

Doktori (Ph. D.) értekezés

**Az iszkémiás szívizomkárosodás felépülésének
elősegítése farmakológiai beavatkozásokkal**

Írta:
Juhász Béla

Témavezetők: Dr. Tótsaki Árpád, Dr. Vecsernyés Miklós

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

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

2004

Az értekezés során használt rövidítések:

1XPC:	egy ciklusú prekondicionálás
2XPC:	két ciklusú prekondicionálás
3XPC:	három ciklusú prekondicionálás
4XPC:	négy ciklusú prekondicionálás
α -MSH:	alpha-melanocita-stimuláló hormon
AF:	aorta kiáramlás
C:	nem-hiperkoleszterinémias kontroll
CF:	koronária átáramlás
DMTU:	dimetil-tiourea
DNPH:	2,4-dinitrofenil-hidrazin
EKG:	elektrokardiogramm
HC:	hiperkoleszterinémia
HDL:	high density lipoprotein
HR:	szívfrekvencia
IS/RE:	iszkémia/reperfúzió
IS:	iszkémia
ISZB:	iszkémiás szívbetegség
K_{ATP} :	ATP-érzékeny K^+ -csatorna
LDL:	low density lipoprotein
LVDP:	bal kamrai nyomás
MDA:	malonaldehid
No IS/RE	nincs iszkémia reperfúzió
PC:	prekondicionálás
PKC:	protein kináz C
RE:	reperfúzió
SGE	standardized grape extract
SOD:	szuperoxid-dizmutáz
SSZK:	standardizált szőlőkivonat
TTC:	trifenil-tetrazolium
VF:	kamrafibrilláció
VLDL:	very low density lipoprotein
VT:	kamrai tachycardia

Bevezetés

Napjainkban a szív- és érrendszeri megbetegedések világszerte vezetnek a halálozási statisztikákat. Az összes kardiovaszkuláris betegség mintegy felét az iszkémiás szívbetegség (ISZB) teszi ki, melynek leggyakoribb megnyilvánulási formái az angina pectoris, a szívinfarktus és az aritmia, elsősorban a kamrafibrilláció miatt fellépő hirtelen szívhalál.

1999-ben a halálozások főbb halálokok szerinti megoszlásában a keringési rendszer betegségei 51,2 %-al az első helyen szerepelnek (Statisztikai adatok Magyarország 1999. évi egészségügyi helyzetéről, Népegészségügy 6/2000).

Az elmúlt három évben nem változott lényegesen a keringési betegségek halálozási gyakorisága, ami igen magas szinten stagnáló állapotot jelez. Földrajzi régióként azonban már eltéréseket tapasztalunk: az elmúlt 30 évben a legtöbb fejlett országban (USA, Japán, dél-európai országok) a halálozás csökkent, ugyanakkor a kelet-európai országokban a mortalitás drámaian emelkedett. Egyes becslések szerint – mivel a népesség elöregedésével a kardiovaszkuláris betegségek előfordulása növekszik – 2020-ra mind a fejlett, mind a jelenleg fejlődő országokban az iszkémiás szívbetegség lesz a vezető halálokok.

Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arány, ebben a betegségcsoportban Magyarországon 3,2-szer magasabb mint Franciaországban, 2-szer magasabb mint további 7 európai országban. A volt szocialista országokban kiemelkedően magas a keringési betegségek miatti halálozás, Magyarország közöttük a középmezőnyben helyezkedik el (Statisztikai adatok Magyarország 1999. évi egészségügyi helyzetéről, Népegészségügy 6/2000).

Ez a riasztó statisztika önmagában indokolja a témakör részletesebb vizsgálatát, hogy választ kapjunk arra, milyen mechanizmusok játszanak szerepet, és milyen hatással vannak a kardiovaszkuláris rendszer funkciójára, a koszorúér-betegség és az aritmiák kialakulására.

