszövetben.
- II. Célkitűzéseink között szerepelt annak vizsgálata, hogy kiderítsük a rezveratrol képes-e javítani a posztisztkémiás szívfunkciókat

illetve csökkenti-e az infarktusz terület nagyságát és az apoptózis mértékét genetikailag módosított „zucker obese” patkányokban. Valamint, hogy a hatásban milyen fehérjék játszhatnak szerepet.

- III. Vizsgáltuk a rezveratrol és  $\gamma$ -tokotrienol hatását külön és együtt adagolva I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Tanulmányoztuk az autofágia szerepét a szívvédő hatásokban. Továbbá, tanulmányoztuk a különböző túlélési fehérjék expresszióját.

### **Anyagok és módszerek:**

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

#### **1. Kezelési protokollok:**

##### **A. A meggy mag kivonat készítése és kezelési protokoll:**

A meggy magok szárítását követően a csonthéjat eltávolítottuk, és a meggy mag belső részét megőröltük, majd N-hexánnal extraháltuk Soxhlet készülékben. Az oldószert vákuumban eltávolítottuk, és egy sárga színű olajos fázist kaptunk (fázis 1), mely tömege 32-36 %-a volt az eredeti tömegnek. A visszamaradó szilárd fázist (fázis 2) szárítottuk, és a későbbiekben ezt az olajmentes szilárd fázist használtuk fel a vizsgálatokhoz. A fázisok szétválasztását követően UV-, infravörös-spektroszkópiái, gáz-,

folyadék- valamint tömeg-spektrometriás vizsgálatokat végeztünk. A tanulmányhoz Sprague-Dawley (280-360 g) hím patkányokat öt csoportba osztottunk. Az I-IV. csoportba tartozó állatokat 14 napon kezeltük különböző dózisu meggy magkivonattal (1, 5, 10 és 30 mg/ttkg/nap) az ötödik csoport állatai oldószer (0.9 %-os NaCl oldatot) kaptak naponta egyszer szájon át.

### **B. Kezelési protokoll rezverattal:**

23-24 hetes „zucker obese” patkányokat, illetve hasonló korú normál patkányokat használtuk a kísérletekhez. Az obese állatokat négy csoportba osztottuk. Az első csoport állatait 14 napon keresztül kezeltük a vivőanyaggal (10 % etanol oldat); a második csoport állatait pedig ugyancsak 14 napon keresztül kezeltük 5 mg/ttkg/nap dózisu rezverattal. A harmadik csoport állatai 21 napon keresztül 10 %-os cukoroldatot kaptak és a 8-ik naptól kezdve vivőanyag kezelésben részesültek, míg a negyedik csoport állatai 21 napon keresztül 10 %-os cukoroldat kezelést kaptak és a 8-ik naptól 5 mg/ttkg rezverattal kezelésben is részesültek. Az ötödik csoportban hasonló korú normál állatokat kezeltünk vivőanyaggal 21 napig.

### **C. Rezverattal és $\gamma$ -tokotrienol előkezelés:**

A kísérletek kezdetén a 250-300 g-os hím Sprague-Dawley patkányokat négy csoportba osztottuk. Az első csoport állatait 15 napon át kezeltük orálisan vivőanyaggal majd újabb 15 napon át 2.5 mg/ttkg rezverattal. A második csoport állatai 30 napon át kaptak 0.3 mg/ttkg dózisban  $\gamma$ -tokotrienolt. A harmadik csoport állatait 30 napon keresztül kezeltük  $\gamma$ -tokotrienollal majd a 16. naptól rezverattal kezelést is kaptak. A negyedik csoport állatait vivőanyaggal kezeltük 30 napon át.

## **2. Izolált dolgozó patkány szív preparátum:**

A kezeléseket követően az állatokat elaltattuk egy intraperitonealis nátrium pentobarbitál (60-80 mg/ttkg) injekcióval. Véralvadásgátlóként intravénás heparint alkalmaztunk 500 IU/ttkg dózisban. A heparin injekció után, thorakotómiát végeztünk és a szíveket jéghideg módosított Krebs-Henseleit pufferbe helyeztük. Ezt követően az aortán keresztül kanuláltuk a szíveket és 10 percig perfundáltuk 100 vízcentiméteres nyomás mellett módosított KHB pufferrel nem dolgozó „Langendorff-módban”, hogy eltávolítsuk a vért. A 10 perc „mosási” periódus alatt a pulmonáris vénát kanuláltuk és a szíveket átkapcsoltuk „dolgozó” módba. A dolgozó módba történő kapcsoláskor elzártuk az aortás beáramlás és a pulmonáris véna felől perfundáltuk a szíveket 17 vízcentiméteres nyomással (előterhelés). A módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer összetétele 118 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, és 5 mM glükóz volt.

