

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szokol Miklós

**Az alfa-melanocytá stimuláló hormon akut és
krónikus hatásai a hem oxigenáz szignál-
transzdukcióra, egészséges, illetve Zucker Diabetic
Fat (ZDF) patkánymodellen**

**DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola
DEBRECEN**

2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az alfa-melanocytá stimuláló hormon akut és krónikus hatásai a hem oxigenáz szignál-transzdukcióra egészséges, illetve Zucker Diabetic Fat (ZDF) patkánymodellen

Dr. Szokol Miklós

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

DEBRECEN

2021

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. A diabétesz mellitusz (DM)	7
3.1.1. <i>A diabétesz mellitus általános jellemzése, klasszifikációja</i>	7
3.1.2. <i>A diabétesz mellitus prevalenciája</i>	10
3.1.3. <i>A diabétesz mellitus patogenezise</i>	11
3.1.4. <i>A diabétesz mellitusjelenlegi terápiája</i>	13
3.2. A melanokortin rendszer	16
3.2.1. <i>POMC-származék peptidek</i>	16
3.2.2. <i>Az α-MSH iszkémia/reperfúzióban betöltött szerepe</i>	19
3.3. A hemoxigenáz rendszer.....	20
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
4.1. Kísérleti állatok.....	23
4.2. Etikai irányelvek	23
4.3. Kísérleti elrendezés.....	23
4.3.1. <i>Első kísérleti elrendezés</i>	23
4.3.2. <i>Második kísérleti elrendezés</i>	26
4.4. Kémiai reagensek	27
4.5. Echokardiográfia	28
4.6. Izolált „dolgozó szív”	29
4.7. Globális iszkémia és reperfúzió indukálása izolált „dolgozó szíven”	30
4.8. Kardiális aritmia incidencia megállapítása	30
4.9. Izolált aorta gyűrű kísérlet	31
4.10. Az izolált „dolgozó szívek” infarktálódott területeinek meghatározása	31
4.11. A szívizom HO-1 aktivitásának mérése	32
4.12. HO-1 fehérje szívizomszöveti expressziójának meghatározása Western Blottal	32
4.13. Ozmotikus Pumpa Implantációja.....	33

4.14. Orális Glükóz Tolerancia Teszt (OGTT).....	33
4.15. Éber állatok vérnyomásmérése.....	34
4.16. Szérum paraméterek analízise	34
4.17. Izolált kardiomiociták erőmérése.....	34
4.18. Artériás kontraktilis erőmérés	35
4.19. NADPH oxidáz aktivitás mérés	36
4.20. Statisztikai analízis	36
5. EREDMÉNYEK	38
5.1. A kutatás első fázisának eredményei.....	38
5.1.1. <i>Echokardiográfiás eredmények: Frakcionális Rövidülés és Ejekciós Frakció (IV. protokoll)</i>	38
5.1.2. <i>Izolált „dolgozó szív” modell eredmények (II. protokoll)</i>	38
5.1.2.1. <i>α-MSH és SnPP hatásai a szívfrekvenciára (HR)</i>	39
5.1.2.2. <i>α-MSH és SnPP hatásai a koronáriaáramlásra (CF)</i>	41
5.1.2.3. <i>α-MSH és SnPP hatásai az aortaáramlásra (AF)</i>	41
5.1.2.4. <i>α-MSH és SnPP hatásai a perctérfogatra (CO) és verőtérfogatra (SV)</i> .	42
5.1.3. <i>Az α-MSH adminisztráció direkt hatása az izolált szívmodelleken (III. protokoll)</i>	42
5.1.4. <i>Kamrai aritmiák incidenciájának és súlyosságának meghatározása (II. protokoll)</i>	44
5.1.5. <i>A NOARG és INDO hatásai az α-MSH-mediált vaszkuláris tónus válaszokra (V. protokoll)</i>	45
5.1.5.1. <i>Fenilefrinre adott vaszkuláris válasz (prekontrakció)</i>	45
5.1.5.2. <i>α-MSH-ra adott vaszkuláris válasz</i>	45
5.1.6. <i>Az α-MSH és HO-1 gátlás hatása az iszkémia/reperfúzió-indukált kardiális infarktus kiterjedésére (II. protokoll)</i>	46
5.1.7. <i>Az α-MSH és SnPP kezelés hatásai a szöveti HO-1 aktivitásra (II. protokoll)</i> ..	47
5.1.8. <i>Western Blot analízis (I. protokoll)</i>	47
5.2. A kutatás második fázisának eredményei	48
5.2.1. <i>Súlygyarapodás, szérumparaméterek, vérnyomás és bal kamra tömeg/teljes testtömeg arány</i>	48
5.2.2. <i>Az OGTT teszt eredményei</i>	49

5.2.3. Echokardiográfia.....	49
5.2.4. Izolált „dolgozó szív” modell eredmények.....	51
5.2.5. Az α -MSH kezelést követő fokozott kardiomiocita kontraktilis teljesítmény	54
5.2.6. Az agyi erek vaszkuláris státusza	55
5.2.7. NADPH oxidáz aktivitás	56
6. MEGBESZÉLÉS	57
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	65
<i>Summary</i>	66
8. IRODALOMJEGYZÉK	67
9. TÁRGYSZAVAK.....	77
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	78

1. Rövidítések jegyzéke

ACTH	Adrenocorticotropic hormone, Adrenokortikotrop hormon
AgRP	Agouti related peptid, Agoutihoz kapcsolt peptid
Ao	Aortic root diameter, Aortagyök átmérő
AoP	Aortic pressure, Aorta nyomás
ARC	Hypothalamus nucleus arcuatus
BMI	Body mass index, Testtömeg index
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, Ciklikus adenzin monofoszfát
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate, Ciklikus guanozin monofoszfát
CO	Carbon monoxide, Szénmonoxid
CO	Cardiac output, Perctérfogat
DPP	Dipeptidyl peptidas, Dipeptidil-peptidáz
DTT	Dithiothreitol, Ditiotreitól
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Etilén-diamin-tetraecetsav
EF	Ejection fraction, Bal kamrai ejekciós frakció
eGFR	Estimated glomerular filtration rate, Becsült glomeruláris filtrációs ráta
ERG	Electroretinography, Elektoretinográfia
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase, Extracelluláris szignál-regulált kináz
ESV	End-systolic volume, Végszisztolés térfogat
EDV	End-diastolic volume, Végdiasztolés térfogat
ET	Ejection time, Ejekciós idő
FGF21	Fibroblast growth factor 21, Fibroblaszt növekedési faktor 21
FS	Fractional shortening, Frakcionális rövidülés
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GLP	Glucagon like peptide, Glukagon-szerű fehérje
GLUT4	Glucose transporter type 4, Glükóz transzporter 4
HbA1c	Hemoglobin A1c

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetán-szulfonsav
HNF	Hepatocyte nuclear factor, Hepatocita sejtmagi faktor
HO-1	Heme oxygenase-1, Hemoxigenáz-1
HR	Heart rate, Szívfrekvencia
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1, Intercelluláris adhézió molekula 1
IGT	Impaired glucose tolerance, Károsodott glükóz tolerancia
IL-6	Interleukin-6
INDO	Indomethacin, Indometacin
IPF	Insulin promoter factor, Inzulin promóter faktor
I/R	Ischemia/reperfusion, Iszkémia/reperfúzió
IRS	Insulin receptor substrate, Inzulin receptor szubsztrát
IVCT	Isovolumetric contraction time, Izovolumetriás kontrakciós idő
IVRT	Isovolumetric relaxation time, Izovolumetriás relaxációs idő
IVS	Interventricular septum, Interventrikuláris szeptum
K ⁺	Potassium ion, Kálium ion
KO	Knock out, Génhiányos
LA	Left atrial diameter, Bal pitvari átmérő
LV	Left ventricle, Bal kamra
LVID	Left ventricular internal diameter, Bal kamrai belső átmérő
LVOT	Left ventricular outflow tract, Bal kamrai kiáramlási pálya
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, Mitogén-aktivált protein kináz
MAPSE	Mitral annular plane systolic excursion, Mitrális gyűrű szisztolés csúcskitérése
MCR	Melanocortin receptor, Melanokortin receptor
MODY	Maturity onset diabetes of the young, Fiatalok késői diabétesze
MPI	Myocardial performance index, Miokardiális performációs index
MPO	Myeloperoxidase, Mieloperoxidáz
MRAP	Melanocortin receptor-associated protein, Melanokortin receptor asszociált protein
MSH	Melanocyte-stimulating hormone, Melanocita stimuláló hormon
MV	Mitral valve, Mitrális billentyű

NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, Nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
NeuroD1	Neurogenic differentiation factor 1, Neurogén differenciációs fehérje 1
NF κ B	Nuclear factor κ B, Nukleáris faktor κ B
NO	Nitric oxide, Nitrogén monoxid
NOARG	N _ω -nitro-L-arginine, N _ω -nitro-L-arginin
NPY	Neuropeptide Y, Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
PDE	Phosphodiesterase, Foszfodiészteráz
PKA	Protein kinase A, Protein kináz A
PKC θ	Protein kinase C theta, Protein kináz C téta
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, Fenil-metil-szulfonil-fluorid
POMC	Pro-opiomelanocortin, Pro-opiomelanokortin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor, Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
PW	Posterior wall, Hátsó fal
SEM	Standard error of mean, Az átlagok standard hibája
SGLT	Sodium glucose linked transporter, Na ⁺ -glükóz kapcsolt transzporter
SnPP	Tin protoporphyrin, Ón(Sn)-protoporfirin
SV	Stroke volume, Verőtérfogat
T2DM	Type 2 diabetes mellitus, 2-es típusú cukorbetegség
TNF α	Tumor necrosis factor α , Tumor nekrozis faktor α
VGF	Nerve Growth Factor, Idegi eredetű növekedési faktor

2. Bevezetés és célkitűzés

A 2-es típusú cukorbetegség (T2DM) egy krónikus, életet veszélyeztető metabolikus rendellenesség, melyet magas szisztémás cukorszintek, inzulinrezisztencia, valamint a diszregulált gyulladás következményeként több szerv károsodása jellemez [1, 2]. Sajnálatos módon, az érintettek egész életét végigkíséri a betegség, és problémák széles skáláját okozhatja, úgymint: retinopátia, nefropátia, miokardiális infarktus, stroke, valamint a végtagok ereinek súlyos károsodása, mely akár amputációhoz is vezethet [3, 4]. Fontos megemlítenünk a szívizom fokozott vulnerabilitását, amely aritmiára hajlamosít. A T2DM farmakoterápiáját jelenleg a biguanidok, szulfonil-ureák, α -glükózidáz gátlók, tiazolidindionok, Na^+ -glükóz kapcsolt transzporter-2 (SGLT-2) gátlók, glukagon-szerű fehérje-1 (GLP-1) analógok, dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-4) gátlók, amylin analógok, és egyes esetben az inzulin analógok alkotják. Ezek a hatóanyagok részben normalizálhatják a vércukorszintet, és enyhíthetik a betegség súlyos következményeit, hozzájárulva számos beteg állapotának javításához. Mindazonáltal, ezek a szerek csak palliatív megoldások, és általában nem tudják a páciens egészségét teljesen helyreállítani. Egyes epidemiológiai felmérések kimutatták, hogy a betegség incidenciája drámaian nőtt az utóbbi időben, már-már epidémiái méreteket öltve [5-8]. Számos faktor hozzájárult ehhez a jelenséghez, elsődlegesen a mozgásszegény életmódból eredő tényezők, mint a túltápláltság, a fizikai aktivitás hiánya és főként a túlsúly, illetve elhízás [9-11]. A T2DM kialakulásával és patogenezisével szembeni ellenintézkedések legfőképp a fiziológiás energiafelhasználást szabályozó mechanizmusokat célozzák. Ezen a csoporton belül az általunk is vizsgált melanokortin rendszer meghatározó szerepet játszik az egész szervezet energia homeosztázisának beállításában, mivel a rendszer egyes tagjai étvágycsökkentő hatásuknak köszönhetően potens anorexigén hatással bírnak, míg mások fokozzák a táplálékfelvételt, ezáltal állítják be az egyensúlyt [12, 13]. A melanokortinok erősen befolyásolják az elhízás kialakulását, és járulékosan csökkentik a T2DM kialakulásának vagy rosszabbodásának kockázatát. Az is ismert, hogy a melanokortin analógok mind centrális, mind pedig perifériás injekciója drámaian megváltoztatja a táplálékfelvételt és a testsúlyt [14-18]. Genetikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a melanokortin rendszer bármely tagjának génjében bekövetkezett mutáció összefüggésbe hozható az elhízás és a T2DM kialakulásával mind állatok, mind emberek esetében [19]. Mechanikai kutatások kiderítették, hogy az alfa-melanocita stimuláló hormon (α -MSH), egy, a melanokortin családba tartozó neuropeptid, melyet test szerte számos különböző sejt expresszál változó mennyiségben [20], és mely a melanokortin (MC) 5 receptor aktiválása után a ciklikus adenosin monofoszfát/protein kináz A

(cAMP/PKA), valamint a mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál-regulált kináz (MAPK/ERK1) útvonalon keresztül szignifikánsan csökkenti az adipociták zsírtartalmát [21-23]. Az anorexigén hatáson túl, az α -MSH számos egyéb jótékony hatását mutatták be különböző állatkísérleti modellekben, melyek alapján kiderült, hogy anti-apoptotikus, anti-inflammatorikus, antiiszkémiás, valamint antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik [24-27]. A vegyület a melanokortin receptorok nem-szelektív teljes agonista molekulájaként működik, és fejt ki hatását. A normál homeosztázisban betöltött szerepei közé tartozik a haj és bőr pigmentációjának szabályozása, reprodukív funkció, valamint táplálékfelvétel és energia metabolizmus szabályozása [28]. Kutatásaink szempontjából a legjelentősebb hatása az inzulinérzékenyítő hatás, illetve az iszkémia/reperfúzió-s (I/R) sérülésekkel szembeni endogén védekezés [27, 29, 30]. Például miokardiális iszkémia/reperfúzióknak kitett patkányok szív-, illetve májszöveti válaszainak befolyásolásáról szóló kísérletek igazolták a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) által okozott gyulladásos szövetkárosodás, valamint apoptotikus sejtpusztulás mérséklődését, mely bal kamrai kardioprotektív hatást eredményez, és mely a Janus kináz/ extracelluláris szignál-regulált kináz/transzkripciós szignál transzducér (JAK/ERK/STAT) szignalizáció modulációján keresztül valósul meg. Ismertek kifejezetten az α -MSH-indukált HO-1 fehérje expresszió és enzimaktivitás által mediált védő hatások is [31, 32]. Ezzel összhangban számos tanulmány a szívizmot ért I/R károsodások elleni védekező rendszer egyik legfontosabb tagjaként említi a HO-1-et, hangsúlyozván annak jelentőségét.[33-36]. Mindazonáltal, a kardiomiocitában a hosszútávú α -MSH-kezelés, illetve az α -MSH/HO-1 indukció hatására létrejövő molekuláris változások csupán részben tisztázottak [30, 32, 37, 38]. A fenti eredmények alapján, illetve a HO-1 által befolyásolt, humán gyógyítás vonatkozásában relevanciával bíró folyamatok azonosítására történő erőfeszítésünknek megfelelően, ez a tanulmány az α -MSH HO-1 által közvetített, diabéteszben megjelenő, illetve kimondottan kardiovaszkuláris hatásokban betöltött szerepét, valamint a háttérben zajló celluláris folyamatokat hivatott felderíteni. Tanulmányunk első részében α -MSH-val előkezelt állatokból eltávolított izolált működő szíveken vizsgáltuk az I/R kardiális fiziológias értékekre gyakorolt hatását, mely paraméterek jó jelzői az I/R által felborított normális kardiovaszkuláris működéshez történő adaptációnak. Ezen változások HO-1 aktivitástól való függőségét, a szelektív HO-1 inhibitor molekula, az ón- protopofirin (SnPP) segítségével állapítottuk meg.

Kísérleteink második részében pedig egy ún. ozmotikus mini pumpa segítségével, hosszabb ideig fenntartott α -MSH stimuláció kardio-metabolikus paraméterekre, diasztolés szívfunkcióra

és miofilament kooperációra gyakorolt hatását igyekeztünk demonstrálni 'Zucker diabetic fatty' (ZDF) patkánymodellben. A kutatás legfőbb objektív célja ezen peptidnek a diabéteszes szövetek metabolikus, kardiális illetve vaszkuláris státuszában betöltött adaptív/protéktív szerepének jellemzése.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A diabétesz mellitusz (DM)

3.1.1. A diabétesz mellitus általános jellemzése, klasszifikációja

A diabétesz mellitusz (DM) egy metabolikus rendellenességeket magában foglaló csoport összefoglaló neve, mely csoport tagjaira különböző genetikai [39] és környezeti tényezők által meghatározott felborult cukorháztartás és emelkedett vércukorszint jellemző. A DM etiológiája alapján különböző faktorok járulhatnak hozzá a hiperglikémiához, mint például csökkent inzulinszekréció, károsodott cukorfelhasználás és emelkedett glükóztermelés. A DM-ra jellemző metabolikus zavar számos szervben másodlagos patofiziológiai eltéréseket (pl.: veseelégtelenség, felnőttkori vakság, végtag amputáció és kardiovaszkuláris rendellenességek) eredményez, melyek hatalmas terhet rónak mind a betegekre, mind pedig az egészségügyi ellátó rendszerre.

A DM klasszifikációja a patogenezis alapján történik. Két fő formája az 1-es (T1DM), illetve 2-es (T2DM) típusú diabétesz. Az 1-esre totális vagy közel teljes inzulinhiány jellemző, mely rendszerint a hasnyálmirigy béta sejtjeinek destrukciója következtében alakul ki. Ez a destrukció bekövetkezhet immun-mediált módon vagy pedig idiopátiás folyamatok következtében. A 2-es típusban változó mértékű inzulinrezisztencia, károsodott inzulinszekréció, emelkedett hepatikus glükóztermelés, az inkretin hormonokkal szembeni csökkent érzékenység, valamint fokozott renális glükózreabszorpció figyelhető meg [40]. Az inzulinszekrécióban vagy hatásban azonosítható különböző genetikai és metabolikus defektusok eredményezik az emelkedett vércukorszintet ebben a típusban, melyek közül főként a metabolikus tényezők képezik a manapság elérhető legtöbb farmakológiai hatóanyag terápiás célpontját. A T2DM kialakulását megelőzi egy ún. prediabéteszes állapot, melyre abnormális glükózhomeosztázis jellemző, és károsodott glükóztoleranciának nevezzük (IGT) (1. ábra). A T2DM legfontosabb rizikófaktorai között említhető a testtömeg index (BMI) (a diagnózis időpillanatához legközelebb eső mért BMI: 31,83 kg/m² férfiak esetén és 33,69 kg/m² nők esetén [41], a test zsíreloszlása, a szexuális hormonok egyensúlyának felborulása (nők esetén az androgén túlsúly, policisztás ovárium szindróma) fokozott rizikót jelent [42], valamint a mozgásszegény életmód és egészségtelen táplálkozás, illetve különböző pszichoszociális faktorok, mint az iskolázottság hiánya. Ezen rizikótényezők eloszlásában és hangsúlyában jelentős férfi-női különbségek mutatkoznak [43].

Diabétesz típus	Normál glükóz tolerancia	Hiperglikémia			
		Prediabétesz	Diabétesz mellitusz		
		IGT	Nem szükséges inzulin	Inzulin szükséges a kontrollhoz	szükséges a túléléshez
T1DM					
T2DM					
Éhomi plazma glükóz	< 5,6 mmol/L	5,6-6,9 mmol/L	> 7 mmol/L		
2 órás plazma glükóz	< 7,8 mmol/L	7,8-11 mmol/L	> 11,1 mmol/L		
HbA1C	< 5,6 %	5,7-6,4 %	> 6,4 %		

1. táblázat. Az táblázat a glükóz toleranciát, valamint a plazma glükóz és hemoglobin A1c (HbA1C) értékeit mutatja a normálistól a diabéteszig terjedően. A kétirányú nyíl azt jelzi, hogy a T2DM esetén a csökkent glükóztolerancia megfelelő terápiával és életmóddal visszafordítható.

A diabétesz részletes klasszifikációja az Amerikai Diabétesz Szervezet szerint:

- I. 1-es típusú diabétesz (β -sejt károsodás, mely általában abszolút inzulin hiányhoz vezet)
 - A. Immunmediált
 - B. Idiopátiás
- II. 2-es típusú diabétesz (egy spektrum, mely az elsősorban inzulin rezisztens, relatív inzulinhiányos állapottól az inzulinrezisztenciával járó, elsősorban szekréción elégtelenségig terjed)
- III. Egyéb specifikus típusok
 - A. A β -sejt funkció genetikai defektusai
 1. 12-es kromoszóma, HNF-1 α (MODY3)
 2. 7-es kromoszóma, glükokináz (MODY2)
 3. 20-as kromoszóma, HNF-4 α (MODY1)
 4. 13-as kromoszóma, inzulin promóter faktor-1 (IPF-1; MODY4)
 5. 17-es kromoszóma, HNF-1 β (MODY5)
 6. 2-es kromoszóma, *NeuroDI* (MODY6)
 7. Mitokondriális DNS
 8. Egyéb
 - B. Az inzulin hatás genetikai defektusai
 1. A-típusú inzulin rezisztencia
 2. Leprechaunizmus
 3. Rabson-Mendenhall szindróma
 4. Lipoatrófiás diabétesz

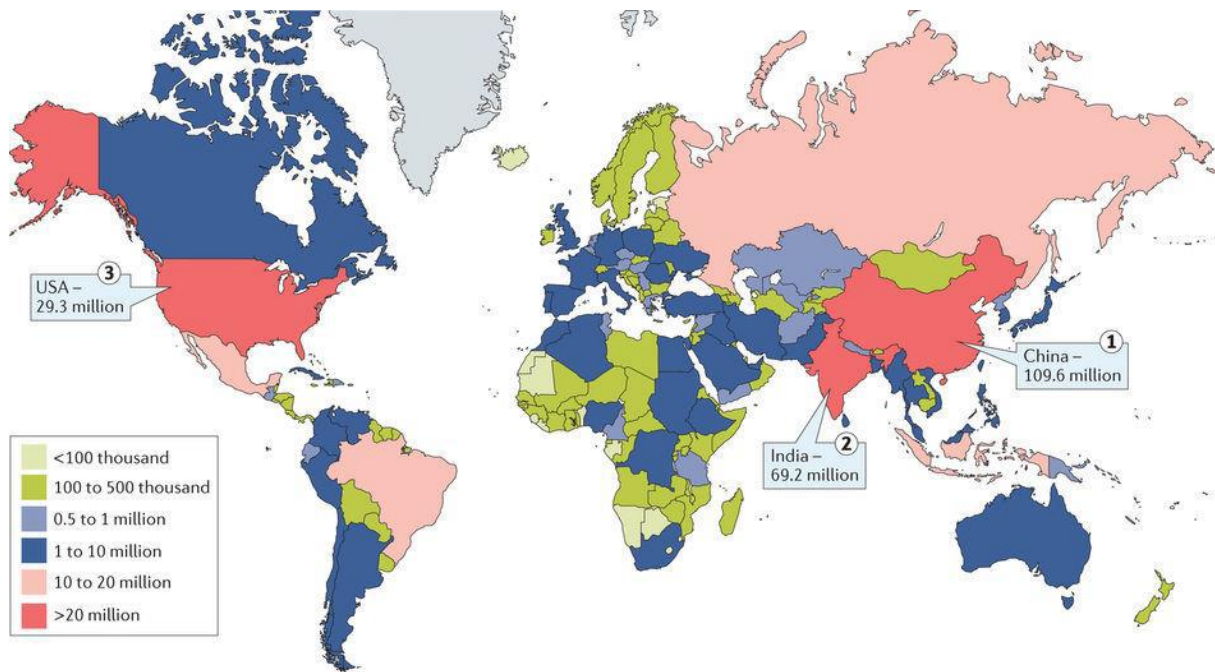
5. Egyéb
- C. Az exokrin hasnyálmirigy betegségei
1. Hasnyálmirigy-gyulladás
 2. Trauma/hasnyálmirigy eltávolítás
 3. Tumor
 4. Cisztikus fibrózis
 5. Hemokromatózis
 6. Fibrokalkulózus hasnyálmirigy elégtelenség
 7. Egyéb
- D. Hormonális rendellenességek
1. Akromegália
 2. Cushing szindróma
 3. Glukagonóma
 4. Feokromocitóma
 5. Hipertiroidizmus
 6. Szomatosztatinóma
 7. Aldoszteronóma
 8. Egyéb
- E. Gyógyszer vagy vegyszer okozta
1. Vakor
 2. Pentamidin
 3. Nikotinsav
 4. Glükokortikoidok
 5. Pajzsmirigyhormon
 6. Diazoxid
 7. β -adrenerg agonisták
 8. Tiazidok
 9. Dilantin
 10. γ -Interferon
 11. Egyéb
- F. Fertőzések
1. Kongenitális rubeola
 2. Citomegalovírus
 3. Egyéb

- G. Ritka immunmediált formák
 - 1. “Stiff-man” szindróma
 - 2. Anti-inzulin receptor antitestek
 - 3. Egyéb
- H. Egyéb diabéteszrel járó genetikai szindrómák
 - 1. Down szindróma
 - 2. Klinefelter szindróma
 - 3. Turner szindróma
 - 4. Wolfram szindróma
 - 5. Friedreich ataxia
 - 6. Huntington chorea
 - 7. Laurence-Moon-Biedl szindróma
 - 8. Miotóniás disztrófia
 - 9. Porfiria
 - 10. Prader-Willi szindróma
 - 11. Egyéb

IV. Gesztációs diabétesz mellitusz

3.1.2. A diabétesz mellitusz prevalenciája

A diabétesz prevalenciája folyamatosan nő, melynek legfőbb oka a fejlett országok lakóira jellemző elhízás és fizikai inaktivitás. [44]. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség 2015-ös jelentése szerint, világszerte 415 millió embert érint a betegség, ami azt jelenti, hogy minden 11 felnőtt (20-79 év közötti) emberből 1 cukorbeteg, illetve ez a szám várhatóan 642 millióra emelkedik 2040-re [45] (2. ábra). A növekvő gyakoriságnak számos oka van, mint például az öregedő társadalmak, a gazdasági fejlődés, egészségtelen étkezési szokások, elhízás és mozgásszegény életmód [46].



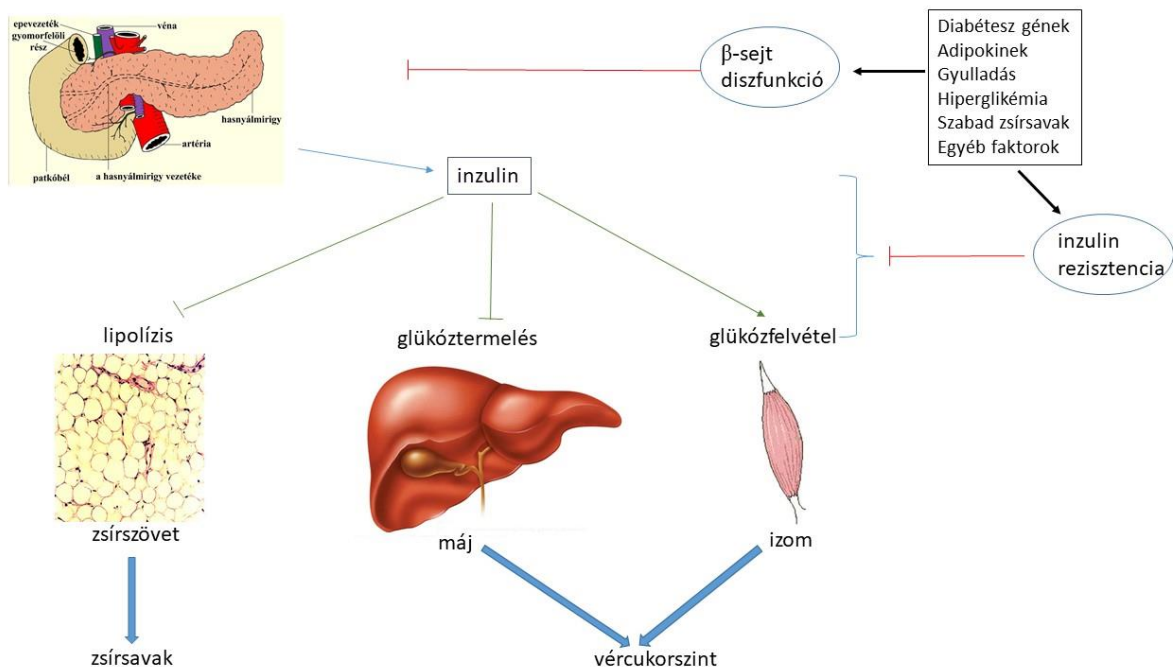
Nature Reviews | Endocrinology

1. ábra. A diabétesz mellituszban szenvedő betegek becsült száma világszerte [46].