A szívizomban az oxigén- és tápanyagellátás hiánya és az anaerob anyagcseretermékek felszaporodása következtében funkciózavar, súlyos esetben pedig szöveti elhalás jön létre. Akut iszkémia során a szívizom ATP-tartalma és energiatartaléka csökken. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} -ion szintje megnő a belső raktárak (sarcoplasmaticus reticulum) ürülése, és az extracelluláris térből való beáramlás következményeként. Ez a kalcium-pumpák működésének zavarához és kimerüléséhez vezethet. A szív kontrakciós ereje és pumpafunkciója nagymértékben lecsökken. A szívkamrák falmozgásaiban zavarok lépnek fel, melyek következtében vérnyomáscsökkenés vagy emelkedés alakulhat ki. Reflexes szívfrekvencia- és vérnyomás növekedés vagy vérnyomáscsökkenés jelenik meg, ami az oxigén hiánya mellett is jelentős energiát emészt fel, növelve a szívizom kimerülésének esélyét. A Ca^{2+} -ion

felhalmozódás és a pH-csökkenés (acidózis) a sejtek „gap-junction”-jait lezárja, ami a sejt-sejt közötti kapcsolatok funkciójának romlásához vezet. Ebben a fázisban bekövetkezhet a szívizom iszkémia, infarktus, vagy legrosszabb esetben a hirtelen szívhalál. A klinikai tünetek leggyakrabban és legkorábban anginás rohamként jelentkeznek. Mindezen folyamatok mellett az ATP-szint csökkenés hatására megnyílnak az ATP-függő K-csatornák, ami intracelluláris K^+ -vesztéshez és az extracelluláris K^+ -szint megnövekedéséhez vezet. Az extracelluláris térben megnőtt K^+ -szint depolarizációt okoz, mely a gyors Na^+ -áram csökkentésén keresztül lassítja az ingerületvezetés sebességét. Ugyanakkor a megnövekedett extracelluláris K^+ -szint megrövidíti a szívizomsejtek repolarizációját és a refrakter fázisát. Vagyis e mechanizmus is elősegíti a szív kimerülését, az aritmiák kialakulását. A fenti folyamatok végül kamrai tachykardián keresztül kamrafibrillációhoz vezethetnek.

Jóllehet az ISZB pontos patogenezise nem tisztázott, a rizikófaktorokat jól ismerjük: magas low density lipoprotein-koleszterin-szint (LDL-C) a vérben, alacsony high density lipoprotein-koleszterin-szint (HDL-C) és E-vitamin-szint, valamint gyenge fizikai állapot. Ugyancsak rizikófaktor lehet a magas triglycerid- és inzulinszint, mely inzulin-rezisztenciáról árulkodik, de az erre vonatkozó adatok még kevésbé tisztázottak. Számos szisztémás betegség (pl. hipertónia, diabétesz, hipotireózis) szintén kapcsolatba hozható a koszorúér-betegség kockázatának növekedésével. A közelmúltban a homociszteinről is bebizonyították, hogy a betegség rizikófaktor (Agullo-Ortuno és mtsai. 2002., Becker és mtsai. 2003., Gensini és mtsai. 1998., Neugebauer és mtsai. 2002., Woo és mtsai. 1997).

Ritkábban az iszkémiás szívbetegség koszorúérgörcs következménye, de lehet drogok, mint pl. a kokain krónikus fogyasztásának következménye is. Esetenként a koszorúér embóliája, Kawasaki-szindróma és vaszkulitisz áll a háttérben.

Az ISZB rizikója megnő dohányzás esetén, valamint olyan étrend mellett, amelynek magas a zsír- és kalóriatartalma, fitokemikáliában (gyümölcsök és zöldségek) pedig szegény.

Epidemiológiai megfigyelések alapján jól ismert, hogy a legtöbb fejlett országban az étrend magas zsír-, telítettsírsav, és koleszterintartalma, valamint a jelentős kalória bevitel összefüggésbe hozható a szívbetegségekből eredő halálozásokkal. Ugyanakkor néhány mediterrán országban, főként Franciaország egyes területein, a jelentős zsír- és telítettsírsav-bevitel mellett abszolút értékben és arányát tekintve is lényegesen alacsonyabb az iszkémiás szívbetegségek morbiditása és mortalitása mint más azonos fejlettségű országokban (de Lorgeril és mtsai. 2002., Gaziano és mtsai. 1993., Renaud és mtsai. 1992., Rimm és mtsai. 1991). Tudományos vizsgálatok sokasága próbált magyarázatot keresni a tapasztalt eltérésre, s feltételezték, hogy a jelenség mögött életmódbeli, táplálkozási eltérések húzódnak meg. Úgy tűnt, hogy a franciák életvitеле sokkal szabadabb, nem annyira túlhajszoltak, a stressz kevésbé