## **3. Az iszkémia kiváltása:**

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

#### **4. Bal kamrai funkciók mérése:**

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

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

Miután a szíveket alávetettük a 30 perc teljes iszkémiának és a 120 perc reperfúzióknak 25 ml 1 %-os trifenil-tetrazólium klorid oldatot injektáltunk a szívekbe az aortán keresztül, majd -70 °C-on tároltuk. A lefagyott mintákat ezt követően az apiko-bazális tengelyre merőlegesen 2-3 mm szeletekre vágtuk majd lemértük, szárítottuk, tárgylemezek közé helyeztük és scanneltük (HP Scanjet 5p). Ezt követően meghatároztuk az

infarktusz terület nagyságát és kiszámítottuk az infarktusz terület tömegét. Az infarktus mértéke az infarktusz rész/teljes bal kamra tömeg x 100 képletből %-ban kaptuk meg.

### **5 b. Infarktusz terület meghatározása (a rezveratrol és $\gamma$ -tokotrienol hatásainak vizsgálata során):**

A 30 perc teljes iszkémiát és a 120 perc reperfüziót követően 40 ml 1 %-os trifenil-tetrazólium klorid oldatot injektáltunk a szívekbe az aortán keresztül, majd -70 °C-on tároltuk az analízis elvégzéséig. A fagyott mintákat az apiko-bazális tengelyre merőlegesen 0,8 mm szeletekre vágtuk és 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd tárgylemezek közé helyeztük és scanneltük (Microtek ScanMaker 600z). Ezt követően meghatároztuk az infarktusz terület nagyságát és a teljes rizikó területet. Az infarktusz terület és a teljes terület nagyságának hányadosa adta az infarktusz területet.

### **6 a. Apoptózis meghatározása meggy mag és a rezveratrol hatásainak vizsgálata során:**

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

normál nyúl szérummal blokkoltuk. Ezt követően  $\alpha$ -szarkomer aktin ellenes, egérben termeltetett monoklonális antitesttel inkubáltuk a mintákat, majd TRITC (tetramethyl rhodamin isocyanate) konjugálta egér IgG ellenes, nyúlban termeltetett antitestekkel történő inkubálást végeztünk (1:200). A metszeteket lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Kvantifikálás céljából meghatároztuk a TUNEL pozitív sejteket és ezt viszonyítottuk a teljes kardiomiocita populációhoz.

#### **6 b. Apoptózis mértékének meghatározása (a rezveratrol és $\gamma$ -tokotrienol hatásainak vizsgálata során):**

Az I/R végén a mintákat formalinnal fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk be. A mintákból szeleteket vágunk és azokat tárgylemezre helyeztük, majd a deparaffináltuk és rehidráltuk. Ezt követően az apoptózis mértéket TUNEL assay KIT (Promega, Madison, WI, USA) segítségével határoztuk meg. Ezen protokoll szerint fluoreszcein-12-dUTP építettünk be dezoxinukleotidil-transzferáz segítségével. Ezt követően propidium jodiddal festettük meg a sejtmagokat. A metszeteket fluoreszcens mikroszkóp (AXIOPLAN2 IMAGING) (Carl Zeiss Microimaging Inc., New York, NY, USA) segítségével vizsgáltuk 520  $\pm$  20 nm, és 620 nm-en. Az apoptotikus sejtek számát a totál kardiomiocita populációra vonatkoztattuk.

#### **7. A kaszpáz-3 expresszió immunohisztokémás meghatározása:**

A szívből úszó szeleteket vágatunk és inkubáltuk kecskében termeltetett kaszpáz-3 ellenes antitesttel (1:1000) 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket biotinilált nyúlban termeltetett kecske ellenes antitestet tartalmazó oldatba helyeztük (1:200) ötven percre szobahőmérsékleten. A

szeleteket ez után négy órára szobahőmérsékleten avidin-biotinilált-peroxidáz (Vector Laboratories, Burlingame, CA; USA) komplexbe helyeztük 1:100 hígításban. A kísérleteket diaminobenzidin kromogén reakció zárta. A mintákat előtte 10 %-os normál kecske szérummal blokkoltuk. Az inkubálások ideje alatt a mintákat enyhén ráztuk, valamennyi antitestet 0.1 %-os Triton X-100-at tartalmazó 10 mM foszfát pufferrel hígítottunk. Az inkubálásokat követően a metszeteket zselatinnal borított tárgylemezre helyeztük és Permount semleges médiummal fedtük le.

## **8. Western-blot:**

Az I/R végén a szíveket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -70 °C-on tároltuk. Ezt követően a mintákból fehérjét izoláltunk, majd 50 µg fehérjét SDS géltre vittünk fel és szeparáltuk, végül nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat blokkoltuk, majd elsődleges antitestekkel ezt követően pedig tormaperoxidázzal kapcsolt másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Végül Kodak X-Omat filmeket exponáltunk a membránokkal a fehérjék detektálása céljából. A filmeket denzitometriás scennelésnek vetettük alá, és a mennyiségi kontrollal szemben normalizáltuk.