3.1.3. A diabétesz mellitus patogeneze

Normális körülmények között az inzulin (a glukagonnal együtt) felelős a vércukorszint szabályozásáért, a normoglikémia fenntartásáért. Az étkezések utáni időszakban az emelkedett vércukorszint hatására termelődő inzulin gátolja a hepatikus glükoneogenezist, illetve glikolízist, amit a glukagon serkentene éhezés állapotában, viszont fokozza az inzulindependens szövetek (pl.: harántcsíktolt izomszövet, agy) cukorfelvételét. Molekuláris szinten ez egyrészt a májban glükoneogenetikus enzimek transzkripciójának gátlását, az izomban pedig glükóz transzporter (GLUT)4 transzporterek fokozott expresszióját jelenti [47]. Ezzel párhuzamosan az inzulin a lipolízist is gátolja, a hormonszenzitív lipáz aktivitásának csökkentésén keresztül, melynek következtében a plazma szabad zsírsav koncentrációja csökken [48]. Mindkét hormont a hasnyálmirigy sejtjei termelik, melyek képesek alkalmazkodni a hormonhatás változásaihoz, tehát, ha csökken az inzulin hatása, fokozódik a szekréciója, és viszont. Mindazonáltal, ha megváltozik ez a kapcsolat, a szövetek csökkent glükóztoleranciája vagy a β -sejtek diszfunkciója miatt, akkor felborulhat az egyensúly [49]. Amennyiben az inzulinfunkció csökken (mint pl.: elhízás során), úgy a β -sejtek próbálnak kompenzálni, és több inzulint termelnek. A kompenzációs hiperinzulinémia progrediálása során, a β -sejtek egy idő után kimerülnek, és képtelenek lesznek fenntartani az emelkedett inzulintermelést [50], ezért a vércukorszint valamelyest emelkedik, ami bár kezdetben kis

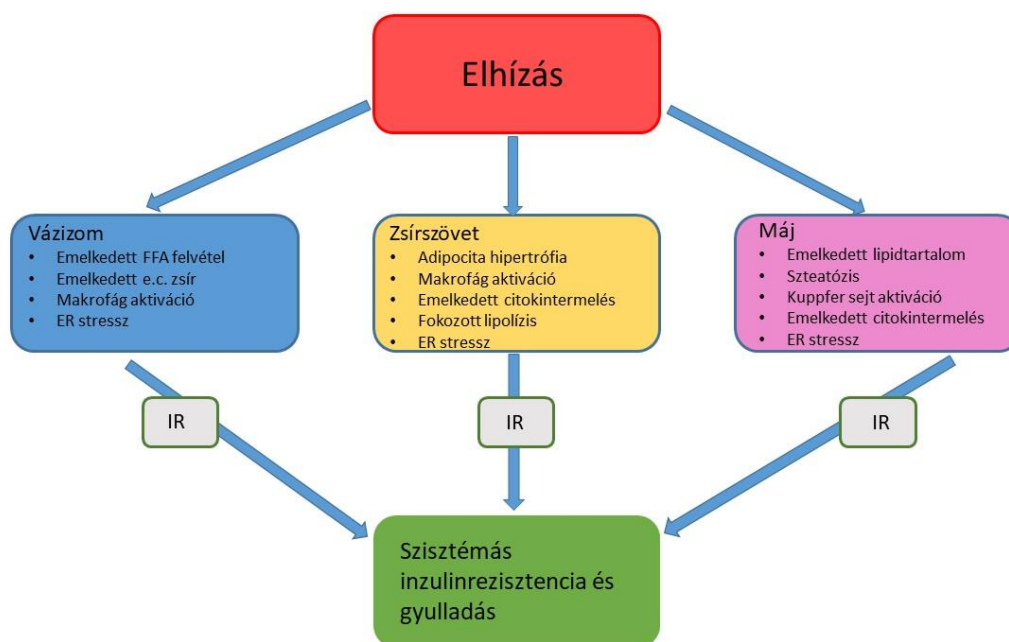
menyiségnek tűnik, komoly problémákat okozhat (glükóz toxicitás), ami direkt módon a β -sejtek károsodását is előidézhetheti [51]. Az inzulintermelés csökkenése, valamint az emelkedett hepatikus glükózprodukción végül éhomi hiperglikémiához vezet. Inzulinrezisztenciáról akkor beszélünk, amikor az inzulin aktivitása kevés ahhoz, hogy képes legyen egyszerre serkenteni az izomba történő glükózfelvételt, illetve gátolni a máj általi glükóztermelést. Az inzulin dózishatás görbéje jobbra tolódik, és csökken a maximálisan kiváltható válasz nagysága is, ami az inzulinfüggő szervek csökkent glükózfelhasználását (a normális állapot 30-60%-ának felel meg), valamint a máj fokozott glükóztermelését vonja maga után, mely hatások együttesen eredményezik a hiperglikémiát. Ez az állapot számos tényező miatt kialakulhat (3. ábra) [51].



2. ábra. A 2-es típusú diabétesz mellitusz patogenezise. Az ábrán számos ok látható, melyek hozzájárulnak a T2DM kialakulásához, és melyek mind az inzulin szekréciót, mind pedig annak hatását képesek befolyásolni. A csökkent inzulintermelés a hormon hatását is csökkenti a célszerveken, mely rezisztencia emelkedett vércukor-, és zsírsavértékeket eredményez. Illetve az emelkedett cukor-, és zsírsavkoncentráció tovább rontja mind az inzulin termelődését, mind pedig az inzulinrezisztenciát.

A T2DM kialakulásában jelentős szerepe van az elhízásnak. Az adipociták fokozott mennyiségű szabad zsírsavat és különböző biológiai vegyületeket (pl.: rezisztint, TNF- α -t, IL-6-t és különböző adipokineket) bocsátanak a keringésbe, melyek károsítják az inzulin szignalizációt [50]. A plazma emelkedett zsírsavkoncentrációja emeli a vázizmok acetyl-CoA és diacylglycerol tartalmát, amik fokozzák a protein kináz C téta (PKC θ) aktivitását. A PKC θ

foszforilálja az IRS-t, aminek ezáltal csökken az aktivitása, így csökken az általa mediált glükóztranszporter transzkripciója, tehát az izmok glükózfelhasználása [52]. Az elhízás szisztémás gyulladás kialakulásához is vezet, mivel az adipociták fokozatos növekedésével és hiperpláziájával csökken az oxigénellátásuk, ami a celluláris stresszválasz, autonóm gyulladás és gyulladásos citokinek felszabadulását eredményezi. Ezenkívül a zsírszövet által termelt rezisztin, leptin és adipokin is képes a gyulladásos folyamat beindítására és fokozására. A gyulladásos citokinek, illetve makrofágok közvetlenül fokozhatják az inzulinrezisztenciát a májban és izomszövetekben, valamint szekunder módon képesek károsítani a hasnyálmirigy β -sejtjeit, ezáltal az inzulintermelést [47, 53] (3. ábra).



3.ábra. Az ábra szemlélteti az elhízás következtében létrejövő metabolikus és gyulladásos válaszokat, melyek együttesen hozzájárulnak az inzulinrezisztencia kialakulásáért.

3.1.4. A diabétesz mellitusz jelenlegi terápiája

Az elsődlegesen választandó terápiás szer a mai napig a metformin, amennyiben nincs specifikus kontraindikáció vele szemben. Hatékonyan csökkenti a máj glükóztermelését, a gasztrointesztinális glükózabszorpciót, javítja a perifériás szövetek inzulinérzékenységét, serkenti a GLP-1 szekréciót, és csökkenti a HbA_{1c} szintjét akár 1-2%-kal [54].

	Patofiziológiai defektus	Glükózcsökkentő terápia	
		Létező	Jövő (1-3. fázisú klinikai kutatás)
Hasnyálmirigy β -sejt	Sejttömeg - és funkcióvesztés, károsodott inzulinszekréció	Szulfonilureák, meglitinidek	Imeglimin
Hasnyálmirigy α -sejt	Diszregulált glukagon szekréció, emelkedett glukagon koncentráció	GLP-1 receptor agonisták	Glukagon-receptor antagonisták
Inkretin	Eltűnt inkretin válasz	GLP-1 receptor agonisták; DPP-IV inhibitorok	Orális GLP-1 receptor agonisták; heti egyszer DPP-IV inhibitorok
Gyulladás	Immun diszreguláció	GLP-1 receptor agonisták; DPP-IV inhibitorok	Immun modulátorok; gyulladásgátló szerek
Máj	Emelkedett hepatikus glükóztermelés	Metformin; pioglitazon	Glukagon receptor antagonisták
Izom	Csökkent perifériás glükózfelvétel, inzulinrezisztencia	Metformin; pioglitazon	Szelektív PPAR modulátorok
Zsírszövet	Csökkent perifériás glükózfelvétel, inzulinrezisztencia	Metformin; pioglitazon	Szelektív PPAR modulátorok; FGF21 analógok; zsírsav receptor agonisták
Vese	SGLT-2 receptorok fokozott kifejeződése miatt emelkedett glükózreabszorpció	SGLT-2 inhibitorok	Kombinált SGLT-1/-2 inhibitorok
Agy	Fokozott étvágy, csökkent teltségérzet	GLP-1 receptor agonisták	GLP-1-glukagon-gasztrikus inhibitoros peptid kettős vagy hármas agonisták
Gyomor vagy belek	Gyorsult glükózabszorpció	GLP-1 receptor agonisták; DPP-IV inhibitorok; alfa-glükozidáz inhibitorok; pramlintid	SGLT-1 inhibitorok
Colon (bélflóra)	Abnormális bélflóra	Metformin; GLP-1 receptor agonisták; DPP-IV inhibitorok	Probiotikumok

2. táblázat. A DM jelenlegi gyógyszeres terápiai lehetőségei, valamint a jövőbeli, klinikai vizsgálat alatt álló új hatóanyagok listája. GLP-1=glukagon-szerű peptid-1; DPP-IV inhibitorok=dipeptidil peptidáz IV inhibitorok; GIP=gasztrikus inhibitoros peptid; SGLT-1/SGLT-2 inhibitorok=nátrium-glükóz ko-transzporter-1/nátrium-glükóz ko-transzporter-2 inhibitorok; PPAR=peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor; FGF21=fibroblaszt növekedési faktor 21 [51].

A metformin mellékhatásai közé tartozik a laktátacidozis, de ennek rizikója graduális adagolással csökkenthető [55], ezenkívül B12 vitaminhiány fordulhat elő, illetve közepes vagy

súlyos állapotú krónikus veseelégtelen betegeknél (eGFR <30 mL/min/1.73 m²) ellenjavallt a gyógyszer alkalmazása [56].

A szulfonilureák, mint a gliklazid és glimepirid a β -sejteken fejtik ki hatásukat, növelve az inzulinszekrúciót, és gyakran a duális terápiához elsőként választandók magas hatékonyságuk és alacsony költségük miatt, bár jellemző rájuk a hipoglikemizáló hatás, súlygyarapodás, és emelkedett kardiovaszkuláris rizikó, amelyek miatt kevésbé közkedveltek [57, 58].

A tiazolidindionok, más néven PPAR- γ receptor aktivátorok (rozigitazon, pioglitazon) a perifériás szervek inzulinérzékenységét fokozzák, és 1%-kal csökkentik a HbA_{1c} mennyiségét. Alkalmazásuk ennek ellenére ellentmondásos, mivel az első képviselőt (troglitazon) kivonták a forgalomból májtoxikus hatása miatt [59], a rozigitazonról kiderült, hogy káros kardiovaszkuláris mellékhatásai lehetnek [60], a pioglitazont pedig összefüggésbe hozták csonttörésekkel [61], valamint hólyag- és prosztatákarcinómával [62].

Az inkretineket befolyásoló szerek csoportjába tartoznak a szubkután adható GLP-1 agonisták és az orális DPP-4 gátló szerek. A GLP-1 agonisták GLP-szerű hatással rendelkeznek, ami emelkedett inzulinszekrúciót, csökkent glukagontermelést, csökkent hepatikus glükózkibocsátást, lassabb gyomorürülést és fokozott teltségérzetet jelent [63]. Vannak hosszú hatástartamú (dulaglutide, albiglutide, liraglutide) és rövid hatástartamú szerek. Általánosan igaz, hogy a HbA_{1c}-t 1%-kal, a testsúlyt pedig 4 kg-mal képesek csökkenteni, hipoglikemizáló hatásuk nem jelentős (kivéve, ha kombinációban alkalmazzuk metforminnal vagy szulfonilureákkal) [63], legfontosabb mellékhatásuk pedig a hányinger, illetve hányás. A GLP-1-nek számos jótékony hatása van a β -sejtekre és a testre, mint pl.: antiapoptotikus és proliferatív hatás a β -sejtekre, csökkent étvágy, lassabb tápanyagfelszívódás a lassabb gyomorürülésnek köszönhetően, valamint lehetséges endotélvédő hatás [64], ezáltal a legígéretesebb gyógyszercsoport a diabéteszes patofiziológia helyreállításában. A DPP-IV inhibitorok (sitagliptin, saxagliptin, linagliptin, vildagliptin, alogliptin) pedig potenciózzák a GLP-1 analógok hatását, gátolva azok lebomlását, és biztonságosan adhatók közép- vagy akár súlyos veseelégtelenségben is [63].

Az SGLT-2 gátlók (dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin) a legújabb terápiás csoportot képezik. Ezek a szerek a vese proximális tubulusaiban gátolják a glükóz reabszorpcióját [65], ezáltal fokozzák a renális kiürülést. Hatékonyan csökkentik a HbA_{1c}-t [66] és a testsúlyt ([67]). Legfontosabb mellékhatásuk a húgyúti fertőzések, melyek a vizelet magasabb cukortartalmának köszönhetőek, és különösen a nőknél fordulnak elő gyakran [68].

Az inzulindeficiens betegek esetében, akiknél a 2-es típusú diabétesz kevésbé jól kontrollált, szükséges lehet az inzulinterápia, mely rövid ideig alkalmazva stabilizálhatja a betegséget a korai szakaszban, csökkentve a glükotoxicitást, és megőrizve a β -sejtek funkcióját [69]. A 4-T tanulmány (Treating To Target Type 2 Diabetes) szerint a leghatékonyabb, ha bazális inzulinterápiát alkalmazunk orális, illetve szubkután adandó készítményekkel kombinálva. A prandiális, rövid hatású inzulin is hasonló hatékonyságú lehet, de ebben az esetben nagyobb a hipoglikémia veszélye [70].

3.2. A melanokortin rendszer

Az emlős melanokortin rendszer olyan hipotalamikus neuronokból áll, melyek Neuropeptid Y-t (NPY) és Agoutihoz kapcsolt peptidet (AgRP) expresszálnak, főként a hipotalamusz nucleus arcuatus területén; olyan ARC neuronokból, melyek Pro-opiomelanokortint (POMC) expresszálnak; agytörzsi POMC neuronokból a nucleus tractus solitarius területén; a POMC és AgRP neuronok célsejtjeiből; endogén agonistákból (POMC-származék peptidek); antagonistákból (agouti peptid és AgRP); 5 MCR altípusból és MRAP-kból áll [71].

3.2.1. POMC-származék peptidek

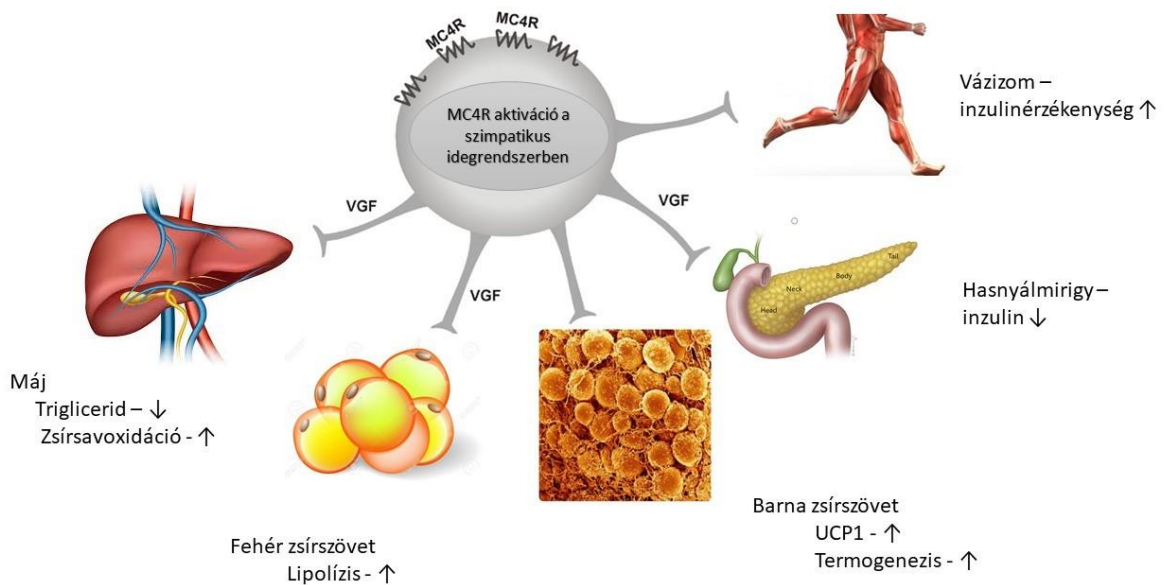
A POMC-származék peptideket a hypothalamus nucleus arcuatus neuronjai, a nucleus tractus solitarius neuronok, az agyalapi mirigy elülső és köztes lebenyei, a bőr keratinocitái és számos perifériás szerv, mint például a reproduktív szervek termelik [72, 73]. A legtöbb tudásunk az agyalapi mirigy által termelt peptidekről van. Az elülső lebeny által szekretált fő peptid az ACTH, míg a köztes lebeny által termelt fő peptid az α -MSH [74]. A melanokortin fehérjék tápanyagbevétel befolyásoló hatását először 1986-ban írták le [75], és azóta számos kutatás igazolta, hogy az intracerebrálisan alkalmazott, természetesen is előforduló ACTH, α -MSH és β -MSH csökkenti a táplálékfelvétel mértékét [76, 77]. A melanokortin fehérjék perifériás funkcióit eddig kevésbé tanulmányozták, annak ellenére, hogy ismeretes az MCR-k nagymértékű perifériás jelenléte (3. táblázat) [71]. A MCR-k G-proteinhez kapcsolt receptorok, melyeket a POMC-ból származó peptidek képesek aktiválni ([78]), amely aktiváció emelkedett adenilát cikláz aktivitást, ezáltal fokozott intracelluláris cAMP termelést és PKA aktivitást eredményez. 5 féle melanokortin receptor különíthető el, melyek mind más-más funkcióval rendelkeznek. Az MC1R elsősorban a pigmentáció szabályozásáért, valamint a fehér zsírs sejtek

szaporodásának regulációjáért felelős [79], az MC2R a glükokortikoid szintézis szabályzásában játszik szerepet, valamint a lipolízist serkenti [80, 81], az MC3R és MC4R az energia homeosztázisban, az MC5R pedig a külső elválasztású mirigyek működésében fontos [78]. Sőt, bebizonyosodott, hogy az MCR-k rendelkeznek gyulladás gátló hatással is (MC1R és MC3R) [82], illetve szerepük van a barna zsírszövet általi termogenezis szabályozásában (MC2R és MC5R) [83]. A receptorok közül az MC3R-ról, MC4R-ról és MC5R-ról mutatták ki, hogy rendelkezik bizonyos affinitással az α -MSH-hoz [84].

MC1-R	Melanociták, melanoma, makrofágok, zsírszövet
MC2-R	Mellékvesekéreg, zsírszövet
MC3-R	Agy, placenta, duodenum, hasnyálmirigy, gyomor
MC4-R	Agy, gerincvelő, izom, szimpatikus idegrendszer
MC5-R	Agy, bőr, mellékvesekéreg, csecsemőmirigy, herék, ovárium, izom, zsírszövet

3.táblázat: A melanokortin receptorok kifejeződése különböző szervekben [84].

A melanokortin rendszer centrális metabolikus hatásaiért az MC3R és MC4R felelős, mely receptorok mutációja súlyos elhízást eredményez [85]. Az MC4R-nak szerepe van az energiafelhasználás szabályozásában. Kimutatták, hogy az egyforma mennyiségű táplálékkal ellátott *Mc4r* génhíányos egerek jóval kövérebbek, mint a vad típusú társaik, a csökkent energiafelhasználás következtében [86], illetve, hogy az agykamrába injektált nem-szelektív MCR agonista csak olyan egerekben növeli az energiafelhasználást, akik funkcionális MC4R-ral rendelkeznek [87]. Az a felfedezés, hogy az MC4R az intermediolaterális sejtoszlop neuronjain is megtalálható, aminek patkányokban projekciói vannak a barna zsírszövetet beidegző posztganglionáris neuronokhoz, indította el azt a gondolatmenetet, hogy a szimpatikus idegrendszer befolyásolja az energiafelhasználást [88]. Az MC4R által aktivált szimpatikus neuronokból endokrin szekretoros peptid szabadul fel. A *Vgf* gén, illetve a VGF-származék peptid (TLQP-21) azonosítása pedig arra enged következtetni, hogy az MC4R-nak a metabolizmus perifériás szabályozásában is szerepe van (4. ábra). A melanokortinok által szabályozott szimpatikus aktivitás növeli a vázizmok izulinérzékenységét, csökkenti a hasnyálmirigy inzulintermelését, fokozza a barna zsírszövet energiatermelését és a fehér zsírszövet lipolízisét, valamint csökkenti a máj trigliceridtermelését, és növeli a hepatikus zsírsavoxidációt. [29].



4. ábra. Az MC4R energia homeosztázisra kifejtett hatásai a szimpatikus idegrendszeren keresztül.

Az MC3R szerepe kevésbé egyértelmű. Kutatások szerint részt vesz a táplálkozás cirkadián ritmusának beállításában, illetve fokozza az MC4R-ral együtt a fizikai aktivitást, ezáltal a vázizmok zsírsvoxidációját [89]. Ezenkívül szerepe van a perifériás inzulinszekréció regulációjában [90], valamint az elhízáshoz társuló mezenterikus gyulladásra adott érválaszban, gyulladáscsökkentő hatású [91].

Egy friss tanulmány pedig az étkezés után megemelkedő α -MSH MC5R-n keresztül, a glükózhomeosztázisban betöltött szerepére világított rá [92]. A kísérletek igazolták, hogy sovány egerekben az étkezés utáni vércukorszint emelkedéssel párhuzamosan nő az α -MSH plazmakoncentrációja; így az α -MSH javítja a glükóztoleranciát GTT során, a soleus és gastrocnemius izmok cukorfelvételeinek fokozása révén, melyet a centrális MC3R és MC4R blokkolása nem befolyásol; illetve, ez a jelenség valószínűsíthetően az MC5R-nak köszönhető, mivel MC5R KO egerekben vagy MC5R szelektív antagonistá vegyület alkalmazása mellett nem figyelhető meg. A lehetséges molekuláris háttér az MC5R általi cAMP szintemelkedés, ezáltal a PKA enzim fokozott aktivitása, aminek eredményeképpen több GLUT12 expresszálódik az izomsejtek membránjában, ezáltal nő a glükózfelvételük. Azt is kimutatták, hogy elhízott állatokban az α -MSH kezelés nem éri el ugyanezt a hatást, illetve, hogy ezen állatokban magas a PDE aktivitása, mely elbontja a cAMP-t [93]. A kísérletben a PDE-gátló teofillin alkalmazása mellett az α -MSH kezelés képes volt ugyanazt a hatást produkálni, mint sovány állatokban.

A fenti adatok alátámasztják, hogy a melanokortin rendszernek mind centrálisan, mind perifériásan nagy szerepe van az energia-homeosztázis, illetve metabolikus egyensúly fenntartásában.

3.2.2. Az α -MSH iszkémia/reperfúzióban betöltött szerepe

Az iszkémia/reperfúziós sérülés és a következményes szöveti károsodás számos patológiás állapotban jelentős rontó tényezők. Ilyen például a diabéteszes retinopátia [94], a retinális érelzáródás [95] vagy a szív [96] - és agyinfarktus [97]. Az elmúlt 3 évtized kutatásai bizonyították, hogy a reperfúzió, azaz a véráramlás, oxigén és tápanyag visszajutása a korábban iszkémiás területre, hirtelen metabolikus, morfológiai, elektrofiziológiai, és funkcionális károsodásokat idézhet elő [98]. Az iszkémia/reperfúzió (I/R) indukált miokardiumkárosodás háttérmechanizmusai nem teljesen tisztázottak, de valószínűsíthető, hogy több különböző zavar együttes eredménye, mint pl.: az α és β receptorok [99], ionok [100], zsírsavak és foszfolipidek [101], szabadgyökök [102], különböző génregulációk [103] és apoptotikus jelek [104]. Korábbi kutatások igazolták az α -MSH gyulladáscsökkentő hatását, valamint, hogy képes enyhíteni különböző szervek, mint a vese [105], a gasztrointesztinális traktus [106], valamint az agy [107] I/R által okozott károsodását. Ennek a tanulmánynak a szerzői bebizonyították, hogy az α -MSH-nak szerepe van a retinális [27] és miokardiális [38] károsodások kivédésében is.

A háttérben zajló molekuláris mechanizmust illetően többféle álláspont létezik. Chiao H. és munkatársai a renális I/R elleni védekezésben az α -MSH gyulladásellenes hatását találták legfontosabbnak. Kimutatták, hogy az α -MSH csökkenti az I/R-t szenvedett területre érkező neutrofil granulociták számát, a kemokinszintézis csökkentése révén; mérsékli az adhézióhoz szükséges ICAM-1 molekula termelődését; valamint az NO szintetáz enzim indukcióját, ezáltal a vese fehérjéinek nitrációját [105]. Zou L. és munkatársai szintén az α -MSH gyulladáscsökkentő hatását hangsúlyozták. Gasztrointesztinális I/R-t vizsgáló kísérleteikben rávilágítottak arra, hogy az α -MSH csökkenti a mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitását, az NF κ B DNS-kötő képességét, ezáltal gyulladást mediáló faktorok termelődését, kimondottan az IL-6 fehérje expresszióját, illetve jelentősen növelte a hemoxigenáz-1 enzim szintjét, melyről ismeretes sejtvédő, antiapoptotikus és antioxidáns hatása [106]. Forslin Aronsson S. és munkatársai által végzett agyi I/R-s kísérletben igazolható volt, hogy az α -MSH gátolja az I/R által okozott neuronpusztulást, valamint az asztrocitaszaporulatot – és aktivációt [107]. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai pedig azt támasztották alá, hogy az α -MSH jelentős

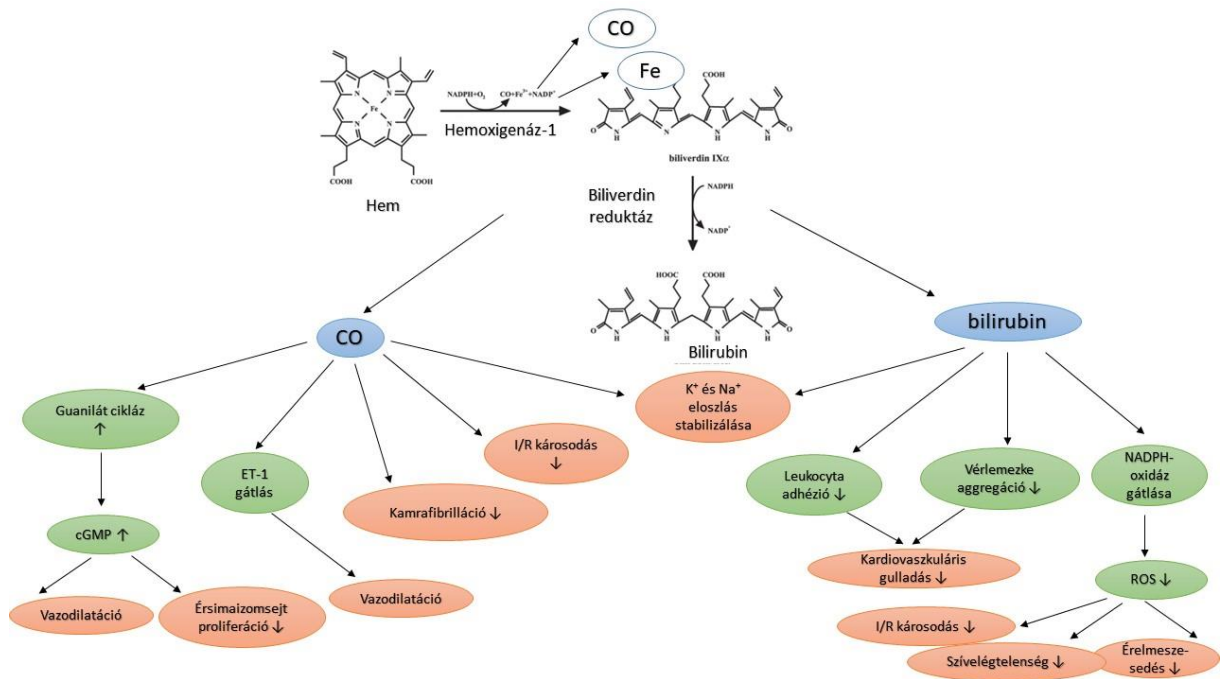
potenciállal bír a miokardiális és retinális I/R-s károsodások kivédésében. A miokardium I/R utáni állapotának javulására a koronáriaáramlás, aortaáramlás, bal kamrai nyomás növekedéséből, az infarktus területének csökkenéséből, valamint a reperfüzió-indukált kamrafibrilláció előfordulási gyakoriságának mérséklődéséből következtek a kutatók. A legjelentősebb háttérmechanizmusként az α -MSH által serkentett kortikoszteron termelést, illetve a kortikoszteron-indukált fehérje expressziót, és következményes gyulladáscsökkenést jelölték meg [38]. A retinában ERG-vel, szövettannal, molekuláris biológiai vizsgálattal (Western Blot) és enzimaktivitás méréssel volt igazolható, hogy az α -MSH dóziszfüggő módon javítja a retinális 'b' hullámok amplitúdóját, valamint csökkenti a retinális ödémát és mitokondriális károsodást. A megfigyelt hatásokat a szerzők részben az α -MSH által fokozott HO-1 aktivitásnak tulajdonították, mely aktivitásnövekedéssel párhuzamosan javult a retinafunkció, illetve szelektív HO-1-gátló molekula (SnPP) alkalmazás hatására a várt javulás elmaradt [27].