van jelen az életükben, mint más, iparilag fejlett országokban. Ugyanakkor más rizikófaktorok megléte, mint például a magas vérnyomás, a dohányzás, a túlsúly ugyanúgy jellemző volt valamennyi vizsgált országra (Kilburn és mtsai. 2003., Panagiotakos és mtsai. 2002., Yamagishi és mtsai. 2003). A leglényegesebb tényező, melyben eltérés mutatkozott a franciák és más országok lakosai között, az étrend összetétele, azon belül is a rendszeres vörösborfogyasztás volt. A korai tanulmányok azt vizsgálták, vajon a vörösbor és más alkoholos italok alkoholtartalma adhat-e magyarázatot a jelenségre. Több kutatócsoport talált összefüggést a mérsékelt alkoholfogyasztás és a csökkent kardiovaszkuláris betegségek rizikója között. Megállapították, hogy az alkoholfogyasztás és a kardiovaszkuláris, valamint összes mortalitás közötti összefüggést U vagy J alakú görbével lehet jellemezni. Ez azt jelenti, hogy az alkoholt nem fogyasztók kardiovaszkuláris rizikója kicsit magasabb, mint a mérsékelt, napi 12-24 g alkoholnak megfelelő italt fogyasztóké. Ugyanakkor „nagyivók” életkilátásai az alkohol toxikus hatásai nyomán kialakuló megbetegedések (cirrózis, májrák) miatt sokkal rosszabbak voltak (Gaziano és mtsai. 1993., Renaud és mtsai. 1992., Rimm és mtsai. 1991., Soleas és mtsai. 1997). Az alkohol alacsony dózisban megakadályozhatja a trombózis kialakulását, mivel csökkenti a fibrinogén, és emeli a plazminogén koncentrációt. A fibrinogén koncentrációjának csökkenése visszасzorítja a vérlemezkék koagulációját, és így gátolja az ateroszklerózis kialakulását. Ugyanakkor az alkohol képes növelni a kardioprotektív hatású HDL-koleszterin koncentrációját, és kismértékben csökkenteni az aterogén LDL szintjét. Ismert, hogy a HDL-koleszterin egyik fehérjekomponense, az apoprotein A-1 (apo A-1) alacsony volta jobban jelzi a kardiovaszkuláris megbetegedés rizikójának mértékét, mint maga a HDL-koleszterin-szint (Baer és mtsai. 2002., De Oliveira és mtsai. 2000). Egyes tanulmányok rámutattak, hogy az alkohol indukálja az apo A-1 keletkezését. Nagyobb mennyiségű alkohol fogyasztása esetén azonban nem hagyható figyelmen kívül, hogy az alkoholbevitel felesleges kalóriákhoz juttatja a szervezetet, és a VLDL-képzés (very low density lipoprotein) fokozásán keresztül a trigliceridszint emelkedéséhez, s így a lipidparaméterek módosulásához vezet. Továbbá egy alternatív lebomlási úton az etilalkoholból az acetaldehid mellett szuperoxid-gyök is keletkezik a májban, melynek döntő szerepe van az alkoholos májkárosodások kialakulásában. Számos tudományos eredmény támasztja alá a mérsékelt alkoholfogyasztás kardioprotektív hatását, és számos munkacsoport hívta fel a figyelmet arra, hogy a különböző alkoholos italok hatása nem egyenértékű. Az egyéb étrendi antioxidánsok mellett (tokoferolok, aszkorbinsav, karotinok) a növényi eredetű fenolos vegyületek is kedvezően befolyásolhatják a kardioprotektív mechanizmusokat. A boreredetű fenolos vegyületek (flavonoidok és nem flavonoid típusú komponensek) gátolják az alacsony fajsúlyú lipoproteinek (LDL)

oxidációját, az eikozanoidszintézist, a trombocitaaggregációt, fokozzák az értágító hatású nitrogén-oxid termelését, és meggátolják az erek összehúzódásáért felelős endothelin-1 képződését (Corder és mtsai. 2001., Hirano és mtsai. 2004., Mario és mtsai. 2004., Pal és mtsai. 2004., Scuro és mtsai. 2004., Sheu és mtsai. 2004., van Golde és mtsai. 2004., Yousef és mtsai. 2004). Mivel a vörösbor szőlőből készül, és a szőlő szintén tartalmaz polifenolos vegyületeket, mint pl.: resveratrol, katechinek, procyanidinek, flavonoidok és antocyanidinek, így kutatásaink során többek között arra szerettünk volna választ kapni, hogy a szőlőkivonatnak van-e hasonló kardioprotektív hatása.