## **9. Vércukor és inzulin szint mérés:**

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

## **10. Endotelin szint mérése:**

100 ml koronáriás folyadékot gyűjtöttünk egy polisztirén konténerbe, majd EDTA-t és Triton X-100-at adtunk a mintákhoz (5 mM és 0.5 V/V végső koncentrációban). Ezt követően a mintákat -70 °C-on tároltuk a felhasználásukig. A vizsgált anyagokat ezt követően 3 ml metanollal és 5 ml vízzel kondicionált Sep-Pak C<sub>18</sub> „cartridge” vittük fel és 0,1 V/V%-os trifluoecetsavval 60 V/V %-osra hígított acetonitrillel elutáltuk. Az eluátumokat fagyaszttva szárítottuk és -20 °C-on tároltuk a további radioimmunassay meghatározásig. A mintákat meghatározás előtt 0,5 ml assay pufferben oldottuk fel, majd 200 x-ra töményítettük. Az ET radioimmunoassay meghatározásához egy normál ET radioimmunoassay KIT-et használtunk a gyártó által előírtak szerint.

## **11. Konfokális mikroszkópia:**

A formaldehid oldatban fixált szíveket paraffinba ágyaztuk és metszeteket készítettünk. A metszetek deparaffinizálását követően 10 mM nátrium citrát és 0,05%-os Tween 20 tartalmú pufferrel antigén feltárást végeztünk 90-95 °C-on 30 percig. A metszeteket ezt követően PBS pufferrel mostuk és Powerblock oldattal blokkoltuk 10 percig. A blokkolást követően ismét mostuk a metszeteket, majd 2 órán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitestet (1:50) tartalmazó oldattal, amely 1%-os BSA-t tartalmazó PBS puffer volt. Az inkubációs idő elteltével a metszeteket mostuk, majd 45 percen keresztül sötétben inkubáltuk a fluoreszcenciával kapcsolt másodlagos antitestet tartalmazó oldattal (1:1000). Ezt követően a sejtmagok festése érdekében 45 percig sötétben To-Pro 3 jodid (1:1000) oldattal inkubáltuk a

metszeteket. A tárgylemezek mosását követően a mintákat fedőmédiával fedtük be. A metszeteket egy Zeiss LSM 510 (Thornwood, NY, USA) konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével 40 x nagyításon tanulmányoztuk.

## **12. Transzmissziós elektronmikroszkópos és fénymikroszkópos eljárások:**

A minták egy részét 4 %-os glutáraldehid oldattal fixáltuk. A membránok kontrasztját 0,1 M cacodylate pufferben oldott ozmium-ferrocianáttal növeltük az utólagos fixáció során. Ezt követően a mintákat dehidratáltuk, és Epon 812 vel infiltráltuk és ágyasztuk be 60 °C-on 48 órán át. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz 1 µm vastagságú metszeteket festettünk meg 1 %-os toluidin kékkel. A vizsgálatokhoz Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments, Inc) mikroszkópot használtunk, s a képek rögzítéséhez egy CCD AxioCam Hrc Zeiss kamerát (Carl Zeiss Imaging solution GmbH, Németország) alkalmaztunk.

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

### **13. Statisztika:**

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

## **Eredmények:**

### **I. A meggyماغ kivonat hatása iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásokkal szemben.**

#### **I a. A meggyماغ kezelés hatása a kamrai aritmiákra.**

Először a meggyماغkivonat hatását vizsgáltuk az I/R-indukálta kamrai tachikardiák és fibrilláció kialakulására. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a meggyماغkivonat 14 napos kezelést követően dóziszfüggő módon csökkentette mind a VT mind a VF kialakulásának gyakoriságát 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúziót követően. A kezeletlen kontroll szívek 92 %-ában alakul ki fibrilláció I/R után és minden szívben kialakult VT. Az 1 mg/ttkg dózisú meggyماغ kivonattal kezelt csoportban hasonló eredményeket kaptunk, mint a kezeletlen kontroll csoportban. Mind az 5 mg mind a 10 mg/ttkg meggyماغ kivonattal kezelt csoportban csökkent a VF kialakulása (75 % és 50 % szemben a 92 %-al) a kontroll csoporthoz

képest, azonban ezek nem értek el a statisztikailag szignifikánsnak számító értéket. A legmagasabb 30 mg/ttkg meggymag kivonattal kezelt csoportban mind a VF mind a VT kialakulása jelentős mértékben csökkent a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (92 % és 100 %-ról 17 % illetve 25 %-ra).

### **I b. A meggymag kivonat hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra.**

Hasonlóan a kamrai aritmiák kialakulását csökkentő hatáshoz, a meggymagkivonattal történő kezelés dóziszfüggő módon javítja a poszt iszkémiás szívfunkciókat. Eredményeink azt mutatták, hogy a 10 és 30 mg/ttg-os kezelés szignifikáns mértékben javította a posztisztkémiás bal kamrai funkciókat. Így az aorta kiáramlás például 120 perc reperfüzió után  $9,8 \pm 0,8$  ml volt a kontrol csoportban, ezzel szemben  $21,7 \pm 1,0$  ml illetve  $25,3 \pm 1,3$  ml-re emelkedett a magasabb dózissal kezelt csoportokban. Hasonló változásokat tapasztaltunk a koronáriás átáramlás és a kifejlődő bal kamrai nyomás esetében is. A szív frekvencia nem mutatott jelentős különbséget a csoportok között. A két alacsonyabb dózissal kezelt csoport egyikében sem találtunk jelentős különbséget a kezeletlen csoporthoz képest.