3.3. A hemoxigenáz rendszer

Számos patológias folyamat jellemzője a diszregulált gyulladáshoz vezető válasz, melyek esetében a reaktív oxigéntartalmú molekulák súlyos szisztémás vagy lokális szövetkárosodást eredményezhetnek. Ez, az úgynevezett „oxidatív stressz” több különböző behatás nyomán alakulhat ki, mint pl.: betegségek, mechanikai vagy hőhatás, sugárzás vagy különböző mérgező anyagok. Amennyiben megoldatlan marad, ezek az oxigéntartalmú molekulák reakcióba lépnek a sejtekkel, károsítják a funkciójukat vagy esetleg megölik őket [108]. Az oxidatív stressz megelőzése és terápiás megoldása elsősorban úgynevezett antioxidánsokon alapul, melyek képesek semlegesíteni a reaktív oxigénradikálokat. Mindazonáltal, a kívülről bevitt antioxidáns vegyületek főként a szövetközi térben halmozódnak fel, ezáltal kevésbé hatékonyak, mint az endogén módon termelődő, fiziológiásan is megtalálható saját antioxidáns vegyületeink. Ezek viszont gyakorta néznek szembe nehézségekkel, mivel egyre több olyan külső hatás éri a szervezetet, aminek köszönhetően a reaktív oxigénmolekulák száma rendkívül gyorsan nő. Így a jelen antioxidánsokkal kapcsolatos kutatások fő célja, hogy a szervezetben megtalálható endogén vegyületek hatékonyságát növelni tudjuk [33]. Egy ilyen endogén védekező rendszer a hemoxigenáz rendszer, mely három enzimből áll (HO-1, HO-2 és HO-3), és mely formák közül a kutatások legfőbb célpontja a stressz által (pl. iszkémia, reperfüzió, hőhatás, bakteriális lipopoliszacharid jelenléte) indukálható, testszerte megtalálható 1-es forma [109]. A HO-2 állandóan aktív, és a központi idegrendszerben fordul elő nagyobb

menyiségben [110]. A 3-as forma jelentősége még nem teljesen tisztázott. A HO-1 szignifikáns mértékben képes csökkenteni az oxidatív stresszt, ezáltal enyhíteni a következményes szövetkárosodást. A HO-1 felelős a vörösvértest pusztulás következtében felhalmozódó hem degradációjáért. A metabolizmus két végterméke – szénmonoxid (CO) és bilirubin – potenciális ellensúlyozó hatással bír az oxidatív stressz, illetve annak következményeivel szemben az idegrendszer, kardiovaszkuláris rendszer, vese és tüdő területén [33]. Jelen kutatás szempontjából a kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásai a legfontosabbak, melyeket az 5. ábra szemléltet. A CO által serkentett guanilát cikláz működés fokozza a cGMP termelődést, ezáltal vazodilatációt eredményez, valamint csökkenti az érsimaiom proliferációt, így javítja a koronáriaáramlást, és csökkenti a perifériás érellenállást. Ezentúl megfigyelték, hogy a CO csökkenti az I/R során kialakuló kamrafibrillációk gyakoriságát, mely hatás SnPP adásával felfüggeszthető [111]. Mind a CO, mind a HO-1 stabilizálja a Na⁺ és K⁺ eloszlást, ezáltal az érsejtek membráningerlékenységét [112]. A bilirubin csökkenti a fehérvérsejtek és vérlemezkék aggregációját, valamint a NADPH oxidáz aktivitását, ezáltal szerepe van a kardiovaszkuláris gyulladás és I/R károsodás mérséklésében [113, 114].

Kutatócsoportunk 2011-ben rávilágított arra, hogy a HO-1-nek fontos szerepe lehet az iszkémia utáni kardiális felépülésben. HO-1 transzgenikus és nem transzgenikus egerekből izolált szíveket vetettek alá iszkémia/reperfúziós állapotnak. Szignifikáns helyreállást tapasztaltak a transzgenikus egerek szívének koronáriaáramlásában, aortaáramlásában és aortanyomásában, valamint az infarktus méretének és kamrafibrillációk gyakoriságának jelentős csökkenését a nem transzgenikus egerek szívének értékeihez képest, mely javulás SnPP egyidejű adására eltűnt. A transzgenikus egerekből származó szívekben emelkedett CO-termelést, csökkent szöveti Na⁺ - és Ca⁺ - felhalmozódást, valamint csökkent K⁺ - veszteséget figyeltek meg [36].



5. ábra. A HO-1 kardiovaszkuláris védőhatásai.

Mіндеzen eredmények fényében, illetve az α -MSH ismert HO-1 indukáló hatásából kiindulva kísérletsorozatunk kezdetén azt a feltételezést tettük, hogy az α -MSH kezelés által fokozott HO-1 aktivitásnak és következményes celluláris folyamatoknak szerepe lehet a diabéteszben gyakran előforduló I/R-s szövődmény által okozott kardiovaszkuláris károsodások megelőzésében, illetve kezelésében, mely hatások humán vonatkozásban is potenciális terápiás lehetőséget rejthetnek. Jelen tanulmány írásakor az α -MSH ezirányú kardiovaszkuláris hatásait diabétesz állatmodellben még nem vizsgálták.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Kutatásunk első fázisában hím, 300-350 g súlyú Sprague-Dawley patkányokat, második fázisában pedig hím, 300-350 g súlyú (10 hetes, n=12) Zucker Diabetic Fat (ZDF-Leprfa) patkányokat (Charles River International, Inc, Wilmington, MA) vizsgáltunk. Az állatokat szobahőmérsékleten (20-24°C), váltakozó fényviszonyok (12-12 h világos, illetve sötét periódus) mellett tartottuk. A Sprague-Dawley patkányokat normál rágcsáló táppal, míg a ZDF állatokat speciális, Purina 5008, táppal (LabDiet, St. Louis, MO, USA) etettük. Mindkét faj tetszőleges mennyiségű (ad libitum) tápot ill. vizet fogyaszthatott.

4.2. Etikai irányelvek

A kísérleti állatok humánus bánásmódban részesültek, az Európai Unió 2010/63/EU rendeletének „Laboratóriumi Állatok Ellátásának Alapelvei” szerint, megfelelően az Orvosi Kutatások Nemzeti Társaságának, valamint a Laboratóriumi Állatok Ellátásáról és Használatáról szóló Iránymutatásnak, amit a Nemzeti Tudományos Akadémia szerkesztett, és a Nemzeti Egészségügyi Szervezet publikált (NIH Publikációs No. 86-23, javított 1985-ben). Az összes általunk használt protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága vette nyilvántartásba (DE MÁB 45/2001 és DE MÁB 35/2007) és a Hajdú-Bihar Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás, valamint a Hajdú-Bihar Megyei Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyezte. A kísérletek kezdete előtt 4 hetes adaptációs periódust biztosítottunk az állatok számára.

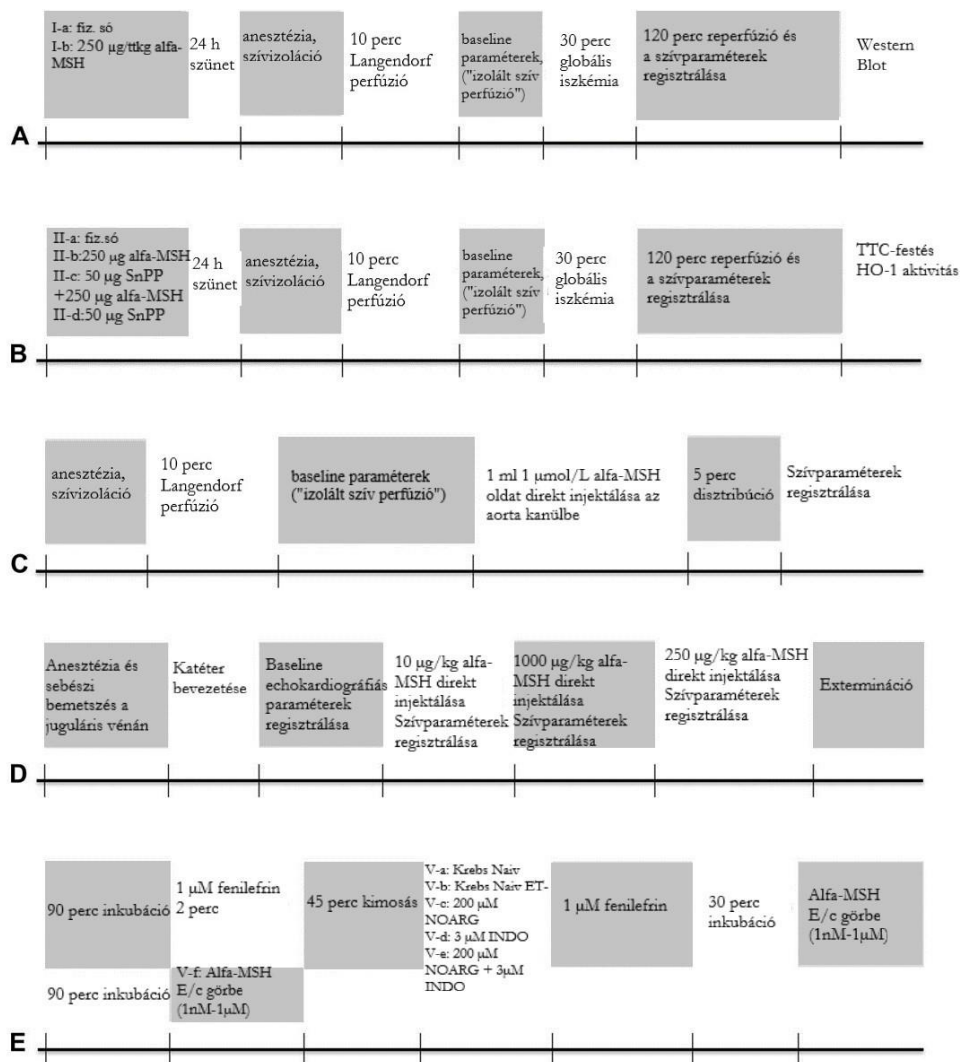
4.3. Kísérleti elrendezés

4.3.1. Első kísérleti elrendezés

Az α -MSH hatásának felderítésére alkalmazott kísérleti stratégiákat a 6. ábra összegzi. Ebben a tanulmányban 5 alapprotokollt dolgoztunk ki.

- I. α -MSH előkezelés hatásának vizsgálata a kardiális HO-1 expresszióra iszkémia/reperfúziós sérülés esetén.

16 egészséges, 300-330 g súlyú, hím Sprague Dawley patkányt 2 csoportra osztottunk (n=8/csoport). Az I-a csoport tagjai 0,5 ml fiziológiás sóoldatot kaptak szubkután, 24 órával az izolált szívmodell kivitelezése előtt (lásd az Izolált „dolgozó szív” c. részt), az I-b csoport állatai 250 µg/ttkg α-MSH oldatot (fiziológiás sóoldatban oldva) kaptak szubkután, 24 órával az izolált szívmodell elvégzése előtt. Az izolált „dolgozó szív” modell kivitelezése során az állatok szívét iszkémia/reperfúzióknak tettük ki (lásd a Globális iszkémia és reperfúzió indukálása izolált „dolgozó szíven” c. részt). A miokardiumból származó mintákat folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk a további Western Blot analízisig (6A ábra).



6. ábra. Kísérleti terv az első fázishoz. A kutatás különböző részeit az alábbi protokollok alapján végeztük. A, I. protokoll: α-MSH előkezelés hatásának vizsgálata a kardiális HO-1 expresszióra iszkémia/reperfúziós sérülés estén. B, II. protokoll: A HO-1 útvonal jelentőségének felderítése az α-MSH kardioprotektív hatásaiban. C, III. protokoll: Az α-MSH direkt kardiális hatásainak megbecsülése izolált „dolgozó szív” modellen. D, IV. protokoll: Az α-MSH echokardiográfiával mérhető szívfunkciókra kifejtett direkt hatásainak analízise. E, V. protokoll: Izolált aorta gyűrűk α-MSH adminisztrációra adott vaszkuláris válaszainak vizsgálata.

II. A HO-1 útvonal jelentőségének felderítése az α -MSH kardioprotektív hatásaiban

A II. protokoll szerint (6B ábra), egy másik Sprague Dawley patkánypopulációt alkalmaztunk (50 állat), melyet 4 csoportra osztottunk az izolált „dolgozó szív” modellt 24 órával megelőző előkezelés alapján (lásd az Izolált „dolgozó szív” c. részt): a II-a csoport tagjai (n=15) szubkután 0,5 mL fiziológiás sóoldat injekciót kaptak; a II-b csoport állatai (n=14) szubkután 250 μ g/ttkg α -MSH oldatot (fiziológiás sóoldatban oldva) kaptak; a II-c csoportba tartozó patkányok (n=11) intraperitoneálisan 50 μ g/ttkg SnPP-t 0,5 mL fiziológiás sóoldatban feloldva kaptak 250 μ g/ttkg szubkután α -MSH oldattal együtt; míg a II-d csoport állatai (n=10) csak 50 μ g/ttkg SnPP-t 0,5 mL fiziológiás sóoldatban feloldva kaptak intraperitoneálisan. Az izolált „dolgozó szív” modell kivitelezése során az állatok szívét iszkémia/reperfúzióknak tettük ki (lásd a Globális iszkémia és reperfúzió indukálása izolált „dolgozó szíven” c. részt). A kísérlet végpontjaként a miokardiumszövetből származó mintákat vagy folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk a további HO-1 aktivitás meghatározásáig vagy megfestettük őket az infarktálódott terület nagyságának megállapításához (TTC festés), amit folyékony nitrogénnel történő lefagyasztás és -80 °C-on történő tárolás követett.

III. Az α -MSH direkt kardiális hatásainak megbecslése izolált „dolgozó szív” modellen

Kezelésben nem részesülő Sprague Dawley patkányok szívét (n=8) használtuk izolált „dolgozó szív” modell kivitelezéséhez (lásd az Izolált „dolgozó szív” c. részt) iszkémia/reperfúzió nélkül. 10 perc módosított Krebs-Henseleit pufferrel történő retrográd perfúzió (kimosási periódus) után a készüléket anterográd módra kapcsoltuk („dolgozó szív”), és mértük a kezdeti paramétereket (AF, CF, AoP és HR). A kiindulási szívfunkció felmérése után, 1 ml α -MSH oldatot (1 μ mol/l α -MSH-t tartalmazott) injektáltunk direkt módon az aorta kanül oldalsó szárán keresztül a rendszerhez. 5 perc eloszlás után újra mértük a szívfunkciós paramétereket, az α -MSH direkt hatásainak megbecsléséhez (6C ábra).

IV. Az α -MSH echokardiográfiával mérhető szívfunkciókra kifejtett direkt hatásainak analízise

Mint ahogy azt a 6D ábra mutatja, kezelésben nem részesülő patkányoknál (n=8) ketamin-xylazin kombinációval általános érzéstelenítést alkalmaztunk, majd leborotváltuk a mellkasukat. A jobb juguláris vénát láthatóvá tettük, majd megtisztítottuk a környező kötőszövetből, egy apró bemetszést ejtettünk a véna falán, majd egy fiziológiás sóoldatot tartalmazó polietilén kanült vezetünk bele. Ezután az állatot háton fekvő pozícióba helyeztük,

és elvégeztük az echokardiográfiás méréseket (lásd az Echokardiográfia c. részt). Az alap paraméterek regisztrálása után, 3 különböző dózisu α -MSH-t (10, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{tkg}$, ebben a sorrendben) injektáltunk az állatnak a katéteren keresztül, miután újra regisztráltuk a szívparamétereket, immár az egyes, illetve kumulatív dózisu α -MSH befolyása alatt.

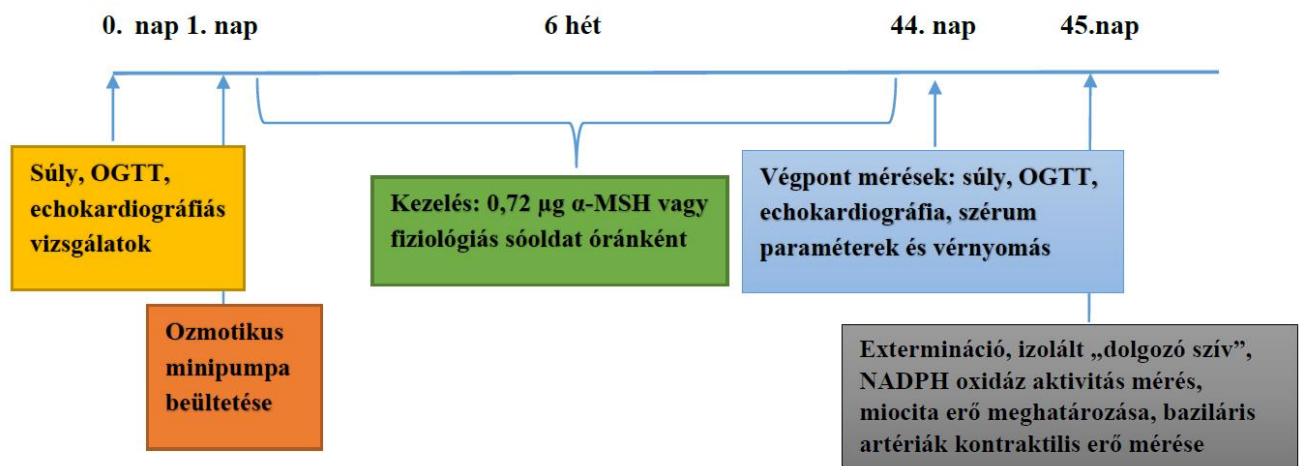
V. Izolált aorta gyűrűk α -MSH adminisztrációra adott vaszkuláris válaszainak vizsgálata

Minden egyes izolált aorta gyűrű kísérlethez ($n=8$) egy kezelésben nem részesült patkányt dekapitáltunk guillotine segítségével, majd sietve eltávolítottuk az abdominális aorta szakaszt (lásd a Globális iszkémia és reperfüzió indukálása izolált „dolgozó szíven” c. részt). 90 perc Krebs oldatban való inkubálás után 1 μM fenilefrint adtunk a 6 aorta gyűrűből 5-höz, beleértve az intimától megfosztott [ET- (endothelium deprived)] mintát is, 2 percig, melyet egy 45 perces kimosási periódus követett. Ezután az 5 gyűrűn a következő kezelések valamelyikét alkalmaztuk: (1) Krebs oldat önmagában az egyik intakt gyűrűhöz (naív) és (2) az intimától megfosztott gyűrűhöz (naív ET-), (3) 200 μM NOARG, (4) 3 μM INDO és (5) 200 μM NOARG 3 μM INDO-val egyidejűleg. Ezen kezelések után azonnal 1 μM fenilefrint adtunk az 5 preparátumhoz. 30 perc elteltével, mialatt a kontraktilis erő elért egy plató értéket, minden aorta gyűrűhöz készítettünk egy α -MSH koncentráció-hatás (E/c) görbét (1 nM-tól 1 μM -ig). A 6. aorta gyűrű esetében (6), a 90 perc Krebs oldatban való inkubálás után készítettük el az α -MSH E/c görbét (1 nM-tól 1 μM -ig). AZ V. protokolt ($n=8$) a 6E ábra illusztrálja.

4.3.2. Második kísérleti elrendezés

A második fázis kísérleti tervét a 7. ábra szemlélteti. A ZDF patkányok kezdeti értékeinek, úgymint súly, OGTT és echokardiográfiás vizsgálatok regisztrálása után ($n=12$), a kísérleti állatokat 2 csoportra osztottuk: kezeletlen állatok (Kontroll; $n=6$), melyek csak vivőanyagot (fiziológiás sóoldat) kaptak, és α -MSH kezelésben részesülő állatok (MSH, $n=6$). Mindkét csoport tagjai szubkután beültetett ozmotikus mini pumpa (a 4.13. részben részletezve) segítségével kapták a kísérleti hatóanyagot, 6 héten keresztül. A jelen tanulmány hiányossága, hogy nem ábrázolunk adatokat az egészséges (sovány) kontroll állatokról. Az alfa-MSH koncentrációja 4,8 mg/ml volt, a pumpa pedig 0,15 $\mu\text{l}/\text{órás}$ dózisban adagolta az állatoknak (0,72 μg α -MSH óránként). 6 hét után regisztráltuk a végpont értékeket (súly, OGTT, echokardiográfia, szérum paraméterek és vérnyomás), majd pedig extermináltuk az állatokat mélyaltatás (ketamin/xylazin kombináció, CALYPSOL® (ketamin), Richter Gedeon Nyrt.,

Budapest, Magyarország; NERFASIN® (xylazin), Le Vet. Pharma BV, Oudewater, Hollandia) alatt elvégzett torakotómia segítségével. Az állatok szívét és baziláris artériáját eltávolítottuk. Az izolált szívmodell elvégzése után pedig a szívizomszöveteket gyorsan lefagyasztottuk a NADPH oxidáz aktivitás és miocita erő meghatározásához. A baziláris artériákon kontraktilis erő méréseket végeztünk.



7. ábra. Kísérleti terv a kutatás második fázisához.

4.4. Kémiai reagensek

Az α-MSH-t a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk meg (cikkszám: 581-05-5), míg az Sn(IV) protoporfirin IX dikloridot (SnPP, MFCD#:MFCD00673909) a Frontier Scientific Inc. (Logan, ÚT) biztosította. Minden egyéb kémiai anyagot és puffer oldatot a Sigma Aldrich Kft. bocsátott rendelkezésünkre (Budapest, Magyarország). Az izolált aortagyűrűkön történő kísérletekhez a következő reagensek voltak szükségesek: fenilefrin, egy szelektív alfa adrenerg receptor agonista; α-MSH; N_ω-nitro-L-arginin (NOARG), egy nitrogén oxid (NO) szintáz inhibitor; indometacin (INDO), egy ciklooxygenáz-gátló; valamint sók a Krebs-Henseleit puffer oldathoz (Krebs oldat). Ezekben a kísérletekben a következő összetételű Krebs oldatot használtuk: NaCl: 118mM, KCl: 4,7mM, CaCl₂: 2,5 mM, NaH₂PO₄: 1 mM, MgCl₂: 1,2 mM, NaHCO₃: 24,9 mM, glükóz: 11,5 mM, valamint aszkorbinsav: 0,1 mM, desztillált vízben feloldva. A fenilefrint Krebs oldatban oldottuk fel, míg az α-MSH-t feloldottuk Krebs oldatban, majd diszpergáltuk 20 µl ecetsav:víz (1:9) keverékében (vol/vol). A NOARG-t és INDO-t 96%-os etanolban oldottuk, majd a NOARG oldatot tovább hígítottuk fiziológiás sóoldattal.

4.5. Echokardiográfia

Az echokardiográfias méréseket kutatásunk mindkét fázisában elvégeztük, előzetesen ketamin/xylazin (50/5 mg/ttkg) intramuszkuláris kombinációjú általános érzéstelenítésben részszétett patkányokon, a kísérletek kezdetén és végén. A kísérleti állatokat háton fekvő pozícióba helyeztük, a mellkasukat leborotváltuk. Az echokardiográfias méréseket Vivid E9 ultrahang rendszer segítségével hajtottuk végre (GE healthcare, Little Chalfont, Nagy Britannia), egy rágcsáló modellekhez kifejlesztett transzducerrel, 14 MHz-es munkafrekvenciával, magas temporális és térbeli felbontással. Minden egyes vizsgálatot 15-20 perces időtartam alatt végeztünk el. Hagyományos méréseket végeztünk 2 dimenziós és M-módban, standard nézetekből. Paraszternális hossz tengelyi és rövidtengelyi metszeteket is rögzítettünk, hogy biztosak legyünk abban, hogy mind a mitrális, mind az aorta billentyű, valamint az apex is ábrázolódik. A paraszternális rövidtengelyi metszeteket a középpapilláris izmok síkjában rögzítettük. M-mód felvételek készültek a középpapilláris izom síkjában mind paraszternális hossz tengelyi, mind paraszternális rövidtengelyi nézetekből. Doppler (PW) és szöveti Doppler (TVI) echokardiogramokat is rögzítettünk, majd további analízishez digitálisan tároltunk. A méréseket az Amerikai Echokardiográfiai Társaság (ASE) ajánlásainak megfelelően végeztük. Minden vizsgálat alatt folyamatosan monitoroztuk az állatok EKG-ját. Az alábbi paramétereket elemeztük a mérések során: az interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolé és szisztolé alatt (IVSs, IVSd), a bal kamrai végdiasztolés (LVIDd) és végszisztolés (LVIDs) belső átmérő, aorta gyök átmérő (Ao), bal pitvari átmérő (LA), bal kamrai ejekciós frakció (EF), szívfrekvencia (HR), mitrális gyűrű szisztolés csúcskitérése (MAPSE), bal kamrai csúcs E- és A-hullámok (pitvari korai és késői telődési sebesség), E/A arány (E/A), ejekciós idő (ET), izovolumetriás kontrakciós és relaxációs idő (IVCT, IVRT), miokardium performációs indexe (MPI vagy Tei-index), laterális e' és a' hullám sebessége, laterális e'/a' arány, E/e' arány, bal kamrai kiáramlás (LVOT) maximális és átlagos sebességi és nyomásparaméterei (LVOT Vmax, Vmean, LVOT maxPG és meanPG). Kiszámoltuk a végszisztolés térfogatot (ESV), végdiasztolés térfogatot (ESV), verőtérfogatot (SV), perctérfogatot (CO) és bal kamra tömeget (LV tömeg). A frakcionális rövidülést (FS) és az ejekciós frakciót (EF) az echokardiográf szoftvere kalkulálta (Teicholz-formula alapján), míg a bal kamra tömegét (LV tömeg) a következő formula alapján számoltuk: $LV \text{ tömeg (g)} = 0,8 \{1,04[(LVIDd + IVSd + PWd^3) - LVIDd^3]\} + 0,6$; ahol LVIDd a bal kamrai végdiasztolés átmérője; az IVSd az interventrikuláris szeptum diasztolés vastagsága; a PWd a poszterior fal diasztolés vastagsága. Minden adatot 3-5 egymást követő szív ciklus során mért értékek számtani átlagolásával

kaptunk meg. Az adatok analizisét egy képzett kardiológus – a kísérleti protokoll ismerete nélkül – végezte, az EchoPAC PC szoftver (GE Healthcare, New York, NY, USA) segítségével, az objektív interpretáció biztosítása érdekében.