Bizonyos egyéneknél az alacsony omega-3 többszörösen telítetlen zsírsav tartalmú étrend fogyasztása növelheti az ISZB kockázatát. Ugyanígy hatnak a rossz stressz-levezetési módszerek és a testmozgás hiánya, valamint a jelentős tömegeket érintő ülő munka. Az „edzés” fontosságának tekintetében egy nagyon fontos analógiát vonhatunk a prekondicionálással. A prekondicionálás jelenségét már két évtized óta ismerjük. A „védelem első ablakaként” Murry és mtsai. (1986.) mutatták be először, hogy a szívszövet ATP kimerülését lassítani lehet, ha az iszkémiás periódust egy rövid iszkémia, és egy rövid időtartamú reperfúzió előzi meg. Mindazonáltal az intermittáló rövid periódusok során a káros katabolitok kimosásra kerülnek, ami kimondottan hasznosnak bizonyult a miokardium szempontjából.

Az elektrofiziológiai és metabolikus változásokból eredő patofiziológiai elváltozások felléphetnek akut iszkémia következtében, valamint előző infarktusok okozta strukturális változása miatt. Amióta felfedezték a szívizom prekondicionálás jelenségét, azóta ez a felfedezés számít a legtöbb kutató szerint a legkövetkezetesebb és legreprodukálhatóbb beavatkozásnak a posztiszkémiás sérülések késleltetésére.

A szívizom iszkémiás megbetegedéseiben és a szívsebészeti beavatkozások során az iszkémia/reperfúzió jelenségének központi szerepe van. Az elmúlt három évtizedben végzett kutatások megerősítették, hogy a reperfúzió – a véráramlás, az oxigén- és tápanyagellátás helyreállása az előzőleg iszkémiás szövetben – gyors metabolikus, elektrofiziológiai, morfológiai és funkcionális változásokat hoz létre (Hearse és mtsai. 1992). Bár a reperfúzió nélkülözhetetlen az iszkémia által károsodott szervek felépülésében, mégsem kockázatmentes, mivel ronthatja az iszkémia utáni állapotban lévő szövetek funkcióját.

Az IS/RE indukálta szívizomkárosodás alapját képező mechanizmusok meglehetősen összetettek és még ma sem teljes mértékben tisztázottak. Nagy valószínűséggel szerepet játszanak bennük olyan tényezők, mint az α - és β -receptorok (Sheridan és mtsai. 1980), ionok (Curtis és mtsai. 1993., Opie és mtsai. 1991), zsírsavak és foszfolipidek (De Groot és mtsai. 1993., Van der Vusse és mtsai. 1994), szabad gyökök (Bulli és mtsai. 1988), különböző

génregulációk (Keating és mtsai. 2001., Kolbeck-Ruhmkorff és mtsai. 1995., Simkovich és mtsai. 2002), apoptotikus szignálok (Maulik és mtsai. 1998., Suzuki és mtsai. 2002).