### **I c. A meggymag kivonat előkezelés hatása az infarktusz terület nagyságára.**

Az infarktusz terület nagyságát TTC módszer segítségével határoztuk meg. A kontroll csoportban az infarktusz terület  $38,3 \pm 1,3$  %-nak adódott, ehhez képest a 10 mg/ttkg-os meggymag kivonat kezelés  $26,5 \pm 2$  %, a 30 mg/ttkg-os kezelés pedig  $21,8 \pm 1,8$  %-ra csökkentette ezt az értéket, amely mindkét esetben statisztikailag szignifikánsnak számított. A két

alacsonyabb dózissal kezelt állatok szívében nem csökkent jelentős mértékben az infarktusos terület nagysága.

#### **I d. A meggyzag kezelés hatása a kaszpáz-3 aktivitásra és az apoptózisra.**

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

A kaszpáz-3 egy aszpartát specifikus cisztein proteáz, amely a sejtekben inaktív zimogén formában található meg. Az apoptózis kezdetén a prokaspáz-3 aktiválódik, az aktív kaszpáz-3 ezt követően több fontos fehérjét aktivál. Vizsgálataink során kiderült, hogy a két magasabb dózisu meggyzag kivonattal történő kezelés képes csökkenteni a kaszpáz-3 expresszióját, talán ez az egyik mechanizmus, amellyel a meggyzag kivonata csökkenti az apoptózist és hozzájárul a védő hatásokhoz, melyet a meggyzag kivonattal történő kezelést követően tapasztaltunk.

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

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

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

### **II b. A rezveratrol kezelés hatása a posztisztkémiás szívfunkciókra.**

A kezeléseket követően az állatok szívét izoláltuk és 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy 5 mg/kg rezveratrol kezelés jelentősen javította a posztisztkémiás szívfunkciókat még a külön cukorterhelés mellett is. Az aorta kiáramlás például 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió után  $5,1 \pm 0,6$  ml volt az elhízott kontroll, amely  $7,8 \pm 1,0$  ml volt a rezveratrollal kezelt

csoportban. Hasonló eredményeket kaptunk a külön cukorral is kezelt csoportokban, itt az aorta kiáramlás  $4,5 \pm 0,4$  ml, míg a rezveratrollal kezelt csoportban  $6,7 \pm 0,6$  ml volt.

### **II c. A rezveratrol hatása a kamrai aritmiákra.**

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

### **II d. A rezveratrol hatása az infarktusz terület nagyságára.**

A kapott eredményekből kiderül, hogy a rezveratrol képes volt csökkenteni az infarktusz terület mértékét. Az elhízott kontroll csoportban  $41 \pm 6$  % a cukorral kezelt elhízott állatokban  $42 \pm 7$  % volt ehhez képest a rezveratrollal kezelt csoportokban  $21 \pm 5$  %, a rezveratrollal és a cukorral is kezelt csoportban pedig  $26 \pm 6$  % volt.

### **II e. A rezveratrol kezelés hatása az endotelin felszabadulásra.**

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

felszabaduló endotelin mennyiségét. Hasonlóan csökkentette a cukor oldattal kezelt elhízott állatok szívében is.

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

A felszabaduló endotelin mennyiségének meghatározása utána vizsgáltuk a különböző csoportból származó szívekben az ET-1 és a Glut-4 fehérjék expresszióját. Az ET-1 fehérje jelentős emelkedést mutatott az elhízott állatok szívében a normál állatok szívéhez képest, mely tovább emelkedett a cukorral kezelt állatok szívében. Rezveratrol kezelés jelentősen képes volt csökkenteni az ET-1 fehérje szintjét mindkét kezelt csoportban.

Ellentétben az ET-1 fehérjével az elhízott állatok szívében a GLUT-4 fehérje szintje csökkent és a külön cukorterhelés ezt tovább csökkentette. A rezveratrol kezelés képes volt a GLUT-4 fehérje szintjét jelentős mértékben megemelni az elhízott állatokban még a külön cukorterhelést kapott csoportban is.

#### **II g. A rezveratrol kezelés hatása az apoptózisra.**

A rezveratrol kezelés hasonlóan az infarktusos területhez szignifikánsan csökkentette az apoptotikus sejtek számát a kezelt csoportokban. Az aerob kontrollban nem detektáltunk apoptotikus sejteket, az iszkémia/reperfúzió minden szívben indukálta a sejtek apoptotikus elhalását. Az elhízott kontroll állatokban ez az érték magasabb volt, mint a normál kontroll I/R csoportban, amelyet a cukorterhelés még tovább fokozott. A rezveratrol kezelés szignifikánsan csökkentette az apoptotikus

sejtek mennyiségét mind az elhízott mind a glükózzal kezelt elhízott csoportban.