4.6. Izolált „dolgozó szív”

Kutatásunk mindkét részében rögzítettünk patkánymodellre kialakított izolált „dolgozó szív” apparátus segítségével mérhető paramétereket. Az állatok általános anesztéziában részesültek ketamin/xylazin (50/5 mg/ttkg) kombináció intramuszkuláris beadása által, valamint a dorzális pénisz vénán keresztül intravénás heparin injekciót (1000IU/ttkg) kaptak a trombózis elkerülése érdekében. A szívüket bilaterális torakotómiát követően eltávolítottuk, majd jéghideg perfúziós pufferbe helyeztük, miután az aortán keresztül kanüláltuk a szíveket. A szív perfúzióját a Langendorff-protokollnak megfelelően végeztük, 10 perc kimosási periódust (úgynevezett „nem dolgozó” üzemmódban) alkalmaztunk konstans perfúziós nyomással, ami 100 kPa-nak felelt meg. A 10 perc kimosási idő alatt eltávolítottuk a vért, és a szív adaptálódott a megváltozott körülményekhez. A perfúziós médium módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer (mKH puffer) volt (118mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,7mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz). Egy kétfejű perisztaltikus pumpa kontrollálta a mKH puffer perfúziójának sebességét. A kimosási periódus után a Langendorff-apparátust „dolgozó” üzemmódra kapcsoltuk: megszüntettük a retrográd áramlást és a pulmonális véna felől, anterográd irányba perfundáltattuk a szíveket [115]. Ezt követően a kezdeti szívfunkciós értékeket mértük: szívfrekvenciát (HR), aorta nyomást (AoP), bal kamrai diasztolés nyomást (LVDP), melyeket a készülékhez kapcsolt kalibrált nyomásmérő és számítógépes rendszer segítségével határoztuk meg (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Ausztrália) segítségével regisztráltuk, az aorta áramlást (AF) és koronária áramlást (CF) áramlásmérővel határoztuk meg, míg a verőtérfogatot (SV) és perctérfogatot (CO) ezekből a mérésekből származtattuk [116-118]. Az ezektől eltérő értékeket a különböző protokollok részletezik. Kutatásunk első fázisának kísérleti terve alapján az I. és II. protokoll szerint ezután 30 perc globális iszkémia, majd 120 perc reperfúzió következett, ami alatt folyamatosan nyomon követtük a szívfunkciós paramétereket, a 30., 60., 90. és 120. percben. A III. protokoll szerint, a kezdeti értékek megállapítása után az iszkémia/reperfúzió helyett, 1 ml α -MSH oldatot (1 μ mol/L koncentrációban) injektáltunk közvetlenül a rendszerhez, az aorta kanülön keresztül, az α -MSH adminisztráció direkt hatásának monitorozása céljából (lásd még a Kísérleti elrendezés c.

részben). A kutatás második fázisában a 6 hetes kezelési időszak végén végrehajtott exterminációt követően végeztük el az izolált „dolgozó szív” kísérletet. Mindkét fázisban a 120 perces reperfúziót követően azonnal miokardium biopsziát vettünk a bal kamra szövetéből, melyeket lefagyasztottunk további analízis céljából [119].

4.7. Globális iszkémia és reperfúzió indukálása izolált „dolgozó szíven”

Az izolált „dolgozó szíveken” történő globális iszkémia indukálása a kutatás első fázisában az I. és II. protokollban szerepelt, míg a második fázisban az exterminációt követően (lásd az Izolált „dolgozó szív” és a Kísérleti elrendezés c. részben) végeztük el. A kiindulási szívfunkciós paraméterek meghatározása után a pitvari bemenő és aorta kimenő véráramot befogtuk közel a pitvari és aorta kanülök eredéséhez, ebben a sorrendben, majd a perisztaltikus pumpát (MASTERFLEX, Vernon Hills, IL) megállítottuk. A reperfúziót a pitvari és aorta áramok felengedésével, valamint a perisztaltikus pumpa újraindításával értük el. A normotermiás globális iszkémia alatt a miokardium kiszáradásának megelőzése céljából a termosztát üvegedényt (amiben felfüggesztettük a szíveket) lefedtük, és a benne lévő páratartalmat konstans értéken tartottuk. A kísérlet teljes időtartama alatt monitoroztuk, és rögzítettük a szívfunkciót egy számítógéphez csatlakoztatott, az izolált miokardiummal összeköttetésben lévő, ezüst elektródákból és nyomás transzducerekből álló eszköz segítségével (PoweLab; ADInstruments, Castle Hill, Ausztrália). Iszkémia előtt, illetve a reperfúzió alatt mértük a szívfrekvenciát (HR), koronáriaáramlást (CF), valamint az aortaáramlást (AF). Az AF-t a szívből adott idő alatt kipumpált pufferoldat mennyiségéből állapítottuk meg, míg a CF-et az adott idő alatt mért, szívből távozó koronária perfuzátumból határoztuk meg. A kísérlethez előre megállapítottunk kizáró kritériumokat, így amennyiben az iszkémia periódus előtt következett be kamrai aritmia, úgy azt az izolált szívet kizártuk a vizsgálatból.

4.8. Kardiális aritmia incidencia megállapítása

A kutatásunk első fázisában az izolált „dolgozó szív” modellek értékelése alatt epikardiális elektrokardiogram (EKG) monitorozást végeztünk kettő darab, közvetlenül a szívhez csatlakoztatott ezüst elektróda segítségével. Az EKG regisztrátumok kiértékelésével állapítottuk meg a kardiális aritmiák incidenciáját. Kvantális megközelítés alapján analizáltuk az aritmiákat: volt-e minimum 1 aritmiás esemény vagy nem. Az aritmiákat (tehát, min. 1

aritmiás esemény bekövetkezett) további 2 csoportra osztottuk a következők szerint: (1) ha az aritmiás esemény(ek) után spontán módon helyreállt a szív pumpafunkciója, akkor „nem-komoly” aritmiaként jellemeztük, míg (2) ha a pumpafunkció nem állt helyre, akkor „komoly” aritmiaként jellemeztük, figyelmen kívül hagyva az aritmia típusát vagy mechanizmusát, illetve az aritmiás események számát.

4.9. Izolált aorta gyűrű kísérlet

Az első fázis minden kísérletéhez dekapitáltuk a patkányokat guillotine segítségével, majd sietve eltávolítottuk az aorta abdominális szakaszát. Minden kísérleti állatból származó aortából 6 db, egyenként kb. 2 mm széles gyűrűt hasítottunk le. Az egyik gyűrűt megfosztottuk az intima rétegétől egy kis pamut tampon segítségével. Minden gyűrűt vízszintesen felszereltünk egy huzalos szerelvényre, 10 mN nyugalmi feszüléssel, egy kb. 10 mL-es függőleges szervkamrában (Experimetria TSZ-04), ami 95% O₂ és 5% CO₂ (36 °C; pH 7,4) keverékkel oxigenizált Krebs oldatot tartalmazott. A körkörös izom izometriás kontrakciós erejét egy transzducer segítségével határoztuk meg (Experimetria SG-01D), és egy poligráf segítségével regisztráltuk (Medicor R-61 6CH Recorder).

4.10. Az izolált „dolgozó szívek” infarktálódott területeinek meghatározása

Kutatásunk első fázisában direkt, az állatok feláldozása utáni módszerként trifenil-tetrazolium klorid (TTC) festést alkalmaztunk minden egyes szív infarktálódott területének azonosításához. Az izolált „dolgozó szív” modell kísérlet végén foszfátpufferben (Na₂HPO₄ 88mM, NaH₂PO₄ 1,8 mM) lévő 100 mL 1%-os TTC oldatot adtunk direkt módon a rendszerhez az aorta kanül oldalsó szarán keresztül. Az analízis során megállapítottuk, hogy a TTC az élő miokardiumot mély vörösre festette, míg az infarktus területe halvány maradt. A szíveket – 80 °C-on tároltuk egy hétig, majd 2-3 mm vastag haránt irányú metszeteket készítettünk az apiko-bazális tengely mentén, melyek súlyát megmértük, szárazra itattuk, végül szövettani tárgylemezekre helyeztük őket, és a Hewlett-Packard Scanjet szkennert (Hewlett-Packard Palo Alto, CA) segítségével beszkeneltük. Az NIH 1.61 képszerkesztő szoftver használatával minden kép esetén egyenlő mértékű háttérsötétítést, fényerőt és kontraszterősítést alkalmaztunk a jobb minőség és elkülöníthetőség érdekében. Az infarktus területeit (halvány területek, fehér pixelek) minden képen körüljelöltük, és méretüket pixelsűrűség analízissel számoltuk ki. Az infarktálódott és a teljes terület nagyságát számítógépes planométer szoftver segítségével mértük: Scion for

Windows Densitometry image program (version Alpha 4.0.3.2, Scion Corporation, Meyer Instruments, Inc, Houston, TX). Az infarktus méretét minden szív esetén az érintett terület teljes területhez viszonyított százalékos arányában adtuk meg (pixel százalék).

4.11. A szívizom HO-1 aktivitásának mérése

A kutatásunk első fázisában a miokardium HO-1 aktivitását a következő általánosan használt protokoll alapján állapítottuk meg: a szövetmintákat homogenizáltuk egy 7,4 pH-jú, 10 mM HEPES-t (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetyl-szulfonsav), 32 mM szukrózt, 1mM DTT-t (ditiotreitól), 0,1 mM EDTA-t, 10 µg/mL szójabab tripszin inhibitor, 10 µg/ml leupeptint és 2 µg/ml aprotinint tartalmazó oldatban (homogenizációs puffer). Minden reagenst a Sigma-Aldrich Kft. biztosított. A homogenizátum 30 perces, 20 000-n és 4°C-on történő centrifugálása után megkaptuk a felülúszót. A Tenhunen és munkatársai által alkalmazott módszerrel minden felülúszó esetében külön meghatároztuk a HO-1 aktivitást [120]. Röviden, a HO-1 aktivitást a hemből keletkezett bilirubin számítógép alapú spektrofotometriás analízisével mértük. Ehhez a HO-1 enzimátikus mérési protokollhoz szükséges egy reakcióelegy, mely tartalmaz egy rész felülúszót, 2 mM glükóz-6-foszfátot, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenázt, 15 µM hemet, 150 µM NADPH-t, 120 µg/ml patkány máj citoszolt, a biliverdin reduktáz forrásaként, 2 mM MgCl₂-t és 100 mM KH₂PO₄-t. Minden reakcióelegyet 1 óráig inkubáltunk a sötétben. A reakciót az elegy jégre helyezésével szakítottuk meg. A bilirubin-képződést a 460 és 530 nm-en mért optikai denzitáskülönbségek alapján állapítottuk meg. A HO-1 aktivitást az óránkénti milligramm fehérjéből képződött nanomoláris mennyiségű bilirubin formájában fejeztük ki.

4.12. HO-1 fehérje szívizomszöveti expressziójának meghatározása Western Blottal

A kutatás első fázisának végén, minden patkány lefagyasztott bal kamra szövetéből 300-300 mg-t homogenizáltunk 800 µL homogenizációs pufferben (25 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM nátrium-klorid, 4mM nátrium-ortovanadát, 10 mM NaF (nátrium-fluorid), 10 mM nátrium-pirofoszfát, 10 nM okadánsav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid), valamint 1x proteáz inhibitor koktél) egy Polytron homogenizátor segítségével. A homogenizátumokat lecentrifugáltuk 2000 rpm, 4 °C-on 10 percig. A felülúszókat tovább centrifugáltuk. A maradék felülúszók citoszolikus extraktumok, amiket kísérletesen ennek a sejtfrakciónak a meghatározásához használtunk. Ezután a mintákat (50 µg minden esetben)

nátrium-dodecil-szulfát gélelektroforézissel szeparáltuk, 12%-os tris-glicin pufferelt akrilamid-poliakrilamid gélt alkalmazva 120 V-on 90 percig. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk 100 V-on 1 órán keresztül. 5%-os szárított sovány tejfehérje koncentrációjú Tween 20-al kiegészített trisz(hidroximetil)-aminometán pufferelt só oldatban (TBST) blokkoltuk a membránt a nem-specifikus kötődések elkerülése érdekében, majd egy éjszakán át inkubáltuk őket a primer antitesttel 4 °C-on (1:1000 hígítás; anti-GAPDH; anti-HO-1 nyúl monoklonális antitest, Sigma-Aldrich Kft.). Az éjszakai inkubáció után a membránokat torma peroxidáz-konjugált kecske anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel kezeltük (1:3000 hígítás). A kötések azonosítására kemilumineszcens reakció szolgált (ECL; Litmus Scientific, Advansta INC, Menlo Park, CA). Röntgensugár alkalmazásával változó ideig tartó autoradiográfiával végeztük el az azonosítást (Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgium). A szkennelt blokkok kvantitatív analizését a Scion for Windows Densitometry Image program (version Alpha 4.0.3.2, Scion Corporation).

4.13. Ozmotikus Pumpa Implantációja

A kutatásunk második fázisában az Alzet® ozmotikus mini pumpák (Duret Corp. Cupertino, CA, USA) tarkóbőr alá történő sebészi implantációját a ZDF patkányok ketamin/xylozin (100/5 mg/kg) kombinációjú mélyaltatásában végeztük, 1 cm-es nyíláson keresztül. Az implantáció előtt a pumpákat feltöltöttük alfa-MSH oldattal (200 µL, 4,8 mg/mL sűrűségű oldat), majd behelyeztük őket 37 °C-os fiziológiás sóoldatba, minimum 4 órára [121]. A mini pumpák inzercióját követően a nyílásokat sebészi varratokkal zártuk, majd a sebet Betadine® oldattal (Egis Gyógyszergyár Zrt., Budapest, Magyarország) fertőtlenítettük. A műtét 10-15 percig tartott, miután a patkányok posztoperatív ellátásban részesültek. A pumpa folyamatos, 0,15 µl/h adminisztrációt biztosított. A kontroll csoport pumpáit fiziológiás sóoldattal töltöttük meg, és ugyanezzel a módszerrel ültettük be.

4.14. Orális Glükóz Tolerancia Teszt (OGTT)

A ZDF patkányok OGTT-jét a standardizált módon végeztük. Röviden, minden állat esetében elvégeztük a tesztet a 6 hetes kísérlet kezdetén, valamint a végén, 12 órás éhezést követően. 3g/kg glükózt kaptak az állatok, 1g/ml sűrűségű oldat formájában, orális szondázási technikával [122]. A szérum glükóz szintet a farki vénából határoztuk meg a 0., 30., 60., 90. és 120. percben glükométer segítségével (Accu-check, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA).

4.15. Éber állatok vérnyomásmérése

A kutatás második fázisának végpontján, a patkányok szisztolés és diasztolés vérnyomásértékeit egy non-invazív, farokra erősíthető mandzsettával rendelkező eszközzel – amely Térfogati Nyomás Regisztráló (Volume Pressure Recording, VPR) szenzor technológiát (CODA™ Surgical Monitor, Kent Scientific Corp., Torrington, CT, USA) alkalmaz – mértük meg. A méréseket éber állatokon végeztük, melyeket egy fűthető műanyag kalodába helyeztünk a mérés idejére [123]. Minden állat esetében 5 egymást követő regisztrátumot értékeltünk ki a legpontosabb meghatározás érdekében.

4.16. Szérum paraméterek analízise

A második fázis végpontján, 14 órás éhezést követően, a patkányok farokvénájából származó vérmintát EDTA-K2 mentes csövekbe (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) tettük. A mintagyűjtést és -feldolgozást aseptikus módon végeztük, hogy minimalizáljuk a hemolitikus aktivitást. A Debreceni Egyetem Labor Medicina Intézetének segítségével meghatároztuk a szérum koleszterin-, triglicerid- és vércukor értékeket.

4.17. Izolált kardiomiociták erőmérése

A második fázisban az izolált „dolgozó szív” modellből (n=3-4) származó bal kamrai (LV) kardiomiociták (n=12, csoportonként) teljesítményét a korábban leírt módon mértük, az iszkémia/reperfúziós protokollt követően [124]. Röviden, a mélyfagyasztott (-80 °C) szöveteket mechanikailag szétválasztottuk, demembranizáltuk 0,5%-os Triton X-100 detergens oldat segítségével, 5 perc alatt az izoláló oldatban (MgCl₂: 1,0 mM; KCl: 100,0 mM; EGTA: 2,0 mM; ATP: 4,0 mM; imidazol: 10,0 mM; pH 7,0), 4°C-on. Minden egyes kiválasztott sejtet szilikon ragasztóanyaggal rögzítettünk egy rozsdamentes acél 'rovar' tű egyik végéhez, amely egy nagysebességű hosszmérő berendezéshez (Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canada) csatlakozott, míg a másik vége egy érzékeny erőmérő transzducerhez (Sensonor AS, Horten, Norvégia) kötődött, 15°C-on. A kardiomiocita izometriás erőgeneráció 2,3 µm-es szarkomérhosszúság mellett történt, és a LabVIEW szoftver (National Instruments Corp., Austin, TX, USA) segítségével analizáltuk. Egy egyedülálló szívizomsejt Ca²⁺-függő erőképzését a preparátum nyugalmi oldatból (BES: 10,0 mM; KCl: 37,11 mM; MgCl₂: 6,41 mM; EGTA: 7,0 mM; ATP: 6,94 mM, kreatin foszfát: 15,0 mM; pH7,2) aktiváló oldatba

(ugyanaz az összetétele, mint a nyugalmi oldatnak, azzal a különbséggel, hogy Ca^{2+} -EGTA-t tartalmaz az EGTA helyett) történő áthelyezésével indukáltuk. A Ca^{2+} koncentrációt – $\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$ egységként jelöltük (pCa). Minden oldathoz frissen adtunk proteázgátlót: fenilmetilszulfonil fluorid: 0,5 mM; leupeptin: 40 μM és E-64: 10 μM . Minden vegyszert a Sigma-Aldrich Kft-től vásároltunk (St. Louis, MO, USA). A kardiomiociták Ca^{2+} -aktivált erőgenerációját maximális aktiváló oldat segítségével (pCa 4,75), valamint váltakozó Ca^{2+} -tartalmú oldatok segítségével (pCa 5,4-7,0) mértük. A szubmaximális erőket a maximális erőkre normalizáltuk, és illesztettük a módosított Hill egyenlethez az Origin 6.0 analízis programmal (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). A pCa50 által jelzett fél-maximális kontrakcióhoz tartozó pCa érték önmagában meghatározza a kontrakciós apparátus erőgenerációjának Ca^{2+} -érzékenységét, míg az nHill együtthatóként kifejezett Ca^{2+} -érzékenységi görbe meredeksége a miofilamentumok közötti kooperációt jellemzi. Az eredeti aktív erőket a miociták keresztmetszetére normalizáltuk, ami az aktív feszülést mutatja (kN/m Ca^{2+} -ban kifejezve). A statisztikai analízist a GraphPad Prism 5.02 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az adatokat párosítatlan Student t-próbával hasonlítottuk össze.

4.18. Artériás kontraktilis erőmérés

A második fázis végén, a ketamin/xylazin kombinációval létrehozott anesztézia alatt elvégzett torakotómia után, a kísérleti állatok agyát eltávolítottuk, és egy szilikon tartalmú, 0-4 °C-os Krebs oldattal (NaCl: 110 mM, KCl: 5 mM, MgSO_4 : 1 mM, NaHCO_3 : 24 mM, glükóz: 5 mM, KH_2PO_4 : 1,0 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) töltött petri csészébe helyeztük. Az oldatot korábban egy gázkeverékkel hoztuk egyensúlyba (5% CO_2 , 10% O_2 és 85% N_2 , pH 7,4). A baziláris artériákat mikrosebészeti eszközök (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Németország) segítségével izoláltuk. Az artériákat egyenlően, 4 mm hosszú gyűrűkre vágtuk, amelyeket egy izometriás kontrakció mérő rendszerbe applikáltunk (DMT-510, Danish Myotechnology, Aarhus, Dánia). A Ca^{2+} -mentes Krebs oldatot Ca^{2+} -tartalmúra cseréltük (NaCl: 110 mM, CaCl_2 : 2,5 mM, KCl: 5 mM, MgSO_4 : 1 mM, NaHCO_3 : 24 mM, glükóz: 5 mM, KH_2PO_4 : 1,0 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Minden kísérlet előtt egy normalizációs protokollt iktattunk be, 1,5 mN erővel megnyújtva a preparátumokat, amit 15 másodpercenként egyenlő mértékben emeltünk, amíg a számolt intraluminális nyomás el nem érte a 13,4 kPa-t. A kísérleteket ezután ezen a feszülési szinten végeztük el. Regisztráltuk az

erek KCl-ra (6-66 mM), szerotoninra (1 nM-10 μ M) és angiotenzin II-re (1 nM-100 μ M) adott kontraktilis válaszát.

4.19. NADPH oxidáz aktivitás mérés

A NADPH oxidáz eredetű szuperoxid termelést, a korábbiakban leírt [125, 126] lucigenin által gerjesztett kemilumineszcencia segítségével mértük a második fázis végén. A bal kamrákból (LV) származó mintákat az ex vivo perfúziós kísérletek végeztével azonnal lefagyasztottuk, és -70 °C-on tároltuk az analízisig. A bal kamrai mintákból (n=4 az α -MSH-val kezelt, illetve a kezeletlen kontroll csoportból is) megközelítőleg 100 mg-ot (nedves szövet) homogenizáltunk (Pro200 homogenizátor, Proscientific, Oxford, CT, USA) 10 egység jéghideg $1\times$ Ca^{2+} -mentes Dulbecco Foszfát Pufferelt Sóoldatban (Gibco®, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), ami 40 μ M leupeptint és 5 μ M E64 proteázgátlót tartalmazott. A centrifugálás után a golyót félretettük, és Bicinchoninás Savi Assay-t alkalmaztunk a felülúszóban található fehérjekoncentráció meghatározása céljából, borjú szérum albumint (BSA) használtunk kontrollként (minden vegyszert a Sigma-Aldrich-tól vásároltunk, St. Louis, MO USA). A fehérjekoncentrációk körülbelüli értéke 20 mg/ml volt. A NADPH oxidáz enzim aktivitásméréséhez használt reakciós elegy 50 μ L szívizom homogenizátumot tartalmazott Krebs-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) oldatban (NaCl: 110 mM, KCl: 5 mM, MgSO_4 : 1 mM, NaHCO_3 : 24 mM, glükóz: 5 mM, KH_2PO_4 : 1,0 mM, 20 mM HEPES, 50 μ M lucigenin). A szcintillációs csövek sötét adaptáción mentek keresztül, megmértük a minták bazális lumineszcenciáját PerkinElmer Tricarb 2800 tr folyékony szcintilláció számlálóval (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Az enzimatis aktivitást 100 μ M NADPH reakcióelegyhez való hozzáadásával stimuláltuk. Ezután 2 percig közvetlenül mértük a lumineszcenciát. A bazális és stimulált lumineszcencia közötti különbséget kiszámoltuk, majd normalizáltuk a protein koncentrációra.

4.20. Statisztikai analízis

Az összes leírt adat a csoportokból származó egyes eredmények átlagaiként jelenik meg \pm az átlagok standard hibája (standard error of mean, SEM). A gaussi eloszlás megállapításához D'Agostino & Pearson omnibusz normalitás tesztet alkalmaztunk. A statisztikai analízist egyutas varianciaelemzéssel (ANOVA) és Bonferroni poszt-tesztel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn poszt-tesztel (ha a normalitás nem teljesült) végeztük. 2 csoport közötti

különbség szignifikanciaszintjének meghatározásához Student t-próbát használtunk. Kettőnél több halmazt az egyutas varianciaanalízissel hasonlítottunk össze, melyet a Tukey's posztteszt követett. Az átlagértékek közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 6.07 program segítségével végeztük (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

5. Eredmények

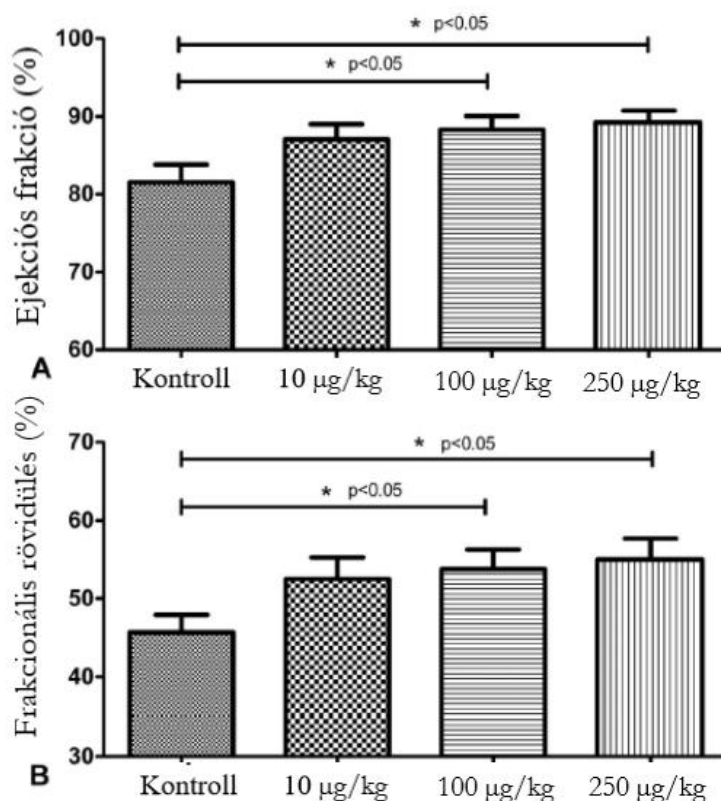
5.1. A kutatás első fázisának eredményei

5.1.1. Echokardiográfiás eredmények: Frakcionális Rövidülés és Ejekciós Frakció (IV. protokoll)

Az első fázis echokardiográfiás vizsgálatainak eredményeit a 8. ábra mutatja (8A és 8B ábra). Minden állat szívfrekvenciája (HR) és légzésszáma stabil maradt a kísérlet során. Sőt, mi több, a 2 „vak”, független vizsgáló által megállapított értékek között nem volt szignifikáns különbség. A paraszternális hossz tengely és rövidtengely mentén mért FS és EF értékek szorosan korreláltak. A 100 és 250 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ α -MSH adminisztrációt követően az FS szignifikánsan nőtt, összehasonlítva az injekció előtt mért (Kontroll) értékekkel ($FS_{100 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 53,79 \pm 2,497$ és $FS_{250 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 55,00 \pm 2,688$ vs. $FS_{\text{Kontroll}}: 45,69 \pm 2,241$). Hasonló tendenciát figyeltünk meg az EF értékekben ($EF_{100 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 88,31 \pm 1,745$ és $EF_{250 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 89,21 \pm 1,527$ vs. $EF_{\text{Kontroll}}: 81,52 \pm 2,296$). Az α -MSH 10 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ dózisban látható emelkedést eredményezett az FS és EF értékekben, azonban ez az emelkedés nem érte el a statisztikai szignifikancia határát ($FS_{10 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 52,50 \pm 2,773$ vs. $FS_{\text{Kontroll}}: 45,69 \pm 2,241$) és ($EF_{10 \mu\text{g}/\text{tkg}}: 87,04 \pm 1,963$ vs. $EF_{\text{Kontroll}}: 81,52 \pm 2,296$). Az interventrikuláris és bal kamrai szabad falvastagságok, valamint a bal kamra tömegek között nem mutatkozott szignifikáns különbség egyszeri α -MSH adminisztráció hatására.

5.1.2. Izolált „dolgozó szív” modell eredmények (II. protokoll)

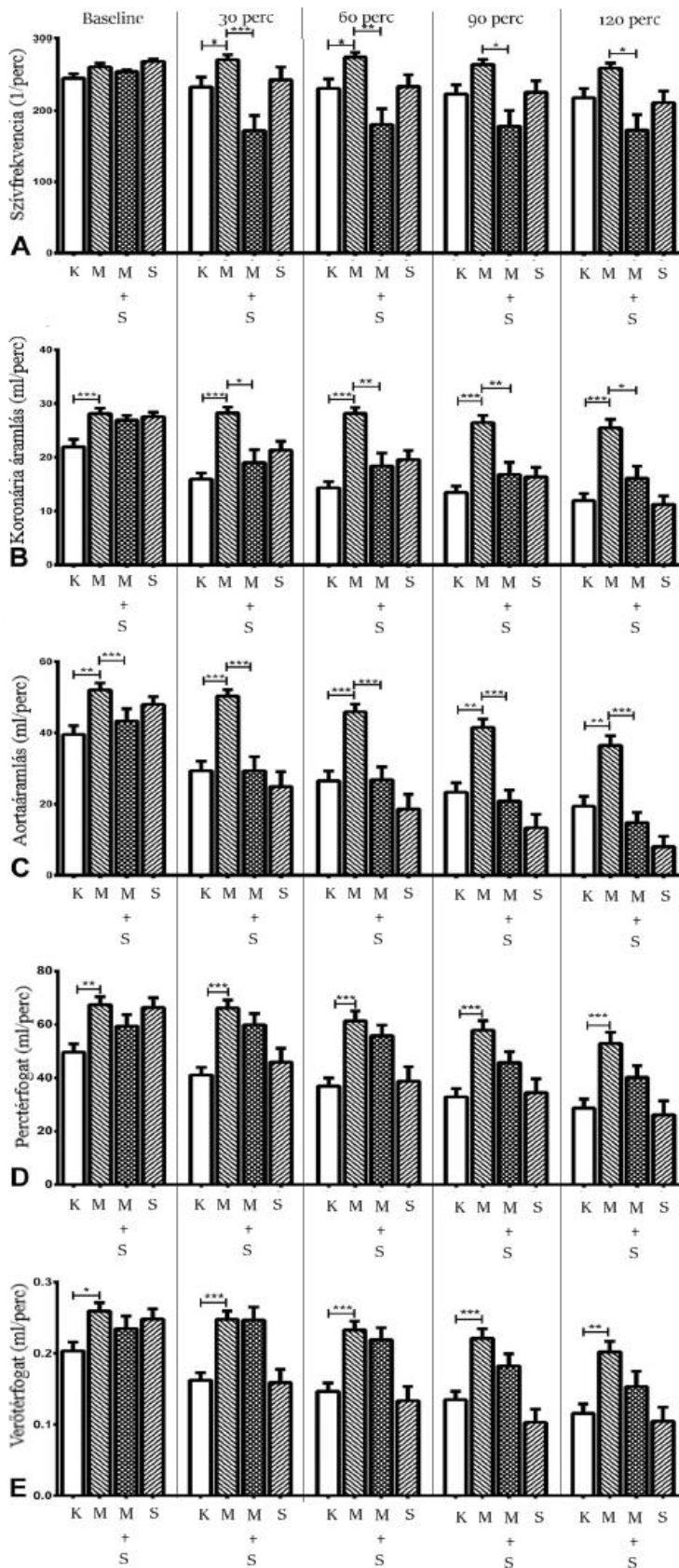
Az I. protokoll során kapott izolált „dolgozó szív” modell adatait e cikk keretein belül nem részletezzük, mivel a szerzők korábban már publikáltak hasonló kísérleti körülmények között kapott hasonló eredményeket [38]. A Western Blot Analízis (I. protokoll) mutatja be az I. protokoll során kapott új Western Blot eredményeket, melyeket az izolált szívmodell végén nyert, fagyasztva-tárolt szívizomminták analíziséből nyertünk. A 9. ábra által bemutatott adatok reprezentálják a II. protokoll szerint végzett izolált „dolgozó szív” modell alatt végzett szívfunkciós vizsgálatok eredményeit, melyek segítségével meghatároztuk az SnPP-mediált HO-1 gátlás HR, CF, AF, CO és SV értékekre kifejtett hatását.