Tennant és Wiggers (1985) megfigyelte, hogy a kamrafibrilláció nemcsak az iszkémiás szakaszban, hanem a keringés visszaállítása után, a reperfúziós szakaszban is nagy intenzitással bekövetkezhet. Vagyis a reperfúzió – mely nélkül az iszkémiás szívizom elhal – aritmiához vezethet. Ennek egyik oka az, hogy azokban a sejtekben, melyek az iszkémia ideje alatt hipoxiássá váltak, a hirtelen reoxigenizáció nagymértékű enzimfelszabadulással és strukturális károsodással jár az iszkémiás metabolitok kimosódása és a szabadgyökképződés miatt. A prekondicionálással társított kardiális védelem jelentősen képes lassítani a szívszövet ATP kimerülését, a szabad gyökök és a kimondottan károsnak tekinthető katabolitok kimosása miatt. Ezt nevezzük a „védelem első ablakának”. Sajnos azonban ez a hatás gyorsan elmúlik (Marber és mtsai. 1993). Számos kutató ezután azt vizsgálta, hogy a rövid iszkémia/reperfúziós periódusok hasznosak-e abban az esetben is, hogyha a „hosszú”- idejű iszkémiát nem közvetlenül a prekondicionálás után, hanem azt követően 24 órával idézzük elő. Az eredmény biztató volt, hiszen a prekondicionált szívek sokkal jobb paramétereket mutattak a kontroll (nem-prekondicionált) csoporthoz képest, akár 24 óra múlva is. Ezt nevezték a „védelem második vonalának” (Marber és mtsai. 1993). A szív „védelmének első és második ablakának” felfedezése óta számottevő információ és bizonyíték gyűlt össze, ezzel is jelezvén azt, hogy a prekondicionálás csakugyan lényeges az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások megelőzésében. Felmerült a gondolat, hogy a prekondicionálás elősegíti különböző endogén védő anyagok képződését és felszabadulását mint, pl.: a nitrogén-monoxid, bradikinin, prosztaciklin és adenozin, amelyek antiiszkémiás és antiaritmiás hatással rendelkeznek (Bolli és mtsai. 2001., Kloner és mtsai. 2002., Lawson és mtsai. 1993). A valósághoz azonban hozzátartozik, hogy a pontos hatásmechanizmus a mai napig nem tisztázott és nem elfogadott. Fontos kiemelnünk, hogy az állatkísérletek túlnyomó többségét a PC és a hozzá tartozó mechanizmusok terén, nagyrészt egészséges állatszíveken végezték (nyúl, patkány, kutya vagy sertés), az előzetes koronária vagy miokardiális sérülések nélkül. Ily módon a kapott eredmények patofiziológiai és klinikai jelentősége korlátozott, és ez laboratóriumi és klinikai dilemmához vezet. A PC tanulmányozása során arra szerettünk volna választ kapni, hogy előzőleg koleszterin diétával indukált hiperkoleszterinémiás állatok, ugyanúgy adaptálódnak-e a prekondicionálás során az iszkémiás inzultusok által okozott károsodásokhoz, mint az ép, egészséges szívszövet.

A miokardiális IS/RE során a szívizomsejtek pusztulása kétféle mechanizmuson, apoptózison és nekrozison keresztül történhet. Már korábban leírták, hogy az apoptózis – a programozott sejthalál egy morfológiailag jól definiált formája – hozzájárulhat a miociták

irreverzibilis károsodásához a DNS-fragmentáció útján. Az elmúlt két évtizedben számos vizsgálatot végeztek annak érdekében, hogy csökkentsék az IS/RE okozta sejthalál és ez által az infarktusz terület mértékét. Nyilvánvalóan azon gyógyszerek amelyek képesek gátolni az apoptózist, azok képesek lehetnek az IS/RE során létrejött szövetkárosodást is kivédeni.

Az α -MSH citoprotektív hatása

A gyulladásos folyamatok tanulmányozása során egyre nagyobb figyelmet kapott a proopiomelanokortin (POMC) egy származéka, az alpha-melanocyt-stimuláló hormon (α -MSH), amely sokrétű hatása mellett endogén neurotroph, neuroprotektív, citoprotektív és neuroimmunmodulátor hatású szernek bizonyult (Catania és mtsai. 1999). Citokin antagonistasajátóságánál fogva jelentős gyulladáscsökkentő effektusokkal rendelkezik, melyet centrális és perifériás támadáspontokkal is kifejt. Befolyásolja a gyulladás és a szöveti hipoxia hatására kialakuló szövetkárosodást (Ichiyama és mtsai. 1999). A legújabb megfigyelések szerint fontos szerepet játszik a felnőttkori obesitas kialakulásában azáltal, hogy az MC-4 receptorokon keresztül részt vesz a leptin hatásának közvetítésében (Harrold és mtsai. 1999). Kimutatták, hogy a centrális α -MSH-erg rendszer aktivitása csökken I-típusú diabéteszben, és inzulin pótlás hatására e változás megfordítható (Kim és mtsai. 1999). A perifériás idegekben az α -MSH tartalom megnövekszik diabéteszes állatokban (Hughes és mtsai. 1992). A perifériás idegelemek sérülése után a regenerációs folyamatokat pozitív irányba képes befolyásolni in vitro és in vivo körülmények között egyaránt. Egyes adatok szerint gátolja a diabéteszt kísérő jelenségek kiváltásában fontos PKC enzim működését, és fokozza a retina epitelsejtjeinek vazodilatátor eikozanoidtermelését is (Lyson és mtsai. 1994).