### **III. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol hatása az I/R indukálta károsodásokkal szemben.**

#### **III a. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére.**

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

A Wortmanninal (PI3-kináz inhibitor) és a 3-metiladeninnel (autofágia inhibitor) egyaránt jelentősen csökkentette a rezveratrol és/vagy  $\gamma$ -tokotrienol kezelés hatásait. Megjegyzendő azonban, hogy az általunk használt körülmények között a Wortmannin által kifejtett blokkoló hatás erősebbnek bizonyult, mint a 3-metiladenin hatása.

### **III b. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol hatása az infarktusos területre és az apoptózisra.**

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

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

### **III c. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol hatása a „túlélési” útvonalakra.**

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

### **III d. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol hatása az autofágiára.**

Vizsgáltuk, hogy a két növényi hatóanyag képes-e az autofágia indukálására, és ez szerepet játszik-e a hatóanyagok kardioprotektív hatásaiban. Először Western-blot segítségével tanulmányoztuk a Beclin-1 fehérje szintjét és az LC3II/LC3I arányát. A vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban I/R-t követően kismértékű emelkedést tapasztaltunk a Beclin-1 és az LC3II/LC3I arányban. Az eredmény jól korrelál az irodalommal mely szerint az I/R fokozza az autofágiát. A két monoterápiás csoportban további jelentős emelkedést tapasztaltunk az I/R kontrolhoz képest. A rezveratrollal és  $\gamma$ -tokotrienollal kezelt csoportban az LC3II/LC3I aránya és a Beclin-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a két monoterápiás csoporthoz viszonyítva. Hasonlóan a „túlélési” szignál fehérjéihez, a Wortmannin csökkentette az autofágiás markerek szintjét. Ezt követően immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk az LC3II pozitív sejtek számát. Hasonlóan a Western-blot eredményekhez, enyhén növekedett számú LC3II pozitív sejtet figyeltünk meg a kontroll I/R csoportban. Mind a két

hatóanyaggal történő kezelés jelentősen növelte az LC3II pozitív sejtek számát. A Wortmannin kezelés, hasonlóan a Western-blot eredményekhez, csökkentette az LC3II pozitív sejtek számát, valamennyi kezelt csoportból származó mintában.

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

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

### **III e. A rezveratrol és/vagy $\gamma$ -tokotrienol különböző módon indukálja az autofágiát.**

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk az autofágia indukciójának módját, Western-blot analízis segítségével mértük az mTOR foszforiláltságát. Az aerob kontrollhoz képest az I/R enyhén csökkentette az mTOR foszforiláltságát. Rezveratrol jelenlétében is csökkent valamelyest a

foszforiláltság, de ez nem volt jelentős, szemben a  $\gamma$ -tokotrienollal kezelt csoporttal ahol jelentősen csökkent a p-m TOR/mTOR arány. A Wortmannin kezelés valamennyi esetben emelte az mTOR foszforilációs szintjét. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a rezveratrol által indukált autofágia kevésbé függ az mTOR-tól, ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a  $\gamma$ -tokotrienol mTOR függő módon indukálja az autofágiát.

### **Következtetések**

Kísérleteink első részében a Magyarországon ipari hulladéknak minősülő meggymagkivonatot vizsgáltuk. Meghatároztuk a kamrai aritmiák és a kamrai fibrilláció kialakulásának valószínűségét, továbbá mertük a pre és posztisztkémiás szívfunkciókat. A kísérletek végén vizsgáltuk az infarktusos terület nagyságát, az apoptózis mértékét, és a kaszpáz-3 expresszióját. Az eredményeink összességében igazolták, hogy a meggymagkivonat dózisfüggő módon képes csökkenteni a kamrai aritmiák kialakulásának valószínűségét, illetve javítja a posztisztkémiás szívfunkciókat, ezek mellett csökkenti az infarktusos terület nagyságát és az apoptózis mértékét. Továbbá immunhisztokémiai vizsgálataink kiderítették, hogy a meggymagkivonat képes volt csökkenteni a kaszpáz-3 expresszióját.