8. ábra. Echokardiográfias eredmények. A különböző dózisú α -MSH-k hatása az ejekciós frakcióra (A) és a frakcionális rövidülésre (B). Az echokardiográfias vizsgálatokat ketamin-xylazin általános anesztézia létrehozása után végeztük. A kiindulási paraméterek regisztrálása után (kontroll), különböző dózisú α -MSH injekcióban (10, 100, 250 μ g/kg, ebben a sorrendben) részesültek az állatok intravénás katéteren keresztül, majd újra megmértük és regisztráltuk a szívparamétereket. Az eredményeket minden csoport átlagértékeként \pm SEM ábrázoltuk az [%], illetve [%], B] esetén is. * $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva

5.1.2.1. α -MSH és SnPP hatásai a szívfrekvenciára (HR)

Az izolált „dolgozó szív” modell során regisztrált szívfrekvenciák analízisének eredményeit mutatja be a 9A ábra. Megfigyeltük, hogy az α -MSH kezelés emelte a szívfrekvenciát, különösen a reperfúziós periódus első szakaszában ($p < 0,05$), összehasonlítva a kontroll csoporttal. Az SnPP kezelés ellensúlyozta az α -MSH HR-emelő hatását ($p < 0,05$) a teljes reperfúziós periódus alatt (pl. a 30. percben: $172,0 \pm 21,22$ ütés/perc SnPP + α -MSH vs. $271,4 \pm 7,117$ ütés/perc α -MSH; a 60. percben pedig: $180,5 \pm 22,28$ ütés/perc SnPP + α -MSH vs. $275,1 \pm 6,698$ ütés/perc α -MSH).



9. ábra. α -MSH, és/vagy a HO-1 inhibitor, SnPP előkezelés hatása az izolált „dolgozó szív” modellben mért szívfunkciókra (II. protokoll). Az izolált „dolgozó szívek” 4 különböző patkánycsoportból származtak, melyeket α -MSH-val és/vagy fiziológias sóoldattal kezeltünk, illetve meghatározott csoportok HO-1 inhibitor, SnPP injekciót is kaptak az extermináció és szívizoláció előtt. A kezeléseket a következőképpen alakítottuk: 0,5 ml fiz.só szubkután (II-a csoport, kontroll); 250 μ g/ttkg α -MSH szubkután (II-b csoport, MSH); 250 μ g/ttkg α -MSH szubkután + 50 μ g/ttkg SnPP intraperitoneálisan (II-c csoport, MSH + SnPP); 50 μ g/ttkg SnPP intraperitoneálisan (II-d csoport, SnPP). A szívfunkciós paramétereket az iszkémia előtt (baseline), valamint a reperfüzió 30., 60., 90. és 120. percében regisztráltuk. Az eredményeket a különböző szívcsoporthoz tartozó értékek - mint a HR [1 perc alatti ütések száma, (A)]; CF [mL/perc, (B)]; az AF [mL/perc, (C)]; CO [mL/perc, (D)] és SV [mL/perc, (E)] - átlagként \pm SEM ábrázoltuk. * p <0,05, szignifikáns különbség a csoportok között. ** p <0,01, szignifikáns különbség a csoportok között. *** p <0,001, szignifikáns különbség a csoportok között.

K: kontroll
M: MSH
M+S: MSH + SnPP
S: SnPP

5.1.2.2. α -MSH és SnPP hatásai a koronáriaáramlásra (CF)

Az izolált „dolgozó szív” modell elvégzése alatt a CF értékeket is nyomon követtük (9B ábra) egyrészt iszkémia előtt, másrészt a reperfúzió 30., 60., 90. és 120. percében. Mint látható, az α -MSH kezelés javította az iszkémia előtti CF értékeket a kontroll értékekhez viszonyítva ($28,14 \pm 0,99$ vs. $21,93 \pm 1,39$ mL/perc). Az α -MSH-val kezelt állatok reperfúzió alatt mért CF értékei az összes időpontban emelkedettek voltak, és ez a különbség szignifikánsnak bizonyult az összes többi csoporthoz viszonyítva ($p < 0,05$). Az α -MSH-val kezelt állatok CF értéke a reperfúzió 120. percében ($25,45 \pm 1,60$ mL/perc) 16%-kal volt magasabb, mint a kontroll csoport iszkémia előtt mért értéke ($21,93 \pm 1,39$ mL/perc), és csak 10%-kal csökkent az α -MSH-kezelt patkányok iszkémia előtti értékéhez képest ($28,14 \pm 0,99$ mL/perc). A HO-1 inhibitor, SnPP szignifikánsan ellensúlyozta az α -MSH kezelés CF-emelő hatását, mint ahogy az a SnPP + α -MSH-val kezelt csoport eredményeiből, bármely időpillanatot tekintve, látszik ($p < 0,05$).

5.1.2.3. α -MSH és SnPP hatásai az aortaáramlásra (AF)

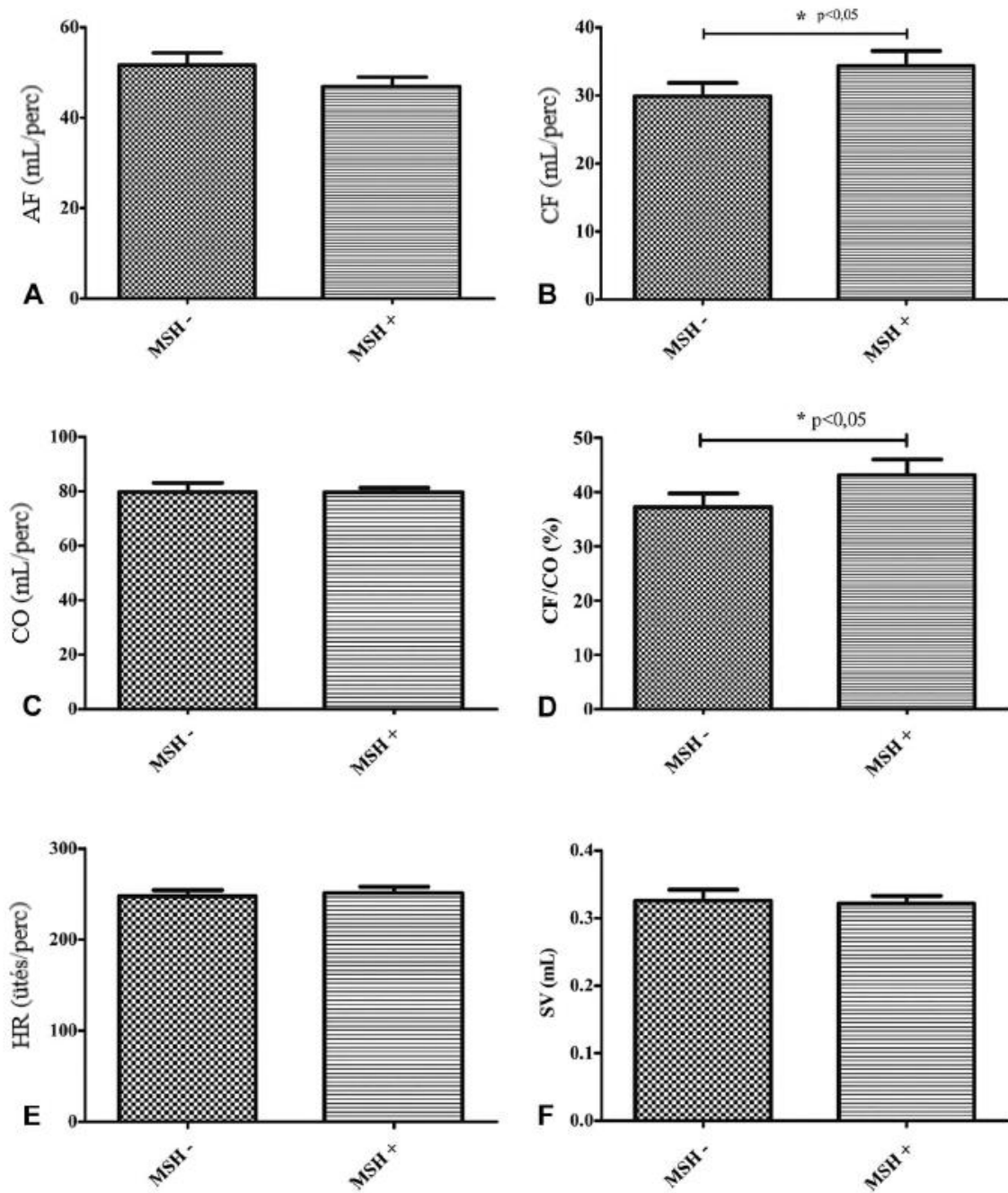
Az α -MSH befolyása alatti AF eredményeket, valamint a HO-1 általi modulációt a 9C ábra szemlélteti. A II. protokollt alkalmazva ezekhez a kísérletekhez, az AF értékek jelentősen emelkedtek az α -MSH-val kezelt csoportban ($52,07 \pm 1,93$ mL/min) a kontrollhoz képest ($39,57 \pm 2,44$ mL/perc $p < 0,001$) az iszkémiás inzultus előtt. Az α -MSH-val kezelt csoporthoz viszonyítva, az SnPP-vel, illetve α -MSH+SnPP-vel kezelt állatok iszkémia előtti AF értékei csökkentek, azonban a kontroll csoporthoz képest növekedtek ($48,00 \pm 2,16$ és $43,36 \pm 3,42$ mL/perc ebben a sorrendben). Az α -MSH-kezelt patkányok AF értékei a reperfúzió minden időpontjában szignifikáns emelkedést mutattak a megfelelő kontroll értékekhez viszonyítva ($p < 0,01$). Még az iszkémia előtti kontroll értékekhez képest is, az α -MSH-val kezelt állatok AF értékei minden időpontban emelkedettebbek voltak, kivéve a reperfúzió 120. percét. Ráadásul szignifikáns különbség mutatkozott az α -MSH-val kezelt patkányok AF értékei, valamint az összes többi csoport AF értékei között a reperfúzió időszakában ($p < 0,01$). Habár az SnPP-vel kezelt állatok kezdeti AF értékei emelkedtek a kontrolcsoporthoz képest, a reperfúzió végére a kontroll kezdeti értékek 20%-ára csökkentek ($8,00 \pm 2,94$ mL/perc). Hasonló tendenciát figyeltünk meg a α -MSH+SnPP-vel kezelt csoport esetén is, habár ezen állatok értékei bármely időpontban, illetve a reperfúzió teljes időszakában magasabbak voltak, mint a csak SnPP kezelésben részesülő állatoké.

5.1.2.4. α -MSH és SnPP hatásai a perctérfogatra (CO) és verőtérfogatra (SV)

Az α -MSH-val kezelt állatok CO (9D ábra) és SV (9E ábra) értékei a kísérlet minden időpontjában szignifikánsan magasabbak voltak, mint a megfelelő kontroll értékek. Mindazonáltal, az SnPP nem tudta ellensúlyozni ezt a jelenséget.

5.1.3. Az α -MSH adminisztráció direkt hatása az izolált szívmodelleken (III. protokoll)

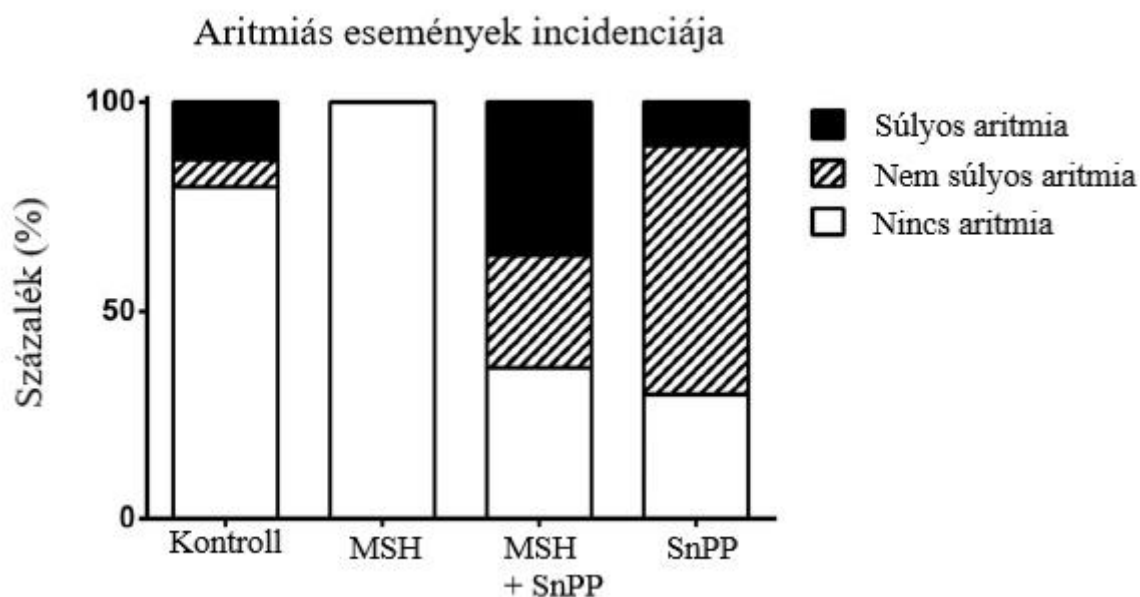
A 10. ábra mutatja az 1 $\mu\text{mol/l}$ α -MSH adminisztráció (MSH+) szívfunkciókra kifejtett direkt hatásait a kiindulási értékekhez viszonyítva (MSH-). A hatóanyagot a Langendorff apparátus aorta kanüljén keresztül juttattunk a rendszerbe. Amint látható, az α -MSH kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a koronária áramlás (CF) (10B ábra), illetve a CF/CO% (10D ábra) a kezdeti értékekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Az AF, CO, HR és SV értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezdeti értékekhez képest.



10. ábra. Direkt α -MSH adminisztráció hatása az izolált szívfunkciókra (III.protokoll). Az izolált szíveket 0,1 ml 1 μ mol/l α -MSH-val kezeltük (MSH+). A kiindulási értékeket (MSH-)ként jelöltük. Az α -MSH-oldatot a Langendorff-apparátus aorta kanüljén keresztül juttattuk be retrográd perfúzió során. Az eredményeket a különböző szívcsoportokból származó értékek - mint az AF [ml/perc, (A)]; CF [mL/perc, (B)]; CO [ml/perc, (C)]; a CF és CO %-os aránya [CF/CO, %, (D)]; a HR [1 perc alatti ütések száma, (E)]; és SV [mL/perc, (F)] – átlagként \pm SEM ábrázoltuk. * $p < 0,05$, a csoportok közötti szignifikáns különbséget jelöli.

5.1.4. Kamrai aritmiák incidenciájának és súlyosságának meghatározása (II. protokoll)

Az EKG regisztrátumok elemzése mutatja (11. ábra), hogy a kontroll patkányok 80%-ánál nem tapasztaltunk aritmiás eseményt. Azonban az állatok 6,7%, és 13,3%-ában nem súlyos, illetve súlyos aritmiákat észleltünk, ebben a sorrendben. Az α -MSH-val kezelt állatoknál nem tapasztaltunk aritmiás eseményt. Az α -MSH+SnPP csoportban, az izolált „dolgozó szívek” 36,4%-a nem mutatott aritmiát, míg 27,2%-nál nem-súlyos, további 36,4%-nál súlyos aritmiás eseményeket detektáltunk. A csak SnPP kezelésben részesülő patkányok izolált szíveinek 30%-a nem mutatott aritmiát, 60%-ánál nem súlyos, 10%-ánál súlyos aritmiás eseményeket észleltünk.



11.ábra. α -MSH és/vagy HO-1 inhibitor, SnPP előkezelés hatása az izolált szívmodellekben megjelenő kardiális aritmiákra (II. protokoll). Az izolált szívek 4 különböző patkánycsoportból származtak, melyek a következő előkezelésekben részesültek: 0,5 ml fiz.só szubkután (kontroll); 250 μ g/ttkg α -MSH szubkután (MSH); 250 μ g/ttkg α -MSH szubkután + 50 μ g/ttkg SnPP intraperitoneálisan (MSH + SnPP); 50 μ g/ttkg SnPP intraperitoneálisan (SnPP). Azok az aritmiás események, melyek után a szív nem nyerte vissza normál pumpafunkcióját, azt a súlyos, míg amelyek után visszanyerte, azt a nem-súlyos aritmia csoportjába soroltuk.

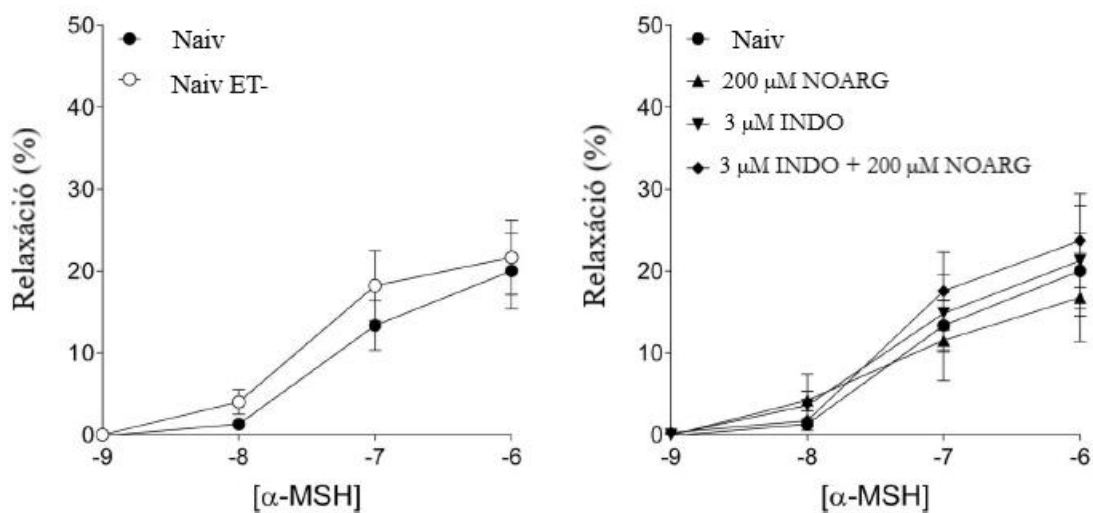
5.1.5. A NOARG és INDO hatásai az α -MSH-mediált vaszkuláris tónus válaszokra (V. protokoll)

5.1.5.1. Fenilefrinre adott vaszkuláris válasz (prekontrakció)

A naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt állatok α -MSH kezelés előtti aorta gyűrű kontrakciós erejük E/c görbéje (mN-ban, átlag \pm SEM) $3,47 \pm 0,37$, $4,21 \pm 0,41$, $4,46 \pm 0,39$, $1,98 \pm 0,26$ és $3,68 \pm 0,4$ volt, ebben a sorrendben, szignifikáns különbséggel a naiv és 3 μ M INDO-val kezelt csoport értékei között ($p < 0,01$).

5.1.5.2. α -MSH-ra adott vaszkuláris válasz

Az α -MSH kezelés nem hozott direkt szignifikáns változást a nyugalmi vaszkuláris tónusban (nem ábrázolt adatok). Ezzel ellentétben, a prekontrahált aortagyűrűk szignifikáns relaxációt mutattak α -MSH hatására (12. ábra). Az 1 μ M koncentrációjú α -MSH által elért maximális relaxáció (a kezdeti kontrakciós erő százalékos hányadában megadva, átlag \pm SEM) nem mutatott szignifikáns különbséget a naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt csoportok között ($20,01 \pm 4,64$, $21,65 \pm 4,53$, $16,75 \pm 5,41$, $21,24 \pm 6,73$ és $23,71 \pm 5,7$ ebben a sorrendben). Így az α -MSH vaszkuláris tónusfokozó hatása (az $\alpha 1$ adrenoreceptorok stimulálásán keresztül) feltehetően független az intima jelenlététől, csakúgy, mint az endotélium prosztaciklin, illetve NO-termelő képességétől.

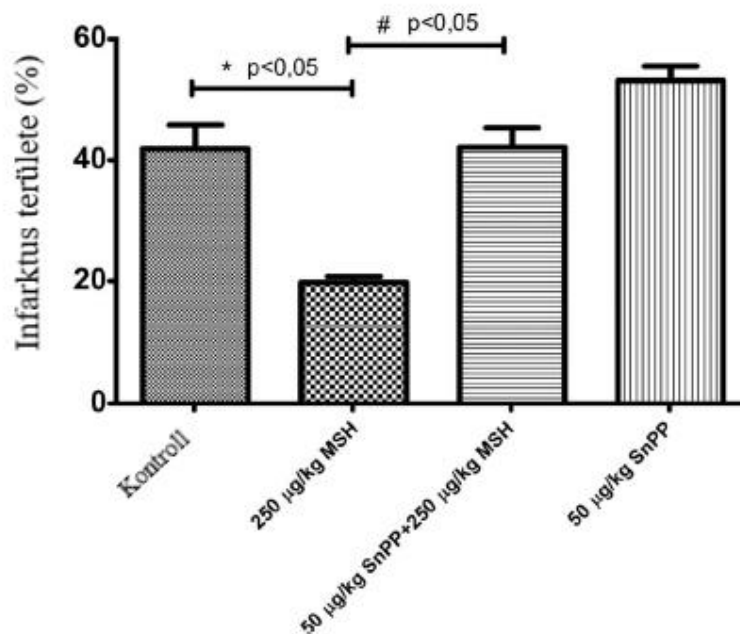


12. ábra. Az α -MSH vaszkuláris tónusra kifejtett hatásai. Az α -MSH befolyását vizsgáltuk 1 μ M fenilefrinnel prekontrahált patkányok abdominális aorta gyűrűinek tónusán, mely gyűrűket megfosztottunk az intima rétegüktől (naiv ET-); illetve melyeknek intakt volt az endotélium rétege (naiv). Az α -MSH kontraktilis erőre kifejtett hatásait

a naiv és naiv ET- gyűrűkön, a bal oldali ábra, a NOARG, INDO, valamint NOARG+INDO befolyását az α -MSH-kezelt naiv gyűrűkre pedig a jobb oldali ábra szemlélteti. Mindkét diagram esetében az 'x'-tengely az α -MSH moláris koncentrációjának logaritmikus értékét mutatja, az 'y'-tengely pedig a hatást, a kezdeti kontrakciós erő százalékos csökkenéseként. A szimbólumok az α -MSH-ra adott csoportonkénti válaszok átlagát reprezentálják (\pm SEM).

5.1.6. Az α -MSH és HO-1 gátlás hatása az iszkémia/reperfúzió-indukált kardiális infarktus kiterjedésére (II. protokoll)

Ahogy a 13. ábrán látható, szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg az iszkémia/reperfúziós sérülés következtében kialakult infarktus területére (a teljes terület százalékos arányában kifejezve) vonatkozóan a II. protokoll szerint kezelt állatok szívében. Az α -MSH-val kezelt állatok szívének TTC-festése szignifikánsan kisebb infarktus területet jelzett a vivőanyaggal kezelt kontroll állatok szívéhez képest ($19,74 \pm 1,044\%$ vs. $41,91 \pm 3,922\%$) ($p < 0,05$). Ezt a kardioprotektív hatást teljes mértékben ellensúlyozta az α -MSH-val kezelt állatok SnPP-vel történő előkezelése ($42,15 \pm 3,235\%$ vs. $19,74 \pm 1,044\%$) ($p < 0,05$). Sőt, mi több, az SnPP kezelés önmagában szemmel láthatóan növelte az infarktus területét ($53,17 \pm 2,347\%$).



13. ábra. Az α -MSH és HO-1-gátlása hatása az infarktálódott terület nagyságára (II. protokoll). A kísérleti állatok 0,5 ml fiz.só szubkután (II-a csoport, kontroll) vagy 250 µg/ttkg α -MSH szubkután (II-b csoport, MSH) vagy 250 µg/ttkg α -MSH szubkután + 50 µg/ttkg SnPP intraperitoneálisan (II-c csoport, MSH + SnPP) vagy 50 µg/ttkg SnPP intraperitoneálisan (II-d csoport, SnPP) kezelésben részesültek, mely kezeléseket követően extermináció,

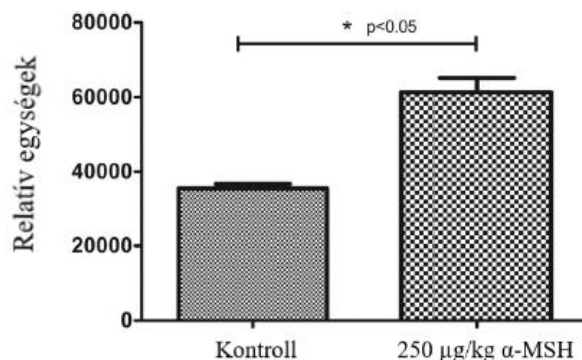
majd iszkémia/reperfúzió végrehajtása izolált szív modellen történt. Az infarktálódott területet az aorta kanül oldalsó szárán keresztül bejuttatott foszfát pufferben lévő 1%-os TTC-oldattal festettük meg. A szíveket haránt irányban felszeleteltük, szárazra töröltük, szövettani tárgylemezek közé helyeztük, majd beszkeneltük. Minden metszet esetén külön vizsgáltuk az infarktálódott terület nagyságát, amit a pixelsűrűség alapján számoltunk ki. * $p < 0,05$ az infarktálódott területek kontrollhoz történő viszonyítása esetében, # $p < 0,05$ az infarktálódott területek α -MSH-előkezelt csoporthoz (250 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) történő viszonyítása esetében.

5.1.7. Az α -MSH és SnPP kezelés hatásai a szöveti HO-1 aktivitásra (II. protokoll)

A HO-1 enzim aktivitását a II. protokoll szerint előkezelt állatokból származó miokardium mintákban vizsgáltuk. Az enzimaktivásban nem mutatkozott szignifikáns különbség (nem ábrázolt adatok). Mindazonáltal, az α -MSH-val kezelt állatok HO-1 aktivitása enyhén emelkedett a kontroll állatokhoz képest; az SnPP előkezelés csökkentette az enzimaktivitást, míg ez a csökkenés kevésbé intenzívnek tűnt az α -MSH + SnPP-vel kezelt csoportban, a csak SnPP-vel előkezelt patkányokhoz képest. Habár a HO-1 aktivitás mérése korrelál a fent említett módszerekkel, a csoportok közötti különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét.

5.1.8. Western Blot analízis (I. protokoll)

A Western blot vizsgálatokat az I. protokoll szerinti izolált szívmodell kivitelezésének végén kapott, lefagyasztott miokardium mintákból végeztük el. A 14. ábrán bemutatott Western blot analízis eredményei szemléltetik, hogy a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ α -MSH-val kezelt állatokból származó izolált „dolgozó szív” modellek posztiszkémia/reperfúziós minták HO-1 fehérje expressziója szignifikánsan magasabb volt, a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll állatokból származó minták HO-1 fehérjetartalmához képest ($p < 0,05$).



14. ábra. Western blot analízis izolált „dolgozó szívekből” származó miokardium HO-1 expressziójának vizsgálatára (I. protokoll). A patkányok miokardiumának HO-1 expresszióját 2 kezelési csoportból (0,5 mL fiziológiás sóoldat/250 µg/ttkg α-MSH) származó homogenizált bal kamra szövetben vizsgáltuk. Az érintett fehérjének megfelelő sávok jelintenzitását denzitométerrel határoztuk meg. A szövetek HO-1 tartalmát relatív egységek formájában ábrázoltuk, az egyes csoportokból származó értékek átlagaként ± SEM. * $p < 0,05$ a miokardium átlagos HO-1 expressziójának kontrollhoz történő hasonlításához.