A kaszpázok egy konzervált cisztein proteáz enzimesalád tagjai (caspase = cystein-dependent aspartate-specific protease), amelyek kulcsszerepet játszanak a programozott sejthalál evolúciósan konzervált folyamataiban. Prekursor (zimogén) formában képződnek és két jól szabályozott útvonalon aktiválódnak. Az egyik az extrinszik vagy „halál” receptor útvonal, a másik intrinszik vagy mitokondriális útvonal, amelyet a

celluláris stressz aktivál és a citokróm c mitokondriumokból történő felszabadulása indít el. A kaszpáz-3 az effektor kaszpázok közé tartozik, amelyek a sejtek teljes lebontásáért felelős. Kezdeti tanulmányok szerint a hipoxia, illetve az iszkémia elegendő az apoptózis elindításához, azonban későbbi tanulmányok megváltoztatták ezt a nézetet. Webster és munkatársai szerint nem az iszkémia vagy a hipoxia, hanem az acidózis, a reoxigenizáció illetve reperfúzió felelős a szívizomban az apoptózis kialakulásáért. Különböző specifikus és nem specifikus kaszpáz inhibitorok vizsgálatával igazolták, hogy a kaszpázok gátlása révén csökkenthető az I/R indukálta apoptózis mértéke és a posztisztkémiás károsodások súlyossága. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a meggymagkivonat képes csökkenteni az apoptózis mértéket a kaszpáz-3 gátlása révén, azt azonban nem zárhatjuk ki, hogy a kardioprotektív hatásokban más kaszpázok gátlása is szerepet játszik, mint ahogyan valószínűleg más mechanizmusok is szerepet játszanak a kardioprotektív hatások kialakulásában. Annál is inkább mert a meggymagkivonatban található flavonoidok, pro- és antocianidok vagy a polifenolok rendelkeznek antioxidáns hatásokkal. Továbbá a meggymagkivonatról kimutatták, hogy képes megvédeni a retinát a reperfúzió-indukálta károsodásoktól azáltal, hogy növeli a HO-1 expressziót és ez által emeli az endogén CO koncentrációját. Noha jelen tanulmányunkban nem tanulmányoztuk a hemoxigenáz rendszert, de joggal feltételezzük azt, hogy ahogyan a retinaprotektív hatásokban úgy a meggymagkivonat által közvetített kardioprotektív hatásokban is szerepet játszik a hemoxigenáz rendszer. Eredményeink alapján azt lehetetlen megállapítani, hogy a meggymagkivonat direkt csökkenti a reperfúzió indukálta károsodásokat vagy a látott kardioprotektív hatás a

meggyماغkivonat antiiszkémiás hatásával függ össze, mivel az állatok előkezelve voltak és nem pedig akutan az iszkémia alatt vagy a reperfúzió során kapták a meggyماغkivonatot.

Második kísérletsorozatunkban a rezveratrolt, a meggyماغkivonat egyik lehetséges bioaktív komponensét vizsgáltuk. A kísérletek közben arra kerestük a választ, hogy hasonlóan a normál szívizomhoz képes e a rezveratrol a „beteg” miokardiumot is megvédeni az I/R indukálta károsodásokkal szemben. Eredményeink tükrében elmondhatjuk, hogy a rezveratrol képes a „beteg” szívizmot is megvédeni az I/R indukálta károsodásoktól, amit bizonyít a posztiszkémiás szívfunkciók jobb felépülése, valamint a csökkent infarktusz terület és apoptózis mértéke a kezelt csoportokban.

Ismeretes, hogy a diabétesz vagy a metabolikus szindróma jelentős kockázati tényező a különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Továbbá a diabéteszes betegek körében sokkal nagyobb az anginás megbetegedések és az infarktusz kialakulásának valószínűsége és azok súlyossága. A miokardiális infarktus után a mortalitás 2-3x nagyobb, mint a nem diabéteszes betegekben, valamint az infarktusok után kialakuló szívelégtelenség kialakulásának a valószínűsége is kétszer magasabb a nem diabéteszes beteg csoportokhoz viszonyítva. Az egyik legjelentősebb eltérés a diabéteszes páciensek szívsejtjeiben a metabolizmus megváltozása, különösképpen az, hogy csökken a sejtek glükóz felvétele és oxidációja, amellyel párhuzamosan nő a zsírsavak felhasználása. Még diabétesz nélkül is a glükózzal zsírsavakra történő váltás növeli az iszkémia súlyosságát, és csökkenti a posztiszkémiás felépülést. Sidell és munkatársai (2002, Diabetes) „Zucker obese” patkányokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy ha

helyreállítják a szívszövet inzulin érzékenységét roziglitazonnal, javul a szívszövet glükóz felhasználása és a posztisztkémiás funkciók felépülése. A kísérleteinkben alkalmazott állatok inzulin rezisztensek voltak, és csökkent a szívszövetben a Glut-4 fehérje szintje, amelyet a roziglitazon kezelés helyreállított. Tian és munkatársai (2001, Circulation) szív specifikus Glut-4 KO egereket használva kimutatták, hogy ezen állatok szívében csökken a glükóz felhasználás, és nő az iszkémiás károsodások mértéke. Ezen eredmények jól mutatják az inzulin érzékeny Glut-4 transzporter fontosságát a diabéteszes és nem diabéteszes állapotokban egyaránt.

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

Az endotél sejtek diszfunkcióját több kardiovaszkuláris megbetegedéssel hozták és hozhatjuk összefüggésbe, így az arterioszklerózis vagy az iszkémiás szívbetegségekben is kimutatták azok jelentőségét. Mint ismeretes, az endotél sejtek fontos szerepet játszanak a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában, több vazóaktív anyag termelése révén is. Verma és munkatársai (2002, J Thorac Cardiovasc Surg) emelkedett endotelin

szintet találtak a diabéteszes betegek koronária folyadékában koronária bypass műtét után. Megfigyelték továbbá, hogy a diabéteszes betegekből származó koronáriás mikro erek erősebb kontrakciós választ adnak ET-1 stimulusra mint a nem diabéteszes paciensek mintái, s ez a hatás gátolható volt endotein antagonistával. A jelen tanulmányunkban is vizsgáltuk az endotelin szintjét és emelkedett endotelin szintet detektáltunk az „obese” állatok koronáriás folyadékában I/R után, amely tovább emelkedett a glükózzal kezelt állatok szívszövetében. Mindkét rezveratrollal kezelt csoportban jelentős csökkenést tapasztaltunk. Hasonló eredményeket figyeltünk meg az endothelin-1 fehérje szintjének a vizsgálata során. A rezveratrol ET-1 expressziót és endotelin felszabadulást gátló hatásában valószínűleg direkt és indirekt hatások is szerepet játszanak. Liu és munkatársai kimutatták, hogy a rezveratrol képes csökkenteni a rostfeszülés indukálta ET-1 felszabadulást és az ET-1 mRNS szintet humán köldökzsinór véna endoteliális sejteken (HUVEC). A hatást a szerzők részben a ROS szint csökkentésével és az ERK1/2 szignáltranszdukciós útvonal gátlásával magyarázták. Ez részben magyarázatot adhat a jelen tanulmányunkban megfigyelt ET-1 szint csökkenésére is. Valószínűleg azonban egy másik indirekt hatás is szerepet játszik a rezveratrol által indukált változásokban. Nevezetesen az, hogy az emelkedett glükóz szint is képes az ET-1 szekrécióját és expresszióját fokozni. Továbbá Park és munkatársai (2000, Diabetes) megfigyelték, hogy a magas glükóz szint által kiváltott ET-1 expresszió növekedés visszafordítható a glükóz szint csökkentésével. Ezek és az alapján, hogy a rezveratrol mind a két kezelt csoportban csökkentette a vér glükóz szintjét, valószínűsíthetjük, hogy a rezveratrol ezen indirekt hatása is hozzájárul az ET-1 szignáltranszdukciós útvonal aktivitásának

csökkentéséhez. Összegezve eredményeinket elmondhatjuk, hogy a rezveratrol képes megvédeni az elhízott és cukorbeteg állatok szívét az I/R-indukálta károsodásoktól, amit bizonyítanak a javult posztisztkémiai funkciók, a csökkent infarktusz terület nagysága és apoptózis mértéke. A rezveratrol ezen hatása magyarázható azzal, hogy képes javítani a szív glükóz felhasználását, továbbá normalizálni a szervezet glükóz szintjét, valamint direkt és indirekt módokon csökkenteni a túlzott endotelin felszabadulást.

Harmadik kísérleti sorozatunkban arra kerestük a választ vajon van-e valamilyen interakció a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol között. Kísérleti eredményeinkre alapozva elmondhatjuk, hogy a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol között szinergista hatások alakulnak ki. Amint azt korábbi eredményink alapján vártuk, mind a rezveratrol mind a  $\gamma$ -tokotrienol rendelkezik kardioprotektív hatásokkal. Az izolált iszkémia/reperfundált szívek vizsgálata során jelen tanulmányunkban is megfigyeltük a posztisztkémiai szívfunkciók javulását a rezveratrollal vagy  $\gamma$ -tokotrienollal kezelt csoportokban. A negyedik csoportban, ahol mind a két növényi származékkal kezeltük az állatokat további javulást tapasztaltunk, amely statisztikailag jelentős volt a monoterápiákhoz képest. Hasonló tendenciákat figyeltünk meg az infarktusz terület és az apoptózis vizsgálata során, ahol valamennyi kezelt csoportban szignifikánsan javulást tapasztaltunk a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezekben a vizsgálatokban is a kettős kezelésben részesült állatok szíve volt a „legjobb” I/R után, azonban itt nem volt statisztikailag jelentős különbség a mono és a duál terápia között. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor vizsgáltuk a prokaspáz-3 szintet.

Vizsgáltuk az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjét is, hiszen a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai központi szerepet játszanak a szívizom apoptotikus folyamataiban. A Bcl-2 fehérjéről kimutatták, hogy védi a mitokondriumokat több mechanizmuson keresztül, pl. inaktíválja a Bax/Bak fehérjét és ezáltal gátolja a mitokondrium külső membránjának permeabilizációját. Bcl-2 transzgén állatok szívében kevesebb apoptotikus sejtet, csökkent infarktusz területet és jobb balkamrai funkciókat mértek I/R után. Western-blot eredményeinkből kiderült, hogy valamennyi kezelt csoportban jelentősen megemelkedett a Bcl-2 fehérje szintje. A kettős kezelésben részesült csoportban ez az emelkedés szignifikánsan magasabb volt a monoterápiás csoportokhoz viszonyítva. A „túlélési” Akt fehérje aktivitásának vizsgálatakor hasonló eredményeket kaptunk. Ez alapján úgy tűnik, hogy a rezveratrol és  $\gamma$ -tokotrienol által indukált kardioprotektív hatások részben a Bcl-2-Akt „túlélési” útvonal indukációjával valósul meg, mint ahogyan a szinergista hatásokért is részben ezek a mechanizmusok a felelősek.