5.2. A kutatás második fázisának eredményei

5.2.1. Súlygyarapodás, szérumparáméterek, vérnyomás és bal kamra tömeg/teljes testtömeg arány

Az állatok kezdeti testtömege $326,7 \pm 5,723$ g volt. A kísérleti csoportok súlygyarapodását, szérum koleszterin,- és triglicerid szintjét, valamint a non-invazív vérnyomásmérés eredményeit a 4. táblázat mutatja. A fent említett értékek között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Ezzel ellentétben, szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és α-MSH-kezelt állatok bal kamra (LV) tömegének a teljes test tömegéhez viszonyított arányában (4. táblázat).

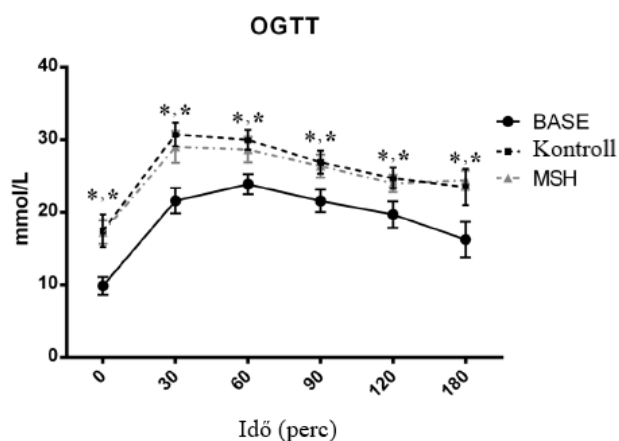
Paraméter	Kontroll	MSH
Végpont tömeg (g)	358.7 ± 7.154	391.8 ± 17.0
Súlygyarapodás (%)	20.23 ± 2.444	17.65 ± 2.225
Kezdeti LV tömeg/teljes testtömeg (%)	0.337 ± 0.011	0.321 ± 0.017
Végpont LV tömeg/teljes testtömeg (%)	0.320 ± 0.011	$0.2770 \pm 0.010^*$
Totál koleszterinszint (mmol/L)	3.445 ± 0.210	3.295 ± 0.074
HDL (mmol/L)	2.082 ± 0.194	1.768 ± 0.092
Triglicerid (mmol/L)	3.487 ± 0.318	3.068 ± 0.344

Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	134.0 ± 4.073	142.2 ± 1.90
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	96.25 ± 3.484	105.5 ± 4.4

4. táblázat. A kezeletlen kontroll (n=6) és α -MSH-val kezelt Zucker Diabetic Fat (ZDF) állatok súlya, súlygyarapodása, bal kamra (LV) tömegének és teljes testtömegének egymáshoz viszonyított aránya (echokardiográfiával mérve), szérum paraméterei és vérnyomás értékei. A kezelt csoportok súlygyarapodása, szérum koleszterin,- és triglicerid szintje, valamint a non-invazív vérnyomásmérés eredményei között nem találtunk szignifikáns eltérést. Azonban a teljes testtömeghez viszonyítva csökkent LV tömegeket mértünk a melanocita stimuláló hormonnal kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest. * vs. Kontroll, p<0,05.

5.2.2. Az OGTT teszt eredményei

Az Orális Glükóz Tolerancia Teszt eredményeit a 15. ábra mutatja. A ZDF kontroll és α -MSH-val kezelt állatok értékei emelkedtek a kezdeti (baseline, BASE) értékekhez képest, de a két csoport értékei semelyik időpontban nem mutattak szignifikáns különbséget.



15. ábra. A kísérlet kezdetén és a 6. héten végzett Orális Glükóz Tolerancia Teszt (OGTT) vizsgálat eredményei. Az α -MSH-val kezelt és a kezeletlen kontroll ZDF patkányok eredményei között nem volt szignifikáns különbség. Minden adat a csoportok értékeinek átlagát ± SEM mutatja. Egyutas ANOVA teszt, * vs. BASE, p<0,05.

5.2.3. Echokardiográfia

A kutatás második fázisának kezdetén és végén elvégzett echokardiográfiai analízis eredményeit az 5. táblázat szemlélteti. A ZDF kontroll csoportban a szisztolés paraméterek (EF, FS, MAPSE), valamint a diasztolés értékek (E-hullám sebessége, E/e arány és IVRT) rosszabbodtak a kezdeti értékekhez képest. Az enyhe, de szignifikáns Tei-index emelkedés

($0,491 \pm 0,014$ vs. $0,305 \pm 0,012$) globálisan romló szívfunkcióra utal. Az α -MSH-val kezelt állatok szisztolés értékei, mint a frakcionális rövidülés (FS), ejekciós frakció (EF) és a mitrális annulus kitérése (MAPSE), enyhe javulást mutattak a Kontroll csoporthoz képest. Az α -MSH-val kezelt patkányok FS és EF értékei szignifikánsan növekedtek a ZDF kontroll állatok értékeihez viszonyítva (FS: $32,33 \pm 0,421\%$ vs. $36,83 \pm 0,703\%$; EF: $66,50 \pm 0,067\%$ vs. $72,00 \pm 0,774\%$, ebben a sorrendben). Az α -MSH-val kezelt patkányok MAPSE értékei a normál tartományban maradtak [127, 128], a ZDF kontroll állatok MAPSE értékei viszont szignifikánsan romlottak ($2,268 \pm 0,010$ mm vs. $1,602 \pm 0,045$ mm). Az izovolumetriás relaxációs idő csökkenéséből látható, hogy az α -MSH-val kezelt csoport bal kamrai diasztolés funkciója enyhén javult a ZDF kontroll csoporthoz képest ($43,00 \pm 1,125$ ms vs. $58,00 \pm 1,826$ ms). A bal pitvar aorta átmérőhöz viszonyított mérete (LA/Ao) szemlélteti, hogy a ZDF kontroll állatok bal pitvarának átmérője nőtt az α -MSH-val kezelt állatokéhoz képest ($1,104 \pm 0,043$ vs. $0,945 \pm 0,029$). Az E/A és E/e', valamint a laterális e' értékeket nem befolyásolta a kezelés. A Tei-index (Myocardial Performance Index, MPI) emelkedettebb volt a beteg Kontroll patkányok esetében, mint az α -MSH-val kezelt patkányoknál, amely a Kontroll állatok globális szívfunkciójának romlására utal ($0,491 \pm 0,014$ vs. $0,392 \pm 0,013$). A bal kamrai kiáramlási pálya (LVOT) paraméterei is szignifikánsan emelkedettebbnek bizonyultak az α -MSH-val kezelt csoportban, mint a ZDF kontroll csoportban. Az α -MSH kezelés mérsékelten növelte a véráramlási sebességet (V), valamint a nyomásgradienst (PG) (LVOTV átlag: $0,441 \pm 0,024$ m/s vs. $0,553 \pm 0,019$ m/s; LVOT átlag PG: $1,095 \pm 0,088$ Hgmm vs. $1,592 \pm 0,106$ Hgmm). Következésképpen, a verőtér fogat (SV) és a perctér fogat (CO) értékek is emelkedtek a kezelt állatoknál (SV: $0,406 \pm 0,046$ mL vs. $0,581 \pm 0,030$ mL; CO: $77,55 \pm 7,763$ mL/perc vs. $112,30 \pm 6,110$ mL/perc, ebben a sorrendben). Az anesztézia alatt végrehajtott echokardiográfias vizsgálat során nem mutatottunk ki különbséget a csoportok szívfrekvenciájában (HR).

Paraméter	BASE	Kontroll	MSH
LA/Ao arány	$1,133 \pm 0,039$	$1,104 \pm 0,043$	$0,945 \pm 0,029$ *
LV ejekciós frakció (%)	$73,17 \pm 1,973$	$66,50 \pm 0,067$ #	$72,00 \pm 0,774$ *
LV frakcionális rövidülés (%)	$37,50 \pm 1,500$	$32,33 \pm 0,42$ #	$36,83 \pm 0,703$ *
IVSd (mm)	$1,845 \pm 0,164$	$1,550 \pm 0,044$	$1,613 \pm 0,099$
LVIDd (mm)	$7,038 \pm 0,048$	$7,747 \pm 0,328$	$7,688 \pm 0,248$
IVSs (mm)	$2,603 \pm 0,075$	$2,143 \pm 0,093$ #	$2,097 \pm 0,103$
LVIDs (mm)	$4,385 \pm 0,103$	$5,232 \pm 0,226$	$4,858 \pm 0,117$
Verőtér fogat (mL)	$0,428 \pm 0,037$	$0,406 \pm 0,046$	$0,581 \pm 0,030$ *
Perctér fogat (mL/perc)	$99,89 \pm 8,236$	$77,55 \pm 7,763$	$112,30 \pm 6,110$ *
HR (ütés/perc)	$235,8 \pm 8,462$	$192,7 \pm 4,185$ #	$193,3 \pm 6,259$ #
LVOT maxPG (Hgmm)	$3,173 \pm 0,217$	$2,698 \pm 0,254$	$3,765 \pm 0,284$ *

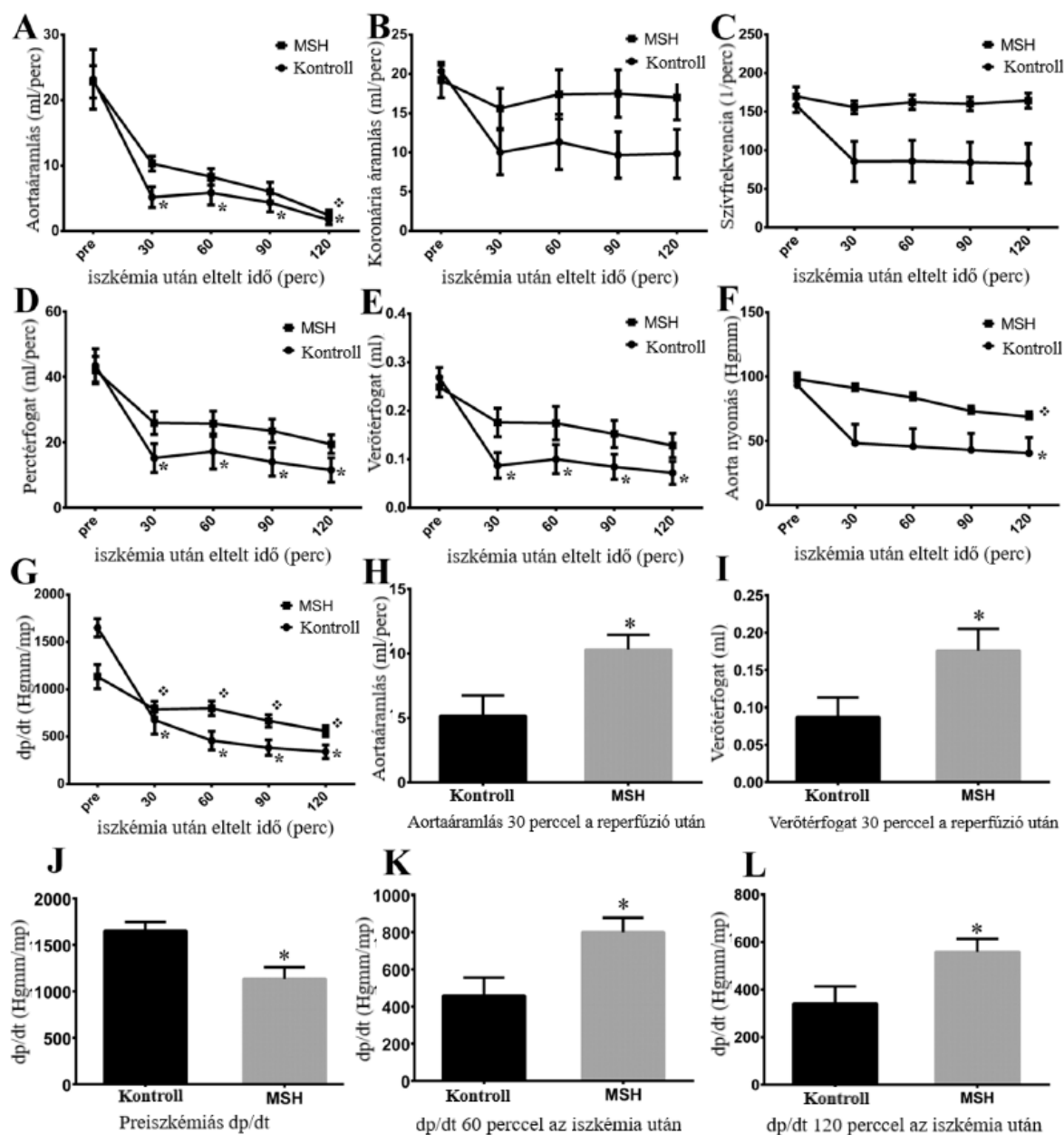
LVOT átlagPG (Hgmm)	1,178 ± 0,138	1,095 ± 0,088	1,592 ± 0,106 *
LVOT Vmax (m/s)	0,887 ± 0,029	0,818 ± 0,038	0,965 ± 0,036 *
LVOT Vátlag (m/s)	0,447 ± 0,032	0,441 ± 0,024	0,553 ± 0,019 *
Laterális e' (mm/s)	39,50 ± 1,803	26,83 ± 1,939 #	28,33 ± 0,614
MV E sebesség (m/s)	0,887 ± 0,025	0,743 ± 0,014 #	0,710 ± 0,027
MV A sebesség (m/s)	0,477 ± 0,027	0,438 ± 0,022	0,403 ± 0,018
MV E/A arány	1,885 ± 0,109	1,802 ± 0,048	1,770 ± 0,101
MV decelerációs idő (ms)	55,67 ± 3,333	66,67 ± 3,201	85,50 ± 5,258 *
E/e' arány	22,59 ± 0,832	28,47 ± 2,220 #	25,11 ± 1,070
MAPSE (mm)	2,167 ± 0,061	1,602 ± 0,045 #	2,268 ± 0,010 *
Ejekciós idő (ms)	100,7 ± 2,459	83,17 ± 2,926 #	93,17 ± 3,877
IVCT (ms)	18,50 ± 1,708	23,50 ± 1,727	17,83 ± 0,703 *
IVRT (ms)	25,00 ± 1,390	58,00 ± 1,826 #	43,00 ± 1,125 *
MPI (Tei-index)	0,305 ± 0,012	0,491 ± 0,014 #	0,392 ± 0,013 *

5. táblázat. Az α -MSH-val kezelt és a kezeletlen kontroll ZDF állatok kezdeti, és a kísérlet végén elvégzett echokardiográfiás vizsgálatának paraméterei. Az ejekciós frakció (EF), frakcionális rövidülés (FS), verőtér fogat (SV), perctér fogat (CO) és a mitrális annuláris sík kitérése (MAPSE) emelkedett a kezelt csoportban. Az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) és izovolumetriás kontrakciós idő (IVCT) megnyúlt a ZDF patkányokban, de rövidült a kezelt az α -MSH-val kezelt csoportban. A miokardium globális munkavégzése (MPI, Tei-index) és a bal pitvar aortához viszonyított aránya (LA/Ao) szintén javult a kezelés hatására. A statisztikai különbségek meghatározásához egyutas ANOVA tesztet használtunk. # vs. BASE (kezdeti értékek), $p < 0,05$; * vs. Kontroll, $p < 0,05$.

5.2.4. Izolált „dolgozó szív” modell eredmények

Az α -MSH iszkémiás szívre kifejtett hatását izolált „dolgozó szív” modell segítségével vizsgáltuk 6 héttel a sebészeti beavatkozás után. A 6 hetes kezelésnek nem volt hatása sem a Kontroll, sem az α -MSH-val előkezelt állatokból származó szívek kontraktilis funkciójának preiszkémiás paramétereire, beleértve az aorta kiáramlást, a koronária átáramlást, a szívfrekvenciát, a perctér fogatot, a verőtér fogatot és aortanyomást (16. ábra). Noha a preiszkémiás értékekben jelentős különbség nem mutatkozott, a kifejlődött nyomás idő deriváltja szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az MSH csoportban a Kontroll csoporthoz képest (16H ábra). Érdekes módon, a reperfüzió 60. és 120. percében a dp/dt szignifikánsan magasabb volt az MSH-csoportban, mint a Kontroll paraméterek ugyanabban az időpillanatban (16K,L ábra). Sőt, mi több, 30 perccel a globális iszkémia után az MSH-val kezelt állatok AF és SV értékei magasabbak voltak, mint a kezeletlen, kontroll állatok értékei (16I, J ábra). Ezenkívül, az iszkémia utáni helyreállítás végén, a Kontroll patkányok AF (1,667

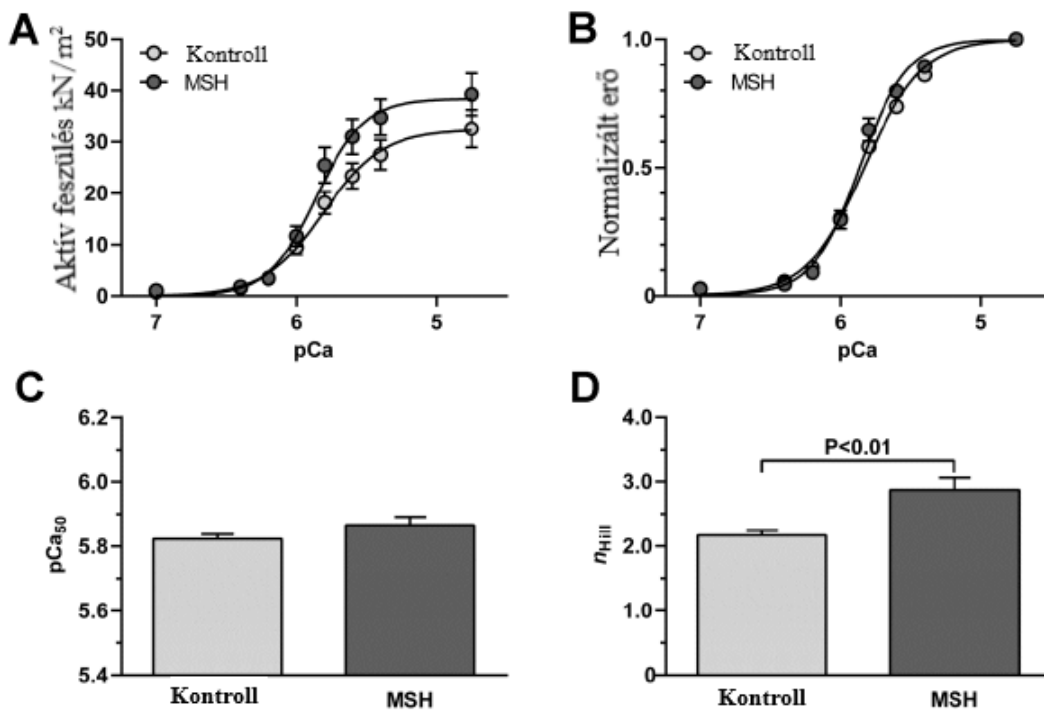
$\pm 0,711$; 16A ábra), CO ($11,500 \pm 3,708$; 16D ábra), SV ($0,072 \pm 0,024$; 16E ábra), AoP ($40,500 \pm 12,230$; 16F ábra) és dp/dt ($341,700 \pm 71,830$; 16G ábra) értékei szignifikánsan csökkentek a preisztkémiás állapothoz képest (AFpre: $23,170 \pm 4,554$; COpre: $43,500 \pm 5,054$; dp/dtpre: $1650 \pm 96,120$; Aopre: $93,330 \pm 9,482$ és SVpre: $0,268 \pm 0,021$). Ezzel ellentétben, az MSH-val kezelt állatok esetében, csak a posztisztkémiás AF ($2,400 \pm 0,778$), AoP ($68,800 \pm 3,952$) és dp/dt ($558,300 \pm 55,630$) mutatott szignifikáns csökkenést a preisztkémiás értékekhez képest (AFpre: $22,800 \pm 2,480$; dp/dtpre: $1133 \pm 127,200$; Aopre: $98,200 \pm 2,760$). Más szóval, annak ellenére, hogy néhány jelentős különbséget ki tudtunk mutatni a párhuzamos mérések eredményei között, az MSH-val kezelt kísérleti csoport posztisztkémiás CO ($19,400 \pm 2,849$) és SV ($0,128 \pm 0,025$) értékeiben észlelt preisztkémiás állapothoz viszonyított csökkenés (COpre: $42,000 \pm 4,195$; SVpre: $0,249 \pm 0,021$) nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. Ugyancsak nem találtunk szignifikáns különbséget a koronária áramlás és szívfrekvencia értékekben, sem a különböző kísérleti csoportok között, sem pedig egy csoporton belül különböző időpillanatokban mért értékek között (16B,C ábra).



16. ábra. Az izolált szívmodell eredményei. (A) aorta kiáramlás értékek; (B) koronária átáramlás értékek; (C) szívfrekvencia értékek; (D) perctérfogat értékek; (E) verőtérfogat értékek; (F) aorta nyomás értékek; (G) dp/dt értékek; (H) aortaáramlás 30 perccel a reperfúzió után; (I) verőtérfogat 30 perccel a reperfúzió után (J) preiskémiás dp/dt értékek; (K) dp/dt 60 perccel az iszkémia után (L) dp/dt 120 perccel az iszkémia után. Egyutas ANOVA-t használtunk (16A-G ábra) a statisztikai különbségek meghatározásához, minden adat a csoportok átlagát \pm SEM jelenti. * $p < 0,05$ a preiskémiás Kontroll értékekhez viszonyítva. \diamond $p < 0,05$ a preiskémiás MSH-kezelt csoporthoz viszonyítva. * $<0,05$ a Kontroll értékekhez viszonyítva az izolált szívmodell azonos időpillanataiban (Student t-próba, 2H-L ábra).

5.2.5. Az α -MSH kezelést követő fokozott kardiomiocita kontraktilis teljesítmény

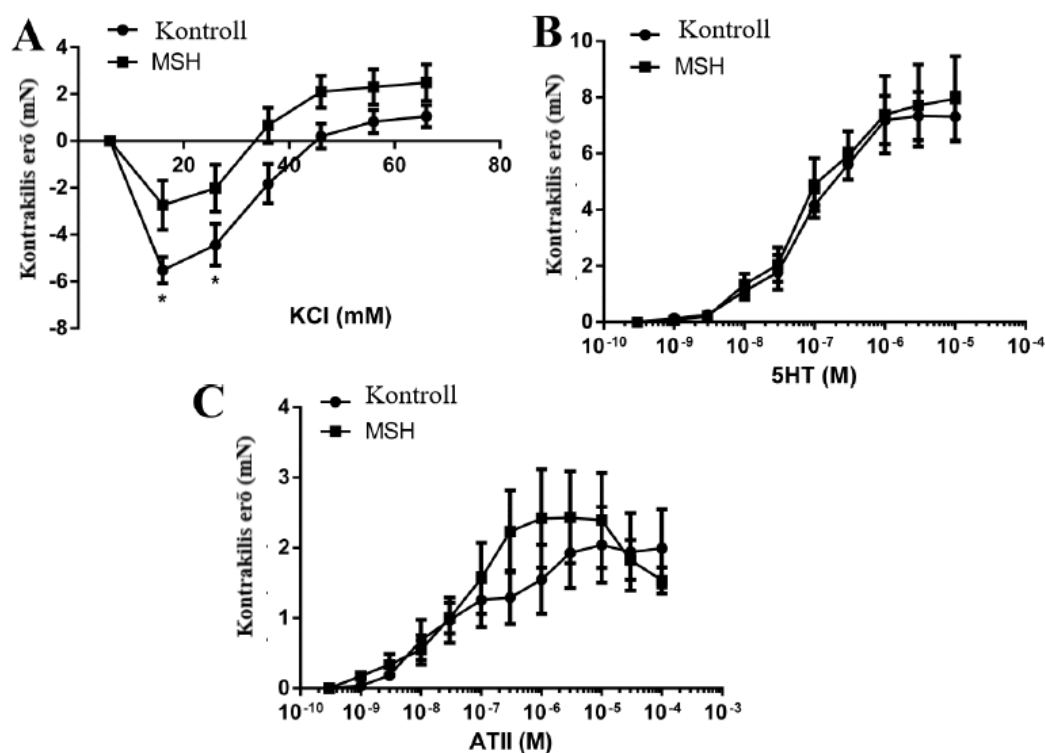
A bal kamrai kardiomiociták aktív feszülés-pCa kapcsolata (17A ábra) szemmel látható α -MSH-indukált változásokat mutat a ZDF patkányok celluláris mechanikai teljesítményében. A kezeletlen vs. α -MSH-val kezelt kísérleti állatokból származó bal kamrai kardiomiociták magasabb aktív feszülésre való hajlamot mutattak (pCa 5,6-nál: $31,04 \pm 3,44$ kN/m², $p=0,08$; pCa 5,8-nál: $25,50 \pm 3,43$ kN/m² vs. $18,13 \pm 2,15$ kN/m², $p=0,08$). A kezelt vs. kontroll állatokból származó LV kardiomiociták normalizált erő-pCa kapcsolata hasonló Ca-érzékenységet jelzett (pCa₅₀: $5,87 \pm 0,03$ vs. $5,82 \pm 0,02$; 3C ábra), de szignifikánsan magasabb Hill együtthatót (n_{Hill} : $2,87 \pm 0,19$ vs. $2,17 \pm 0,08$; 3D ábra), ami az α -MSH-val kezelt csoportban jelenlévő jobb miofilamentum kooperációra utal.



17. **ábra.** A bal kamrai kardiomiociták α -MSH kezelést követő fokozott kontraktilis teljesítménye. **(A)** Aktív feszülés és pCa kapcsolata; **(B)** Normalizált erő-pCa kapcsolat; **(C)** a B ábrán látható Ca-érzékenységi görbék 'fél-értéke' jelzi a miofilamentumok Ca-érzékenységét (pCa₅₀); **(D)** a B ábrán látható Ca-érzékenységi görbék meredeksége jelzi a miofilamentumok kooperációját, a Hill együtthatóként (n_{Hill}). Az adatok csoportonként $n=12$ kardiomiocita (3-4 szívből/csoport) átlagértékeiként \pm SEM vannak megadva. A 'p' értéket a párosítatlan t-próba segítségével számoltuk ki, és $p<0,01$ -ként szerepel.

5.2.6. Az agyi erek vaszkuláris státusza

Szignifikánsan magasabb hiperpolarizáció-indukált relaxáció volt megfigyelhető a ZDF kontroll állatokban, az α -MSH-val kezelt állatokhoz képest ($5,52 \pm 0,56$ mN a ZDF-eknél vs. $2,73 \pm 1,05$ mN az α -MSH-val kezelt ZDF-eknél $p < 0,05$ 16 mM KCL-al), habár nem mutatkozott különbség a 66 mM KCL hatására létrejött maximális kontraktilis erőben ($1,06 \pm 0,466$ mN a Kontroll csoportban vs. $2,49 \pm 0,77$ mN az α -MSH-val kezelt csoportban), a kontraktilis erőt mérő kísérletek során (18A ábra).

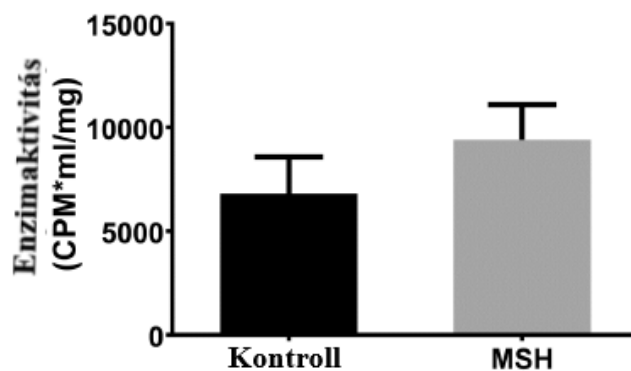


18. ábra. Az agyi erek vaszkuláris státusza – kontraktilis erő mérések. (A) KCl által kiváltott válaszok; (B) szerotonin (5-HT) által kiváltott válaszok; (C) Angiotenzin II (ATII) által kiváltott válaszok. * $p < 0,05$, minden adat átlagértékeket tükröz \pm SD.

Nem találtunk különbséget a két csoport szerotoninra adott válaszában (a maximum dózisu 5-HT-ra ($10 \mu\text{M}$), $7,31 \pm 0,85$ mN a Kontroll csoportban vs. $7,95 \pm 1,51$ mN az alfa-MSH-val kezelt csoportban, 18B ábra). Ugyancsak nem találtunk jelentős különbséget a két csoport ATII-re produkált kontrakcióiban sem (a maximum dózisu ATII-re ($100 \mu\text{M}$), $1,99 \pm 0,55$ mN a Kontroll csoportban vs. $1,53 \pm 0,188$ mN az alfa-MSH-val kezelt csoportban, 18B ábra).

5.2.7. NADPH oxidáz aktivitás

Az α -MSH-val kezelt, illetve a kezeletlen Kontroll csoport bal kamrai NADPH oxidáz aktivitása nem különbözött szignifikánsan (19. ábra).



19. ábra. Az α -MSH kezelés hatása a NADPH által stimulált bal kamrai szövet homogenizátumok NADPH oxidáz aktivitására. Az adatok a csoportok átlagértékeiként szerepelnek \pm SEM (Student t-próba). A minták enzimaktivitását kétszer mértük meg, és az átlagok átlagát ábrázoltuk. CPM, Count Per Minute (Percenkénti Szám); NADPH, nikotin adenin dinukleotid foszfát; MSH, alfa-melanocita stimuláló hormon.