Tanulmányunkban vizsgáltuk az autofágia szerepét a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol hatásában. Kezdetben az autofágiát, mint a programozott sejthalál nem apoptotikus formáját tartották számon. Manapság viszont az autofágia szerepe egyre jobban kiszélesedni látszik, és egyre több bizonyíték utal arra, hogy bizonyos körülmények között az autofágia túlélési folyamatokban is fontos szerepet játszik. Az autofágia fokozódását írták le krónikusan iszkémiás sertés szívizomban, úgy hogy az autofágia jelensége a túlélő miokardiumban volt fokozott. Egy korábbi tanulmányunkban fokozott autofágiát tapasztaltunk iszkémiás prekondicionáció után (IPC), vizsgálataink szerint az autofágia a Bag-1 protein indukációján keresztül fokozódik. A Bag-1 útvonal gátlása csökkentette az autofágia nagyságát, és

megakadályozta az IPC protektív hatását. Jelen tanulmányunkban elsőként vizsgáltuk az LC3II/LC3I arányát valamint a Beclin-1 fehérje szintjét Western-blot segítségével. Az LC3II az egyik legjobb marker az autofagoszómembrán komponenseire. Az LC3 mellett a Beclin-1-et használtuk markerként. Eredményeink szerint, valamennyi kezelés fokozta a Beclin-1 és az LC3II/LC3I arányát, de a legintenzívebb változásokat a kettős kezelésben részesült csoportban detektáltunk. A Wortmanninnal történő kezelés csökkentette mindkét anyag autofágiát indukáló hatását. Immunhisztokémiai vizsgálataink alátámasztották a Western-blottal kapott eredményeket, és enyhén emelkedett LC3II festést detektáltunk az I/R csoportba tartozó szívekben, összhangban az irodalmi adatokkal miszerint az I/R képes indukálni az autofágiát. Immunhisztokémiai vizsgálataink során is fokozott LC3II festést tapasztaltunk a kezelt szívekben, amelyet a Wortmannin lecsökkentett.

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

Fénymikroszkópos eredményeink alátámasztották az elméletünket, miszerint ezek a természetes anyagok rendelkeznek kardioprotektív hatásokkal. Az I/R kontroll szívekben valamint a hatóanyagokkal és 3-MA-nel kezelt állatok szívében onkotikus szívizomsejteket figyeltünk meg, a jellemző nekrotikus sávokkal. A kezelt csoportokban ehhez képest majdnem normál szerkezetű szívizomsejteket találtunk, alátámasztva a kardioprotektív hatásokat. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

mege erősítették az autofagoszómák jelenlétét a kezelt állatokban. Az I/R kontroll szívekben és a 3-MA-val kezelt állatok szívében is jelen vannak autofagoszómák, de ezekben a szívekben a szívizomsejtek struktúrája jelentős változásokat mutatnak.

Munkánk során vizsgáltuk az mTOR (mammalian target of rapamycin) szerepét az autofágia indukálásában. A Tor egy konzervált Ser/Thr protein kináz, amely szerepet játszik a sejt növekedésének, sejtciklus menetének, a tápanyag felvételének, fehérje szintézisének és az autofágia szabályozásában. Eredményeinkből láthatjuk, hogy az I/R önmagában is csökkentette a p-m TOR/mTOR arányát, ami arra utal, hogy az I/R indukálta autofágiában az mTOR szerepet játszik. További eredményeinkből kitűnik, hogy a  $\gamma$ -tokotrienol jelentősen csökkentette a p-m TOR/mTOR arányát, ami arra utal, hogy a  $\gamma$ -tokotrienol által előidézett autofágia jelentős mértékben függ az mTOR aktivitásától, ezzel szemben a rezveratrol indukálta autofágia kevésbé függ tőle. Kísérleteinkben igazoltuk tehát, hogy a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol között vannak bizonyos szinergista hatások. Ezen hatásokban fontos szerepet játszik az Akt-Bcl-2 túlélési útvonal aktiválása, valamint az autofágia indukciója.

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

## **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

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

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

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

**Az értekezéshez fel nem használt egyéb közlemények:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dudley JI, **Lekli I**, Mukherjee S, Das M, Bertelli AA, Das DK. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9362-73. (IF: 2.532)

Gurusamy N, **Lekli I**, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in

association with BAG-1 protein. J Cell Mol Med. 2009 Feb;13(2):373-87. (IF: 6.807)

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

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

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

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

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

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

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

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

Kumulatív IF: 87,385