6. Megbeszélés

Az α -MSH, a proopiomelanokortin neuropeptid származéka egy szekretált melanotropin (melanocita stimuláló hormon), ami a melanokortin receptorokhoz kötődik, és több fiziológias hatása van, elsődlegesen a tápanyagfelvétel szabályozása, aminek súlycsökkenés és az elhízás elkerülése lehet a következménye – valamint a cukorbetegség kockázatának csökkenése [129]. A humán metabolikus rendszerre kifejtett hatásain túl korábbi kutatások igazolták, hogy a kardiovaszkuláris rendszerre is pozitív befolyással bír, ugyanis szerepe van az iszkémia/reperfúzió következtében kialakult károsodások megelőzésében, illetve csökkentésében [38]. Kutatásunkban egyrészt a rövidtávú α -MSH kezelés hatását kívántuk vizsgálni egészséges patkányok iszkémia/reperfúzióknak kitett szívének funkciójára, illetve ennek a hatásnak a HO-1 általi függőségét; másrészt a hosszú távú α -MSH kezelés hatását egy eleve patológias állapotban (diabéteszben) fellépő iszkémia/reperfúzió okozta kardiális károsodásokra, valamint a metabolikus paraméterekre.

A 8A, B ábrán (ebben a sorrendben) bemutatott EF-re és FS-re kifejtett α -MSH hatás echokardiográfiai elemzése szemlélteti, hogy a hormon adminisztrációja korrelál ezen paraméterek szignifikáns emelkedésével. Elképzelhető, hogy ezek a hatások az emelkedett szimpatikus aktivitásnak köszönhetőek, mivel közismert, hogy az α -MSH és analógjai enyhe szimpatikus aktivitásfokozó hatással bírnak a kardiovaszkuláris rendszerben, mint az emelkedett szívfrekvencia, ezáltal befolyással lehetnek a szisztolés aktivitásra [130]. Az α -MSH adminisztráció ezen ejekciós frakciót emelő hatását korábban más szerzők is leírták sertésben kialakult szisztémás inflammatorikus válasz szindrómában [131]. Az izolált „dolgozó szíveken” megfigyelt kardiális funkciókra kifejtett hatások (9. ábra) magukban foglalják a 9A ábrán szemléltetett eredményeket, miszerint a II. protokoll alapján alkalmazott α -MSH kezelés emelte az izolált „dolgozó szívek” EKG-val regisztrált ütési frekvenciáját a reperfúzió kezdeti szakaszában. Az α -MSH HR-emelő hatását más állatmodelleken is bizonyították [132, 133]. A HO-1 aktivitás hozzájárulását az a megfigyelés támasztja alá, hogy a hormon által kiváltott HR-emelkedést az SnPP adminisztráció, ami egy HO-1 inhibitor szer, ellensúlyozta. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy az SnPP + α -MSH-val kezelt csoportban észlelt szembetűnően alacsony szívfrekvencia értékek részben a tanulmányban említett számos súlyos aritmiás esemény következményei is lehettek. Az α -MSH előkezelés szignifikánsan emelte a CF (9B ábra) és az AF (9C ábra) értéket is, mind a preiszkémias, mind pedig a reperfúziós időtartam alatt. Ezek a hatások szintén szignifikánsan HO-1-függőek voltak, mivel a hormon által indukált CF és AF

emelkedést az SnPP megakadályozta. Mindkét érték emelkedéséről bebizonyosodott, hogy összefüggésben állnak az izolált „dolgozó szív” modell során tapasztalt javult szívfunkcióval [134] és az iszkémiás eseményeket elszenvedett betegek jobb prognózisával [135, 136]. Ezek és az ehhez hasonló megfigyelések felvetik az α -MSH, valamint olyan hatóanyagok, melyek fokozzák a HO-1 expresszióját, iszkémia/reperfúzió-asszociált patológiás elváltozások megelőzésében és terápiájában történő lehetséges alkalmazását. Ezzel ellentétben, habár az α -MSH kezelés szignifikánsan emelte a perctérfogatot (9D ábra) és a verőtérfogatot (9E ábra), ez a hatás nem vagy csak részben volt HO-1-függő, mivel az SnPP nem volt képes megakadályozni ezen értékek emelkedését.

Egy további feltételezésünket, miszerint az α -MSH a szívfunkcióra tett vazoaktív befolyásának köszönhetően javította a kardiovaszkuláris funkciókat, a hormon adminisztrációjának direkt egészséges patkányszívre kifejtett hatása támasztja alá (10. ábra). A hormon adminisztrációja szignifikánsan emelte a kezelt állatok CF értékeit, szemben a kontroll értékekkel. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az α -MSH intenzív vazodilatatív hatást közvetít a koronária erekre, rámutatva egy további élettani hatásra, mely talán klinikai stratégiák kidolgozásában is szerepet játszhat olyan patológiás állapotok esetén, amelyekben specifikus erek célzott tágításával esetleges javulás érhető el. Ezek a megoldási lehetőségek az úgynevezett „bioterápiás” beavatkozások széles kategóriájába tartoznak – melyek a betegségek specifikus kiindulási okát hivatottak megszüntetni, ezáltal igazi „gyógyítást” jelentenek a csupán átmeneti javulást szolgáló tüneti terápia helyett [137].

Ez a kutatás az olyan hatóanyagoknak, mint az α -MSH, melyek modulálják a HO-1 aktivitását, további potenciális használati lehetőségeit vetette fel a kamrai aritmiákra való hajlam csökkentésében. Az α -MSH-indukált HO-1 aktivitás antiaritmiás kardioprotekcióban betöltött szerepének felderítésére EKG analízist alkalmaztunk. Ezek az eredmények azt mutatják (11. ábra), hogy az α -MSH kezelés – valószínűsíthetően a HO-1 indukción keresztül, gátolja az aritmiás események kialakulását a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporthoz képest. A hormonkezeléssel párhuzamosan alkalmazott SnPP a kamrai aritmiákra való hajlamot fokozta, ami arra utal, hogy a HO-1 ebben a vonatkozásban kardioprotektív hatású, amely eredmény megegyezik a tanulmány szerzői által korábban egér modellen elvégzett kísérletekkel [138]. A csak SnPP kezelésben részesülő patkányokhoz képest az SnPP + α -MSH-kezelt állatokban gyakrabban megjelenő súlyos aritmiák biológiai alapját képezheti az α -MSH által okozott HR-növekedés. A hormonnak ez a tulajdonsága, az SnPP proaritmiás hatásával kombinálva, amit az SnPP-kezelt csoportban figyeltünk meg, hozzájárulhat a súlyos aritmiás események

magasabb incidenciájához. Ezek az eredmények különösen figyelemfelkeltőek a tanulmány szerzőinek előző munkájának kontextusában, mely a természetben előforduló ginkgolid terpének vérlemezke-aktiváló faktorról, kalcineurinnal, valamint a makrolid immunszuppresszáns FK506-al való interakcióját mutatta be, a kamrai aritmiák szinergikus javításában a mostani modellel megegyező módon [139]. Ezáltal valószínűsíthető, hogy az α -MSH ezekkel a hatóanyagokkal klinikailag releváns szinergizmust eredményez a kardiális aritmiák kezelésének tekintetében.

A 12. ábra szemlélteti az izolált, fenilefrin által prekontrahált aorta gyűrű modell kísérlet eredményeit, melyet az első fázis V. protokollja szerint végeztünk el, az α -MSH antivazokonstriktív hatásának felderítése érdekében. A kísérlet eredményei azt láttatják, hogy az α -MSH kezelés nem eredményezett direkt módon szignifikáns változást a nyugalmi vaszkuláris tónusban. Mindazonáltal, ezzel ellentétben a prekontrahált aorta gyűrűk szignifikáns relaxáción mentek keresztül válaszul az α -MSH adminisztrációra. Az 1 μ M α -MSH koncentráció hatására kialakult maximális relaxáció (a kezdeti kontrakciós erő százalékos arányában kifejezve, átlag \pm SEM) nem különbözött szignifikánsan a naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt csoportok között. Így az α -MSH vaszkuláris tónusfokozó hatása (az α 1 adrenoreceptorok stimulálásán keresztül) feltehetően független az intima jelenlététől, csakúgy, mint az endotélium prosztaciklin, illetve NO-termelő képességétől. Ezen eredmények, valamint a hormon fenilefrin-kezelt aorta gyűrűkre gyakorolt szignifikáns relaxáló hatása azt vetítik elő, hogy az α -MSH potenciális szereppel bírhat olyan terápiás rendszerek felállításában, ahol a betegek prognózisának javítása érdekében a vazodilatáció egy fontos és elvárt tényező [140, 141]. Ezenkívül, az eredményeink alapján feltételezhető vaszkuláris tónusra kifejtett endotélium-independens α 1-adrenoreceptor-mediált hatások betekintést engednek jövőbeli gyógyszerfejlesztési lehetőségekbe, melyekben talán specifikus betegség-támadáspontokat azonosíthatunk és hasznosíthatunk [142].

Az α -MSH előkezelés képessége az iszkémia/reperfúzió-idukált infarktus területének csökkentésére (13. ábra), a hormon által produkált kardioprotektív hatásspektrum egy újabb bizonyítékát jelentheti. Ahogy az a 13. ábrán látható, ennek a hatásnak az egyik leglényegesebb mechanika alapja a HO-1 citoprotektív képességében rejlik, hiszen az enzim SnPP általi gátlása megakadályozta az I/R által okozott infarktus területének csökkentését nemcsak az α -MSH-kezelt szívekben, hanem a kontroll állatokban is. A tanulmány szerzői kiterjedten vizsgálták azokat a folyamatokat, melyek szerepet játszanak az iszkémia/reperfúzió által okozott infarktus-asszociált szöveti károsodásban, valamint azokat a módszereket, melyek segítségével

a HO-1 expresszió fokozásán keresztül moderálni lehetne ezeket a károkat [143, 144]. A szerzők által végzett kutatások az infarktus méretét meghatározó mechanizmusok irányában azt sugallják, hogy a HO-1 antioxidáns kapacitása felerősíti a kardiomiocitákon belüli, valamint a kardiovaszkuláris szövetben megtalálható egyéb sejtekben lévő iongyökök kompartmentalizációját, melyek integritása a posztisztkémiás reperfúzió következtében létrejött reoxigenizációs periódus során felgyülemlett reaktív oxigénradikálok miatt sérül [145, 146].

A 14. ábrán bemutatott fehérje expressziójának szignifikáns növekedése, valamint az α -MSH által stimulált miokardiális HO-1 aktivitás azt bizonyítja, hogy a hormon képes fokozni ezt a fontos adaptációs választ, ami tovább hangsúlyozza a terápiás alkalmazásának lehetőségét. A HO-1 farmakológiai amplifikációjáról korábban kiderült, hogy erős helyreállító szereppel bír a kardiovaszkuláris betegségek mellett a tüdő, vese és központi idegrendszer rendellenességeiben is [33].

A jelen tanulmány második fázisának eredményei rávilágítanak arra, hogy az α -MSH-val kezelt cukorbeteg állatok kisebb mértékű súlygyarapodást produkáltak a csak vivőanyaggal kezelt patkányokhoz képest, habár ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, valószínűsíthetően az alacsony mintaelemszám miatt. Ennek ellenére, a kísérlet végén szignifikáns különbséget tapasztaltunk az α -MSH-val kezelt kísérleti állatok bal kamra tömegének teljes testhez viszonyított tömegében a Kontroll patkányok értékeihez viszonyítva (4. táblázat). Ennek fő magyarázata lehet, hogy a kontroll állatok bal kamrájának fala jelentősebb vastagodáson ment keresztül, mint az α -MSH-val kezelt csoport tagjainak bal kamrája. Mivel ez a jelenség, ami ventrikuláris hipertrófia néven ismert, emelkedett kockázatot jelent az iszkémiás szívelégtelenség kialakulására [147, 148], az ebben a kutatásban szereplő, jótékonynak bizonyuló α -MSH kezelés, potenciálisan humán klinikai alkalmazásba kerülhet.

A tanulmány megírásának idejében csupán kevés publikáció számolt be az α -MSH kezelés és a vér koleszterinszintjének kapcsolatáról. Sőt, mi több, az itt leírt eredmények arra utalnak, hogy az α -MSH nem direkt módon befolyásolja a szérumban a teljes koleszterinszintjét, magas sűrűségű lipoprotein tartalmát (HDL) vagy trigliceridszintjét. Mindazonáltal, más kutatók által kiadott közlemények beszámolnak a hormon koleszterinhez kapcsolt patológias folyamatokra kifejtett hatásáról. Például, finn tudósok kimutatták az 1-es és 3-as melanokortin receptor szerepét – amihez valószínűsíthetően az α -MSH is kötődik – az ateroszklerotikus plakkformáció megelőzésében, habár ennek a folyamatnak a mechanizmusát egyelőre homály feddi [148]). Az is kiderült, hogy a melanokortin 4 receptor koleszterin-függő endocitózisa elengedhetetlen az α -MSH-val szembeni receptoriális válaszkésztség fenntartásában [149]. A

fenti eredmények érdekesek, de nem teremtenek egyértelmű direkt funkcionális kapcsolatot a koleszterin homeosztázis és az α -MSH aktivitás között. További jelentős megfigyzés, hogy a ZDF patkánymodell nem minősül optimálisnak a hiperkoleszterinémia patológiájának kutatásához.

Korábbi tanulmányok igazolták az α -MSH centrális szabályozó hatását a táplálékfelvételben és zsír –, valamint glükóz homeosztázisban, csökkenti az étvágyat, és serkenti az energiafelhasználást [150, 151]. Az is bebizonyosodott, hogy az α -MSH képes limitálni a zsírlerakódást, a lipolízis elősegítésén keresztül [84, 152]. Ehhez kapcsolódó kísérletek demonstrálták, hogy α -MSH analógok krónikus centrális és akut perifériás adminisztrációja csökkentette a táplálékfelvételt és testsúlyt, valamint limitálta a magas zsírtartalmú táp által indukált elhízott egérmodellben fellépő inzulinrezisztenciát [153]. A fenti tanulmányt végző kutatók igazolták a hormon étvágyredukáló hatásának csökkenését. Ez a hatás valószínűleg a receptor deszenzitizációnak, illetve egy vagy két adaptív válasz szuperimpozíciójának köszönhető. Jelen kutatás az első, mely bemutatja a perifériásan adott (ozmotikus pompa segítségével) α -MSH vércukorszintre gyakorolt hatását, a cukorbetegség és elhízás vizsgálatára szolgáló ZDF patkánymodellben. Az itt használt kísérleti terv paraméterei a korábbi munkákkal történő párhuzamos, összehasonlítható vizsgálatok kivitelezését célozták, különböző modellek alkalmazásával. A megfigyelhető adattrendek kapcsolódó munkák mintáit követték, habár statisztikai szignifikancia nélkül (7. ábra).

Az 5. táblázatban bemutatott echokardiográfiai eredmények a hosszú távú α -MSH kezelés kardiovaszkuláris szisztolés és diasztolés funkciókra gyakorolt protektív szerepére utalnak. Ez az eredmény releváns a kutatásunk első fázisának eredményeihez, melyben különböző α -MSH dózisok (10, 100 és 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) akut egyszeri adminisztrációjának echokardiográfias paraméterekre kifejtett befolyását vizsgáltuk, és a szisztolés funkciók (EF, FS) szignifikáns javulását detektáltuk. A krónikus α -MSH kezelés hasonló hatást idézett elő. Különösképpen, a hormonterápiában részesülő állatok frakcionális rövidülése, ejekciós frakciója, verőtérfogata és perctérfogata emelkedett szignifikánsan a Kontroll patkányok értékeihez képest (FS: $32,33 \pm 0,421\%$ vs. $36,83 \pm 0,703\%$; EF: $66,50 \pm 0,067\%$ vs. $72,00 \pm 0,774\%$, SV: $0,41 \pm 0,046 \text{ mL}$ vs. $0,581 \pm 0,030 \text{ mL}$; CO: $77,55 \pm 7,763 \text{ mL}/\text{perc}$ vs. $112,30 \pm 6,110 \text{ mL}/\text{perc}$ ebben a sorrendben). A bal kamrai kiáramlási pálya (LVOT) értékei szintén emelkedtek a kezelt csoportban, direkt összefüggést demonstrálva az emelkedett EF, FS, SV és CO paraméterekkel, mint a szisztolés funkció jelzőivel (5. táblázat). Ezeket az eredményeket azzal a megfigyeléssel összhangban kell tekinteni, hogy a melanokortin analógok enyhe szimpatikus aktivitásfokozódást okoznak a

kardiovaszkuláris rendszerre nézve, úgymint emelkedett szívfrekvencia és vérnyomás. Mindazonáltal, az ebben a kutatásban in vivo, non-invazív farki-mandzsettás vérnyomásmérő rendszer segítségével – ami Térfogató Nyomás Rekorder (Volume Pressure Recording, VPR) szenzor technológiát használ – mért szisztolés és diasztolés értékek nem mutattak szignifikáns emelkedést (4. táblázat). Ennek a jelenségnek egy lehetséges magyarázata, hogy az α -MSH hosszú távú adminisztrációja ellensúlyozásra került a betegségmodellben, de mindazonáltal hasznos jövőbeni stratégiának bizonyulhat az elhízáshoz kapcsolódó betegségek terápiájában és megelőzésében.

Korábbi kutatások azt igazolták, hogy az α -MSH nem befolyásolja vagy csak nagyon csekély mértékben emeli a vérnyomást [38]. Sőt, a hormon más echokardiográfiai paraméterekre gyakorolt hatása is átgondolandó. Például, az emelkedett bal pitvar-aortagyök arány (LA/Ao), ami bal pitvari tágulásra utal. Ebben a tanulmányban az α -MSH csökkentette ezeket az értékeket, habár mindkettő az egészséges tartományban maradt. Az MV (mitrális billentyű) decelerációs időt (ms), ami a bal kamra remodellingnek és diasztolés diszfunkciónak egy erős prognosztikai markere, ugyancsak megvizsgáltuk. Azok a hatások, melyek modulálják a mitrális billentyű működését, megváltoztatják a korai és késői töltődés viszonyát is (E- és A-hullám), azzal együtt, ahogy az áramlás sebessége csökken a korai diasztolé alatt (E-hullám decelerációs idő) –, valamint a kamrák relaxációja után bekövetkező kamratöltődés időintervallumát is (amit izovolumetriás relaxációs időnek nevezünk, IVRT). Az α -MSH ozmotikus pumpa kezelés szignifikánsan javította a diabétesz-indukált diasztolés diszfunkciót. A kezelt állatok mitrális billentyű decelerációs idő ($66,67 \pm 3,201$ vs. $85,50 \pm 5,258$ ms) és IVRT ($58 \pm 1,826$ vs. $43,00 \pm 1,125$ ms) értékei javulást mutattak a kontroll állatokhoz képest. Jelen kutatás kísérletei kiterjedtek a mitrális annuláris sík szisztolés kitérésének (MAPSE) mérésére is, amit bal atrioventrikuláris sík elmozdulásának is nevezünk (AVPD). A mitrális gyűrű kitérése (MAE) vagy mitrális gyűrű elmozdulása egy M-módú mérésből származtatott érték, mely a bal kamra longitudinális funkciójának markere [154-156]. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy összefüggés van a csökkent MAPSE érték, valamint az életkor, illetve a miokardiális infarktuson átesett, szívelégtelenségben vagy pitvarfibrillációban szenvedő betegek bal kamra funkciója között [157-160], és hogy a MAPSE a hagyományos echokardiográfiai markereknél érzékenyebb paraméter a bal kamrai szisztolés funkció korai stádiumú romlásának detektálására [14, 161]. A MAPSE ezen kívül a kardiovaszkuláris problémákkal küzdő betegek esetén a major kardiális események és mortalitás prognosztikus paramétere [162]. A szívfunkció egy másik mérőszáma ebben a kutatásban a miokardiális

performációs index (MPI), ami egy egyszerűen elvégezhető, regisztrálható és jól reprodukálható, Doppler áram segítségével meghatározott érték. Humán viszonylatban, a MPI független az artériás nyomástól, a szívfrekvenciától, a ventrikuláris geometriától, az atrioventrikuláris billentyű regurgitációjától, illetve a fekvő helyzetben lévő páciensek pre- és afterload értékeitől. Az MPI, mint egyedülálló prognosztikus marker, használható a diabéteszes kardiális diszfunkció jellemzésére [163]. A kutatásunkban kimutattuk, hogy a hosszú távú α -MSH kezelés szignifikánsan javította mindkét paramétert; MAPSE: $1,602 \pm 0,045$ mm vs. $2,268 \pm 0,010$ mm, MPI: $0,491 \pm 0,014$ vs. $0,392 \pm 0,013$.

A Langendorff-apparátusban kivitelezett izolált „dolgozó szív” modell során (16. ábra) szignifikánsan emelkedett preisztkémiás nyomásváltozást mértünk (dp/dt) az MSH csoportban a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. Szintén a 16. ábrán látható, hogy az iszkémia/reperfúziós sérüléshez kapcsolatosan az AF, dp/dt, AoP értékek szignifikánsan csökkentek mindkét csoportban a preisztkémiás értékekhez viszonyítva. Annak ellenére, hogy majdnem minden eredmény romlott a 120 perc reperfúzió végére, emelkedett AF és SV értékeket mértünk az α -MSH-val kezelt csoportban a kontroll értékekhez képest, a reperfúzió 30. percében. Sőt, mi több, a hormonterápiában részesülő állatok posztisztkémiás CO és SV paraméterei nem csökkentek szignifikánsan a kiindulási, preisztkémiás értékekhez képest. Ezek az eredmények konzisztensek az első fázis eredményeivel, miszerint az α -MSH kezelés szignifikánsan csökkenti az iszkémia/reperfúzió indukálta infarktus területének méretét, növeli a CO és SV nagyságát, ezáltal további bizonyítékul szolgálnak a hormon kardioprotektív hatásainak igazolásához. Mindazonáltal, a tanulmány megjelenésének időpontjáig kevés tudományos kutatás célozta meg ennek a hatásnak a felderítését, további vizsgálatok szükségesek. Kapcsolódó közlemények jelentős felfedezése, hogy a melanocita stimuláló hormon iszkémiát megelőző adminisztrációja javította az iszkémiát követő funkció helyreállítását [164] [31]. Továbbá, jelen tanulmány első fázisa, valamint korábbi közlemények demonstrálták, hogy a melanokortinok védelmet nyújtanak a nyújtott időtartamú miokardiális iszkémia/reperfúzió által okozott szövetkárosodással szemben, a HO-1, JAK/ERK/STAT szignalizáció aktiválásán keresztül, valamint a pro-inflammatorikus TNF- α , pro-inflammatorikus/pro-apoptotikus pJNK faktor expressziójának csökkentése révén, illetve a nervus vagus által mediált kolinerg és anti-inflammatorikus útvonal aktiválásával [31, 165]. A kardiomiocita kontrakciós teljesítmény adatainak elemzése javult aktin-miozin kölcsönhatást, illetve a magasabb aktív feszülésre való hajlandóságot mutatott – ami fejlettebb kardiomiocita mechanikai teljesítményre enged következtetni, mely hozzájárulhat az α -MSH globális

kardiális kontraktilitásra gyakorolt jótékony hatásához (17. ábra). Ezzel ellentétben úgy tűnik, hogy az α -MSH-nak nincs hatása a kontraktilis apparátus Ca-érzékenységére. Sőt, mi több, az is kiderült, hogy az α -MSH semmilyen káros hatást nem gyakorol a cerebrális vaszkuláris simaizomra. Pontosan, nem változtatta meg a KCl, szerotonin, illetve angiotenzin-II-re adott választ (18. ábra) – ami az α -MSH általi stimulációra adott vaszkuláris válasz hiányára utal.

Korábbi tanulmányokkal összhangban, az egyik legfőbb hipotézis, ami a hormon protektív hatását magyarázhatja, az az immunmoduláns, anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonsága [166, 167]. Ezek a jelenségek a jelen kutatás megtervezésének egyik legfőbb alapjául szolgáltak, mely terv magában foglalta a NADPH oxidáz enzim aktivitásának mérését, melynek eredményeit a 19. ábra szemlélteti. Mindazonáltal a kutatás lényeges limitáló tényezője, hogy a hormon antioxidáns kapacitását csupán a NADPH oxidáz aktivitásmérésével igazoltuk. A hormon jótékony hatásainak tisztázására szolgáló további lehetséges mechanizmusok intenzív kutatások tárgyát képezik.

7. Összefoglalás

Ez a kutatás összhangban van korábbi, az α -MSH széles kardiprotektív spektrumát bizonyító kutatások következtetéseivel. Az eredményeink rámutatnak, hogy ezen vegyület alkalmazása releváns lehet a kardiovaszkuláris betegségek „bioterápiás” menedzselésében a vazodilatáció specifikus aspektusain keresztül, illetve, hogy a hosszú távú, mini ozmotikus pumpával történő α -MSH kezelés jelentős potenciállal rendelkezik a diabétesz által indukált szisztolés vagy diasztolés kardiális diszfunkció megelőzésében és terápiájában. A tanulmány legjelentősebb eredményei közé tartozik az echokardiográfiás vizsgálat, ami a vegyület szisztolés paramétereire kifejtett javító hatását reprezentálja (ejekciós frakció), a szívfunkciós kísérletek, melyek a HR, CF és AF-re gyakorolt kedvező befolyást igazolják, a felfedezés, hogy az α -MSH képes csökkenteni az iszkémia/reperfúzió következtében kialakult infarktus méretét, valamint a 2-es típusú cukorbetegséggel összefüggő metabolikus eltérések javítása. A hormon potens antiaritmiás tulajdonságokkal rendelkezik, illetve jelentős vazodilatációt ért el a koronária ereken – mely képessége célzott erek dilatációjának potenciális eszközévé teheti a későbbiek során. További jelentős következtetése a jelenlegi tanulmánynak, hogy a HO-1 szükséges a legtöbb α -MSH által kiváltott sejt, - illetve szövetszintű folyamathoz. Mindazonáltal, néhány potenciálisan jótékony hatásról – mint pl. a CO és SV változás – kiderült, hogy függetlenek a HO-1 aktivitásától, mivel a HO-1 gátló, SnPP-kezelés nem befolyásolta a kialakulásukat.

Egy bizonyos betegség eredendő okainak ilyen precíz célzott megoldása képezi a „bioterápiás” megközelítés centrális koncepcióját, ami az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet (National Institute of Health, NIH) fő, irányadó politikájává fejlődött, és melynek célja, hogy a betegségeket a gyökerüknél fogva semmisítsük meg, ahelyett, hogy csupán analgetikus vagy palliatív, tünetcsökkentő megoldást nyújtanánk [168]. A tanulmányunk eredményei különösen nagy jelentőséggel bírnak a szerzők további munkájának vonatkozásában, akik számos preventív és terápiás alkalmazási lehetőséget dolgoztak ki különböző fitokémiai HO-1 induktorok számára [137, 169], mely törekvések jól korrelálnak az NIH „bioterápiás” megközelítés koncepciójával.

Summary

This investigation is consistent with results of other studies demonstrating a diverse range of cardioprotective effects mediated by α -MSH. Our results prove that this compound might be relevant to the “biotherapeutic” management of cardiovascular diseases through specific effects on aspects of vasodilation, and that long-term α -MSH therapy with osmotic mini pump has significant potentiation in the prevention or therapy of diabetes induced systolic or diastolic cardiac dysfunction. Major findings of this study include echocardiographic outcomes that suggest its effects on systolic parameters of the heart (ejection fraction), along with outcomes of cardiac function experiments demonstrating favorable influences on HR, CF, and AF, the information that α -MSH is able to decrease the territory of cardiac infarction caused by ischemia/reperfusion and to ameliorate the metabolic changes evoked by type 2 diabetes mellitus. The hormone showed potent antiarrhythmic properties and further promotes intensive dilatative effects on coronary vasculature—a finding that will potentially allow development of interventions that specifically target selected blood vessels for dilation. A further important finding of this investigation is that most of the cellular and tissue processes studied required the activity of HO-1 as a downstream effector of α -MSH. Nevertheless, some of the potentially beneficial effects, such as changes in CO and SV, were observed to occur independently of HO-1 activity, as evidenced by insensitivity of these processes to treatment with the HO-1 inhibitor, SnPP.

Such precise targeting of the underlying causes of a particular disease process is the core concept of “biotherapeutic” approaches which have emerged as a major policy of the US National Institutes of Health (NIH) on developing medical strategies that attack a disease at its roots, rather than merely providing analgesic and palliative relief from symptoms. 34 These findings are particularly significant to ongoing work by the authors, who have developed numerous preventive and therapeutic applications for phytochemical HO-1 inducers, which attempts correlate well with the „biotherapeutic” approach of the NIH.

8. Irodalomjegyzék

1. Nadella, S., J.A. Indyk, and M.K. Kamboj, *Management of diabetes mellitus in children and adolescents: engaging in physical activity*. Transl Pediatr, 2017. **6**(3): p. 215-224.
2. Adameova, A., et al., *Hypercholesterolemia abrogates an increased resistance of diabetic rat hearts to ischemia-reperfusion injury*. Mol Cell Biochem, 2007. **295**(1-2): p. 129-36.
3. Kautzky-Willer, A. and J. Harreiter, *Sex and gender differences in therapy of type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2017. **131**: p. 230-241.
4. Baxter, M., *Treatment of type 2 diabetes: a structured management plan*. Adv Ther, 2008. **25**(2): p. 106-14.
5. Naito, R. and K. Miyauchi, *Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus Current Treatment Strategies and Future Perspective*. International Heart Journal, 2017. **58**(4): p. 475-480.
6. Rana, B., et al., *Evaluation of Therapeutic Effectiveness of Prescribed Medications in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Findings from a Tertiary Care Hospital, Lahore, Pakistan*. J Pharm Bioallied Sci, 2017. **9**(2): p. 121-125.
7. Gant, C.M., et al., *Integrated Assessment of Pharmacological and Nutritional Cardiovascular Risk Management: Blood Pressure Control in the DIAbetes and LifEstyle Cohort Twente (DIALECT)*. Nutrients, 2017. **9**(7).
8. Woo, V.C., et al., *Considerations for Initiating a Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor in Adults With Type 2 Diabetes Using Insulin*. Can J Diabetes, 2018. **42**(1): p. 88-93.
9. Maarman, G.J., et al., *Review of a causal role of fructose-containing sugars in myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury*. Nutr Res, 2017. **42**: p. 11-19.
10. Huisamen, B., et al., *Early cardiovascular changes occurring in diet-induced, obese insulin-resistant rats*. Mol Cell Biochem, 2012. **368**(1-2): p. 37-45.
11. Katakam, P.V., et al., *Myocardial preconditioning against ischemia-reperfusion injury is abolished in Zucker obese rats with insulin resistance*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R920-6.
12. Lear, T., et al., *Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced anorexia in Japanese quail (Coturnix japonica) likely involves the ventromedial hypothalamus and paraventricular nucleus of the hypothalamus*. General and Comparative Endocrinology, 2017. **252**: p. 97-102.
13. Wellhauser, L., J.A. Chalmers, and D.D. Belsham, *Nitric Oxide Exerts Basal and Insulin-Dependent Anorexigenic Actions in POMC Hypothalamic Neurons*. Mol Endocrinol, 2016. **30**(4): p. 402-16.
14. Al-Barazanji, K.A., et al., *C-terminal fragments of ACTH stimulate feeding in fasted rats*. Horm Metab Res, 2001. **33**(8): p. 480-5.
15. Cerdá-Reverter, J.M., H.B. Schiöth, and R.E. Peter, *The central melanocortin system regulates food intake in goldfish*. Regul Pept, 2003. **115**(2): p. 101-13.
16. Saneyasu, T., et al., *Alpha-melanocyte stimulating hormone plays an important role in the regulation of food intake by the central melanocortin system in chicks*. Peptides, 2011. **32**(5): p. 996-1000.
17. Wardlaw, S.L., *Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance*. Eur J Pharmacol, 2011. **660**(1): p. 213-9.
18. Zimanyi, I.A. and M.A. Pelleymounter, *The role of melanocortin peptides and receptors in regulation of energy balance*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(8): p. 627-41.
19. Chagnon, Y.C., et al., *Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Québec Family Study*. Mol Med, 1997. **3**(10): p. 663-73.
20. Vecsernyés, M. and J. Julesz, *Specific radioimmunoassay of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rat plasma*. Exp Clin Endocrinol, 1989. **93**(1): p. 45-51.
21. Jun, D.J., et al., *Melanocortins induce interleukin 6 gene expression and secretion through melanocortin receptors 2 and 5 in 3T3-L1 adipocytes*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(4): p. 225-36.

22. Rodrigues, A.R., H. Almeida, and A.M. Gouveia, *Alpha-MSH signalling via melanocortin 5 receptor promotes lipolysis and impairs re-esterification in adipocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(7): p. 1267-75.
23. Cho, K.J., et al., *Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes*. *J Cell Biochem*, 2005. **96**(4): p. 869-78.
24. Minutoli, L., et al., *Melanocortin 4 receptor activation protects against testicular ischemia-reperfusion injury by triggering the cholinergic antiinflammatory pathway*. *Endocrinology*, 2011. **152**(10): p. 3852-61.
25. Ottani, A., et al., *Melanocortins counteract inflammatory and apoptotic responses to prolonged myocardial ischemia/reperfusion through a vagus nerve-mediated mechanism*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **637**(1-3): p. 124-30.
26. Rinne, P., et al., *Pharmacological activation of the melanocortin system limits plaque inflammation and ameliorates vascular dysfunction in atherosclerotic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(7): p. 1346-54.
27. Varga, B., et al., *Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model*. *J Mol Neurosci*, 2013. **50**(3): p. 558-70.
28. Pétervári, E., et al., *Central alpha-MSH infusion in rats: disparate anorexic vs. metabolic changes with aging*. *Regul Pept*, 2011. **166**(1-3): p. 105-11.
29. Bartolomucci, A., et al., *The role of the vgf gene and VGF-derived peptides in nutrition and metabolism*. *Genes Nutr*, 2007. **2**(2): p. 169-80.
30. Catania, A., et al., *The peptide NDP-MSH induces phenotype changes in the heart that resemble ischemic preconditioning*. *Peptides*, 2010. **31**(1): p. 116-22.
31. Ottani, A., et al., *NDP- α -MSH attenuates heart and liver responses to myocardial reperfusion via the vagus nerve and JAK/ERK/STAT signaling*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **769**: p. 22-32.
32. Ottani, A., et al., *Protective effects of the melanocortin analog NDP- α -MSH in rats undergoing cardiac arrest*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **745**: p. 108-16.
33. Haines, D.D., et al., *Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012. **204**(4): p. 487-501.
34. Wu, M.L., Y.C. Ho, and S.F. Yet, *A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(7): p. 1835-46.
35. Czibik, G., et al., *Heme oxygenase-1: an emerging therapeutic target to curb cardiac pathology*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(6): p. 450.
36. Juhász, B., et al., *Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium*. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(9): p. 1973-82.
37. Bazzani, C., et al., *Protective effect of melanocortin peptides in rat myocardial ischemia*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **297**(3): p. 1082-7.
38. Vecsernyes, M., et al., *The administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **470**(3): p. 177-83.
39. Fuchsberger, C., et al., *The genetic architecture of type 2 diabetes*. *Nature*, 2016. **536**(7614): p. 41-47.
40. Min, S.H., et al., *Combination of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in type 2 diabetes: a systematic review with meta-analysis*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 4466.
41. Logue, J., et al., *Do men develop type 2 diabetes at lower body mass indices than women?* *Diabetologia*, 2011. **54**(12): p. 3003-6.
42. Moran, L.J., et al., *Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update*, 2010. **16**(4): p. 347-63.
43. Kautzky-Willer, A., J. Harreiter, and G. Pacini, *Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus*. *Endocr Rev*, 2016. **37**(3): p. 278-316.

44. Tahara, A., et al., *Characterization and comparison of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacologic effects*. J Pharmacol Sci, 2016. **130**(3): p. 159-69.
45. Federation, I.D. *IDF Diabetes Atlas, 7th edn.* 2015 2020.11.27.; Available from: <https://www.diabetesatlas.org>.
46. Zheng, Y., S.H. Ley, and F.B. Hu, *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(2): p. 88-98.
47. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.
48. Dinneen, S., J. Gerich, and R. Rizza, *Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 707-13.
49. Golay, A. and J. Ybarra, *Link between obesity and type 2 diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 649-63.
50. Longo, D., et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition*. 2011: McGraw-Hill Education.
51. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haefen, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
52. Yu, C., et al., *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50230-6.
53. Lee, J.S., et al., *Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites*. J Appl Physiol (1985), 2006. **100**(5): p. 1467-74.
54. DeFronzo, R.A., et al., *Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials*. Diabetologia, 2016. **59**(8): p. 1645-54.
55. Salpeter, S.R., et al., *Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev, 2010. **2010**(4): p. Cd002967.
56. Inzucchi, S.E., et al., *Metformin in patients with type 2 diabetes and kidney disease: a systematic review*. Jama, 2014. **312**(24): p. 2668-75.
57. Monami, M., et al., *A meta-analysis of the hypoglycaemic risk in randomized controlled trials with sulphonylureas in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2014. **16**(9): p. 833-40.
58. Abdelmoneim, A.S., et al., *Cardiovascular safety of sulphonylureas: over 40 years of continuous controversy without an answer*. Diabetes Obes Metab, 2015. **17**(6): p. 523-532.
59. Kohlroser, J., et al., *Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(1): p. 272-6.
60. Mahaffey, K.W., et al., *Results of a reevaluation of cardiovascular outcomes in the RECORD trial*. Am Heart J, 2013. **166**(2): p. 240-249.e1.
61. Loke, Y.K., S. Singh, and C.D. Furberg, *Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis*. Cmaj, 2009. **180**(1): p. 32-9.
62. Lewis, J.D., et al., *Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer and Other Common Cancers in Persons With Diabetes*. Jama, 2015. **314**(3): p. 265-77.
63. Nauck, M.A. and J.J. Meier, *The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(6): p. 525-36.
64. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 153-65.
65. Wilding, J.P., *The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors*. Metabolism, 2014. **63**(10): p. 1228-37.
66. Vasilakou, D., et al., *Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Ann Intern Med, 2013. **159**(4): p. 262-74.

67. Nauck, M.A., et al., *Dapagliflozin versus glipizide as add-on therapy in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycemic control with metformin: a randomized, 52-week, double-blind, active-controlled noninferiority trial*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(9): p. 2015-22.
68. Tahrani, A.A., A.H. Barnett, and C.J. Bailey, *SGLT inhibitors in management of diabetes*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2013. **1**(2): p. 140-51.
69. Weng, J., et al., *Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial*. *Lancet*, 2008. **371**(9626): p. 1753-60.
70. Holman, R.R., et al., *Three-year efficacy of complex insulin regimens in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(18): p. 1736-47.
71. Mountjoy, K.G., *Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes*. *Biochem J*, 2010. **428**(3): p. 305-24.
72. Pritchard, L.E. and A. White, *Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways*. *Endocrinology*, 2007. **148**(9): p. 4201-7.
73. DeBold, C.R., et al., *Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome*. *Mol Endocrinol*, 1988. **2**(9): p. 862-70.
74. Tranchand-Bunel, D., et al., *[Pro-opiomelanocortin neuronal systems]*. *Rev Neurol (Paris)*, 1987. **143**(6-7): p. 471-89.
75. Poggioli, R., A.V. Vergoni, and A. Bertolini, *ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists*. *Peptides*, 1986. **7**(5): p. 843-8.
76. Abbott, C.R., et al., *Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor*. *Brain Res*, 2000. **869**(1-2): p. 203-10.
77. Harrold, J.A. and G. Williams, *Melanocortin-4 receptors, beta-MSH and leptin: key elements in the satiety pathway*. *Peptides*, 2006. **27**(2): p. 365-71.
78. Dores, R.M., et al., *Molecular evolution of GPCRs: Melanocortin/melanocortin receptors*. *J Mol Endocrinol*, 2014. **52**(3): p. T29-42.
79. Smith, S.R., et al., *Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(12): p. 2914-22.
80. Boston, B.A., *The role of melanocortins in adipocyte function*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **885**: p. 75-84.
81. Boston, B.A. and R.D. Cone, *Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line*. *Endocrinology*, 1996. **137**(5): p. 2043-50.
82. Manna, S.K. and B.B. Aggarwal, *Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents*. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 2873-80.
83. Iwen, K.A., et al., *Melanocortin crosstalk with adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile and stimulates UCP-1 in adipocytes*. *J Endocrinol*, 2008. **196**(3): p. 465-72.
84. Mountjoy, K.G. and J. Wong, *Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides*. *Mol Cell Endocrinol*, 1997. **128**(1-2): p. 171-7.
85. Vaisse, C., et al., *Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(2): p. 253-62.
86. Ste Marie, L., et al., *A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 12339-44.
87. Butler, A.A., et al., *Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(6): p. 605-11.
88. Kishi, T., et al., *Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat*. *J Comp Neurol*, 2003. **457**(3): p. 213-35.
89. Butler, A.A., *The melanocortin system and energy balance*. *Peptides*, 2006. **27**(2): p. 281-90.
90. Kumar, K.G., et al., *Analysis of the therapeutic functions of novel melanocortin receptor agonists in MC3R- and MC4R-deficient C57BL/6J mice*. *Peptides*, 2009. **30**(10): p. 1892-900.
91. Leoni, G., et al., *Inflamed phenotype of the mesenteric microcirculation of melanocortin type 3 receptor-null mice after ischemia-reperfusion*. *Faseb j*, 2008. **22**(12): p. 4228-38.

92. Enriori, P.J., et al., *α -Melanocyte stimulating hormone promotes muscle glucose uptake via melanocortin 5 receptors*. Mol Metab, 2016. **5**(10): p. 807-822.
93. Conti, M. and J. Beavo, *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 481-511.
94. Curtis, T.M., T.A. Gardiner, and A.W. Stitt, *Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis?* Eye (Lond), 2009. **23**(7): p. 1496-508.
95. Jonas, J., et al., *Retinal vein occlusions*. Dev Ophthalmol, 2010. **47**: p. 111-135.
96. Woodman, O.L., et al., *Flavonols and Flavones - Protecting Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting Protein Kinases*. Curr Med Chem, 2018. **25**(34): p. 4402-4415.
97. Yuan, D., C. Liu, and B. Hu, *Dysfunction of Membrane Trafficking Leads to Ischemia-Reperfusion Injury After Transient Cerebral Ischemia*. Transl Stroke Res, 2018. **9**(3): p. 215-222.
98. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and G.R. Bullock, *The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem?* J Mol Cell Cardiol, 1978. **10**(7): p. 641-68.
99. Sheridan, D.J., et al., *Alpha adrenergic contributions to dysrhythmia during myocardial ischemia and reperfusion in cats*. J Clin Invest, 1980. **65**(1): p. 161-71.
100. Curtis, M.J., M.K. Pugsley, and M.J. Walker, *Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(5): p. 703-19.
101. de Groot, M.J., et al., *Substrate-induced changes in the lipid content of ischemic and reperfused myocardium. Its relation to hemodynamic recovery*. Circ Res, 1993. **72**(1): p. 176-86.
102. Bolli, R., *Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium")*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(1): p. 239-49.
103. Kolbeck-Rühmkorff, C. and H.G. Zimmer, *Proto-oncogene expression in the isolated working rat heart: combination of pressure and volume overload with norepinephrine*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 501-11.
104. Maulik, N., et al., *Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis*. Am J Physiol, 1998. **274**(1): p. H242-8.
105. Chiao, H., et al., *Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1165-72.
106. Zou, L., et al., *Delayed administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone or combined therapy with BAY 11-7085 protects against gut ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2003. **20**(5): p. 469-75.
107. Forslin Aronsson, S., et al., *alpha-Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia*. Neuropeptides, 2006. **40**(1): p. 65-75.
108. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 794-804.
109. Kikuchi, G., T. Yoshida, and M. Noguchi, *Heme oxygenase and heme degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 558-67.
110. Csonka, C., et al., *Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 119-26.
111. Bak, I., et al., *The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 639-48.
112. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
113. Morse, D. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(1): p. 8-16.
114. Bertolatus, J.A., et al., *Evaluation of the role of reactive oxygen species in doxorubicin hydrochloride nephrosis*. J Lab Clin Med, 1991. **118**(5): p. 435-45.
115. Tosaki, A. and P. Braquet, *DMPO and reperfusion injury: arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts*. Am Heart J, 1990. **120**(4): p. 819-30.
116. Chiang, V., et al., *Brain abscesses caused by Clostridium septicum as a complication of hemolytic-uremic syndrome*. Pediatr Infect Dis J, 1995. **14**(1): p. 72-4.

117. Juhasz, B., et al., *Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(3): p. H1365-70.
118. Thirunavukkarasu, M., et al., *Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 720-9.
119. Kertész, A., et al., *Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(9): p. 19086-108.
120. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. **61**(2): p. 748-55.
121. Penny, R.J., F.J. Tilders, and A.J. Thody, *The effect of hypothalamic lesions on immuno-reactive alpha-melanocyte stimulating hormone secretion in the rat*. *J Physiol*, 1979. **292**: p. 59-67.
122. Gregersen, S., et al., *Effects of whey proteins on glucose metabolism in normal Wistar rats and Zucker diabetic fatty (ZDF) rats*. *Rev Diabet Stud*, 2013. **10**(4): p. 252-69.
123. Bayorh, M.A., et al., *Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2011. **12**(3): p. 195-201.
124. Papp, Z., et al., *The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes*. *J Physiol*, 2002. **543**(Pt 1): p. 177-89.
125. Koshikawa, S., et al., *Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, reverses L-NAME exacerbated severe nephrosclerosis in spontaneously hypertensive rats*. *J Hypertens*, 2008. **26**(9): p. 1837-48.
126. Yamamoto, E., et al., *Role of xanthine oxidoreductase in the reversal of diastolic heart failure by candesartan in the salt-sensitive hypertensive rat*. *Hypertension*, 2007. **50**(4): p. 657-62.
127. Bombicz, M., et al., *A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Allium ursinum Liophyllisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
128. van den Brom, C.E., et al., *Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. **8**: p. 39.
129. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
130. Rinne, P., et al., *Hemodynamic actions and mechanisms of systemically administered α -MSH analogs in mice*. *Peptides*, 2012. **38**(1): p. 150-8.
131. Kristensen, J., et al., *The α -MSH analogue AP214 attenuates rise in pulmonary pressure and fall in ejection fraction in lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response syndrome in pigs*. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2011. **31**(1): p. 54-60.
132. Rinne, P., et al., *Genetic and pharmacological mouse models of chronic melanocortin activation show enhanced baroreflex control of heart rate*. *Regul Pept*, 2013. **182**: p. 19-27.
133. Eerola, K., et al., *α -MSH overexpression in the nucleus tractus solitarius decreases fat mass and elevates heart rate*. *J Endocrinol*, 2014. **222**(1): p. 123-36.
134. Skrzypiec-Spring, M., et al., *Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007. **55**(2): p. 113-26.
135. Broyd, C.J., et al., *Myocardial ischemia in aortic stenosis: insights from arterial pulse-wave dynamics after percutaneous aortic valve replacement*. *Trends Cardiovasc Med*, 2013. **23**(6): p. 185-91.
136. Picichè, M., et al., *Enhancement of non-coronary collateral blood flow from the internal thoracic arteries: the theoretical and practical basis of an alternative method of myocardial blood supply*. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2011. **52**(1): p. 127-31.
137. Mahmoud, F.F., A.M. Al-Awadhi, and D.D. Haines, *Amelioration of human osteoarthritis symptoms with topical 'biotherapeutics': a phase I human trial*. *Cell Stress Chaperones*, 2015. **20**(2): p. 267-76.
138. Bak, I., et al., *Reduction of reperfusion-induced ventricular fibrillation and infarct size via heme oxygenase-1 overexpression in isolated mouse hearts*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(9): p. 2268-72.

139. Haines, D.D., et al., *Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts.* J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(1): p. 37-44.
140. Rinne, P., et al., *α -Melanocyte-stimulating hormone regulates vascular NO availability and protects against endothelial dysfunction.* Cardiovasc Res, 2013. **97**(2): p. 360-8.
141. Kadowitz, P.J., B.M. Chapnick, and A.J. Kastin, *Comparison of alpha-MSH and several vasoactive substances on vascular resistance in the feline mesenteric vascular bed.* Pharmacol Biochem Behav, 1976. **5**(2): p. 219-21.
142. Rinne, P., et al., *α -MSH analogue attenuates blood pressure elevation in DOCA-salt hypertensive mice.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72857.
143. Czompa, A., et al., *Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1.* J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **64**(5): p. 412-9.
144. Csepanyi, E., et al., *Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model.* Pharmacol Res, 2015. **100**: p. 148-56.
145. Mukherjee, S., et al., *Effects of Longevinex (modified resveratrol) on cardioprotection and its mechanisms of action.* Can J Physiol Pharmacol, 2010. **88**(11): p. 1017-25.
146. Lekli, I., et al., *Co-ordinated autophagy with resveratrol and γ -tocotrienol confers synergetic cardioprotection.* J Cell Mol Med, 2010. **14**(10): p. 2506-18.
147. Shapiro, L.M. and W.J. McKenna, *Left ventricular hypertrophy. Relation of structure to diastolic function in hypertension.* Br Heart J, 1984. **51**(6): p. 637-42.
148. Akaishi, M., et al., *Relation between left ventricular global and regional function and extent of myocardial ischemia in the canine heart.* J Am Coll Cardiol, 1985. **6**(1): p. 104-12.
149. McDaniel, F.K., et al., *Constitutive cholesterol-dependent endocytosis of melanocortin-4 receptor (MC4R) is essential to maintain receptor responsiveness to α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH).* J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 21873-90.
150. Abdel-Malek, Z.A., *Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists.* Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(3): p. 434-41.
151. Huszar, D., et al., *Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice.* Cell, 1997. **88**(1): p. 131-41.
152. Møller, C.L., et al., *Melanocortin agonists stimulate lipolysis in human adipose tissue explants but not in adipocytes.* BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 559.
153. Pierroz, D.D., et al., *Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTH in mice with diet-induced obesity.* Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1337-45.
154. Alam, M., C. Höglund, and C. Thorstrand, *Longitudinal systolic shortening of the left ventricle: an echocardiographic study in subjects with and without preserved global function.* Clin Physiol, 1992. **12**(4): p. 443-52.
155. Jones, C.J., L. Raposo, and D.G. Gibson, *Functional importance of the long axis dynamics of the human left ventricle.* Br Heart J, 1990. **63**(4): p. 215-20.
156. Hu, K., et al., *Clinical implication of mitral annular plane systolic excursion for patients with cardiovascular disease.* Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2013. **14**(3): p. 205-12.
157. Alam, M., et al., *Atrioventricular plane displacement in severe congestive heart failure following dilated cardiomyopathy or myocardial infarction.* J Intern Med, 1990. **228**(6): p. 569-75.
158. Willenheimer, R., et al., *Left ventricular atrioventricular plane displacement: an echocardiographic technique for rapid assessment of prognosis in heart failure.* Heart, 1997. **78**(3): p. 230-6.
159. Emilsson, K. and B. Wandt, *The relation between ejection fraction and mitral annulus motion before and after direct-current electrical cardioversion.* Clin Physiol, 2000. **20**(3): p. 218-24.
160. Emilsson, K. and B. Wandt, *The relation between mitral annulus motion and ejection fraction changes with age and heart size.* Clin Physiol, 2000. **20**(1): p. 38-43.
161. Naito, R. and K. Miyauchi, *Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus.* Int Heart J, 2017. **58**(4): p. 475-480.
162. Rydberg, E., et al., *Left atrioventricular plane displacement predicts cardiac mortality in patients with chronic atrial fibrillation.* Int J Cardiol, 2003. **91**(1): p. 1-7.

163. Goroshi, M. and D. Chand, *Myocardial Performance Index (Tei Index): A simple tool to identify cardiac dysfunction in patients with diabetes mellitus*. Indian Heart J, 2016. **68**(1): p. 83-7.
164. Gong, H., et al., *EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQP_s and sodium transporters in rat kidney*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 683-95.
165. Strelkov, R.B., et al., [*Enhancement of the body's capacity to resist various extreme factors by using normobaric hypoxic stimulation*]. Vestn Akad Med Nauk SSSR, 1988(5): p. 77-80.
166. Tsatmali, M., J. Ancans, and A.J. Thody, *Melanocyte function and its control by melanocortin peptides*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(2): p. 125-33.
167. Getting, S.J., et al., *The melanocortin peptide HP228 displays protective effects in acute models of inflammation and organ damage*. Eur J Pharmacol, 2006. **532**(1-2): p. 138-44.
168. Health, N.I.o. *Precision Medicine Initiative Cohort Program*. 2016 cited: 2016; Available from: <https://www.nih.gov/precision-medicineinitiative-cohort-program>.
169. Bombicz, M., et al., *Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).



Nyilvántartási szám: DEENK/271/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szokol Miklós
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Vecsernyés, M., **Szokol, M.**, Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Fülöp, G. Á., Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Alpha-MSH induces vasodilatation and exerts cardioprotection via the heme-oxygenase pathway in rat hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.227
2. **Szokol, M.**, Priksz, D., Bombicz, M., Varga, B., Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Csípő, T., Pósa, A., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Long term osmotic mini pump treatment with alpha-MSH improves myocardial function in Zucker Diabetic Fatty rats.
Molecules. 22 (10), 1-18, 2017.
IF: 3.098

További közlemények

3. Pápai, G., Csató, G., Rácz, I., Szabó, G. T., Bárány, T., Rácz, Á., **Szokol, M.**, Sármán, B., Édes, I. F., Czuriga, D., Kolozsvári, R., Édes, I.: The transtelephonic electrocardiogram-based triage is an independent predictor of decreased hospital mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention.
J. Telemed. Telecare. 26 (4), 216-222, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1357633X18814335>
IF: 2.616 (2019)
4. Kracsó, B., Kertész, A. B., Vajda, G., Vajda, C., Jenei, C., Rácz, I., Szerafin, T., **Szokol, M.**, Balogh, Á., Csanádi, Z., Bódi, A.: Nehéz helyzetben a HEART Team: valve-in-valve implantáció?
Cardiol. Hung. 48 (1), 31-35, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2018.48.1.31>





5. Gulácsi-Bárdos, P., **Szokol, M.**, Lódi, M., Czuriga, D., Czuriga, I., Édes, I., Nagy, A. C., Sármán, B.: Ischaemiás szívbetegség és tumoros betegségek együttes előfordulása: kérdések és problémák.
Orvosi Hetilap. 158 (43), 1691-1697, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30897>
IF: 0.322
6. Pápai, G., Rácz, I., Szilágyi, S., **Szokol, M.**, Mártai, I., Gorove, L., Göndöcs, Z., Tóth, G., Hegedűs, J., Muzsik, B., Édes, I.: Ezt a beteget elvesztettük volna...
Cardiol. Hung. 41, 3-5, 2011.
7. Nagy, Z., **Szokol, M.**, Péterffy, Á.: Direct ostioplasty of the left main coronary artery using the right internal thoracic artery as patch material.
Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. 20 (6), 1233-1234, 2001.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)00992-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940(01)00992-7)
IF: 1.676
8. Péterffy, Á., Horváth, G., Tamás, C., Bodnár, F., **Szokol, M.**, Vaszily, M.: Szívműtétek Jehova tanúinál.
Orv. Hetil. 141 (18), 959-961, 2000.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,939

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,325**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.09.29.



9. Tárgyszavak

Alfa-melanocita stimuláló hormon

2-es típusú cukorbetegség

Ozmotikus mini pumpa

Melanokortin

Hemoxigenáz

Zucker Diabetic Fat

Ón(Sn)-protoporfirin

Echokardiográfia

Izolált dolgozó szív modell

Keywords

Alpha-melanocyte-stimulating hormone

Type 2 diabetes mellitus

Osmotic mini pump

Melanocortin

Heme oxygenase

Zucker Diabetic Fat

Tin protoporphyrin

Echocardiography

Isolated working heart model

10. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Juhász Béla egyetemi docensnek, hogy PhD hallgatójává fogadott, közös munkánk során véget nem érően támogatott és mindemellett barátságával is megajándékozott.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Szilvássy Zoltán Intézetvezetőnek a lehetőséget, hogy PhD munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetnél végezhettem.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Csanádi Zoltánnak és Prof. Dr. Édes Istvánnak, a Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika jelenlegi és korábbi vezetőjének, akik lehetővé tették, hogy az általuk vezetett Klinika munkatársaként gyakorolhassam hivatásom és termékeny táptalajt biztosítottak mind a betegellátás, mind a tudományos munka magas színvonalú végzésére.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kurucz Andreának, aki számtalan szakmai észrevételével jelentősen hozzájárult munkám létrejöttéhez.

Külön köszönöm Dr. Lampé Nórának önzetlen és kitartó baráti támogatását tanulmányom során.

Továbbá köszönettel tartozom a Farmakológia Intézet és a Kardiológia Intézet minden munkatársának, akik előmozdították jelen dolgozatom megszületését.

Végtelen köszönet családom minden egyes tagjának, töretlen belém vettet hitéért, melyre bizton támaszkodhatok a mindennapok során.

Külön köszönet:

Édesapámnak, Dr. Szokol Miklósnak, aki gondoskodó szeretete mellett, már gyermekkoromban is követendő szakmai utat mutatott.

Édesanyámnak, Hargitay Borbálának, aki féltő és odaadó szeretetével, kimeríthetetlen energiájával támogatott életem során.

Feleségemnek, Szokol Lillának és kisfiamnak, Szokol Miklósnak, hogy mindig erőt meríthetek belőlük és hogy teljessé tették az életemet.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében. Ezen felül az értékezés a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 számú „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” projekt keretében az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával és a Tématerületikiválósági program 2019, ED_18-1-2019-0028 valósult meg.