Az α -MSH a gasztrointesztinális traktus IS/RE hatására bekövetkező szövetkárosodását is képes volt kivédeni úgy, hogy az iszkémiás periódus 1., 2. és 4. órájában alkalmazták a peptidet. A kísérletek azt igazolták, hogy a hatás kialakulása 1 és 2 óra múlva is létrejön, és ebben szerepet játszik a NF- κ B, IL-6 és a neutrofil granulocyták infiltrációjának csökkentése, illetve a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim expressziójának növelése (Zou és mtsai. 2003).

Kimutatták azt, hogy a melanokortin peptidek gátolni képesek a szívben iszkémia által kiváltott szövetkárosodást azáltal, hogy csökkentik a szívműködés aritmia készségét (Bazzani és mtsai. 2001). A peptid hatásáért az indukálható NO-szintáz enzim aktivitás csökkenését, és a szabadgyökök keletkezésének gátlását teszik felelőssé. Megfigyelések szerint a hatás kifejlődéséért a melanokortin receptorok (MC1-MC5 receptor család) közül az MC3 tehető felelőssé (Guarini és mtsai. 2002., Miori és mtsai. 2003). Az α -MSH az MC1-es receptor család mellett a többi receptort is képes aktiválni.

Az apoptózis kialakulásának megakadályozására számtalan farmakológiai lehetőség rendelkezésre áll, mint ahogyan arról számos szerző is beszámolt (Gottlieb és mtsai. 1994., Jo és mtsai. 2001., Kurrelmeyer és mtsai. 2000., Ma és mtsai. 1999., Pearl és mtsai. 2002., Suzuki és mtsai. 2002) egéren, patkányon és nyúlön egyaránt.

Célkitűzések

Kísérleteinkben az iszkémia/reperfúzió indukálta aritmiák farmakológiai befolyásolási lehetőségeit vizsgáltuk, izolált patkány és nyúlshíveken. Munkáinkat három fő témakörre összpontosítottuk:

I. Vizsgáltuk az α -MSH hatását a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére, a reperfúzió indukálta aritmiák kialakulásának csökkentésére, valamint a miokardiális apoptózis mechanizmusára. Választ kívántunk kapni arra, hogy az α -MSH képes-e gátolni az apoptózist, és ha igen, akkor mekkora dózis szükséges a programozott sejthalál gátlásához. Valamint koronária lekötés során képes-e az α -MSH csökkenteni az infarktusos terület nagyságát.

II. Kísérleteinkben választ kerestünk arra, hogy a prekondicionálás jelenségének jótékony hatása kifejezésre jut-e beteg (hiperkoleszterinémias) állatok esetén, illetve milyen módon befolyásolja a posztisztkémiás szívfunkciókat, a reperfúzió indukálta aritmiák előfordulását, ill. az infarktusos terület nagyságát.

III. Célkitűzéseink közé tartozott továbbá a standardizált szőlőkivonat kardioprotektív hatásának vizsgálata a posztisztkémiás szívfunkciókra, infarktusos terület nagyságára, valamint a szívben lévő malonaldehid koncentrációra. Meg kívántuk határozni a SSZK in vitro gyökfogó tulajdonságának mértékét.

Módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése:

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat (250-300 g) és New-Zealand nyulakat (2,2-2,6 kg) használtunk. Az állatok a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelően voltak tartva és felhasználva (NIH publication no. 86-23, 1985).

a, Az α -MSH előkezelés:

A kísérletek során a patkányok 3 csoportját külön-külön 40 μ g/ttkg, 200 μ g/ttkg és 400 μ g/ttkg koncentrációjú α -MSH oldattal kezeltük elő, melyet a háti részbe injektáltunk subcutan (s.c.). Egy mg α -MSH feloldására 50 μ l 0,1 M-os ecetsavat használtunk, és ehhez adtuk a kellő mennyiségű fiziológiás sóoldatot. A kontroll állatok ugyanezt az oldatot kapták, de hatóanyag nélkül. Egy adott patkány testtömegétől függően kb. 500 μ l oldatot kapott. A szívek izolálását megelőzően intravénásan (iv.) heparint (500 IU/ttkg) adtunk az állatoknak a trombusok kialakulásának megelőzésére.

b, A hiperkoleszterinémia létrehozása nyulakban:

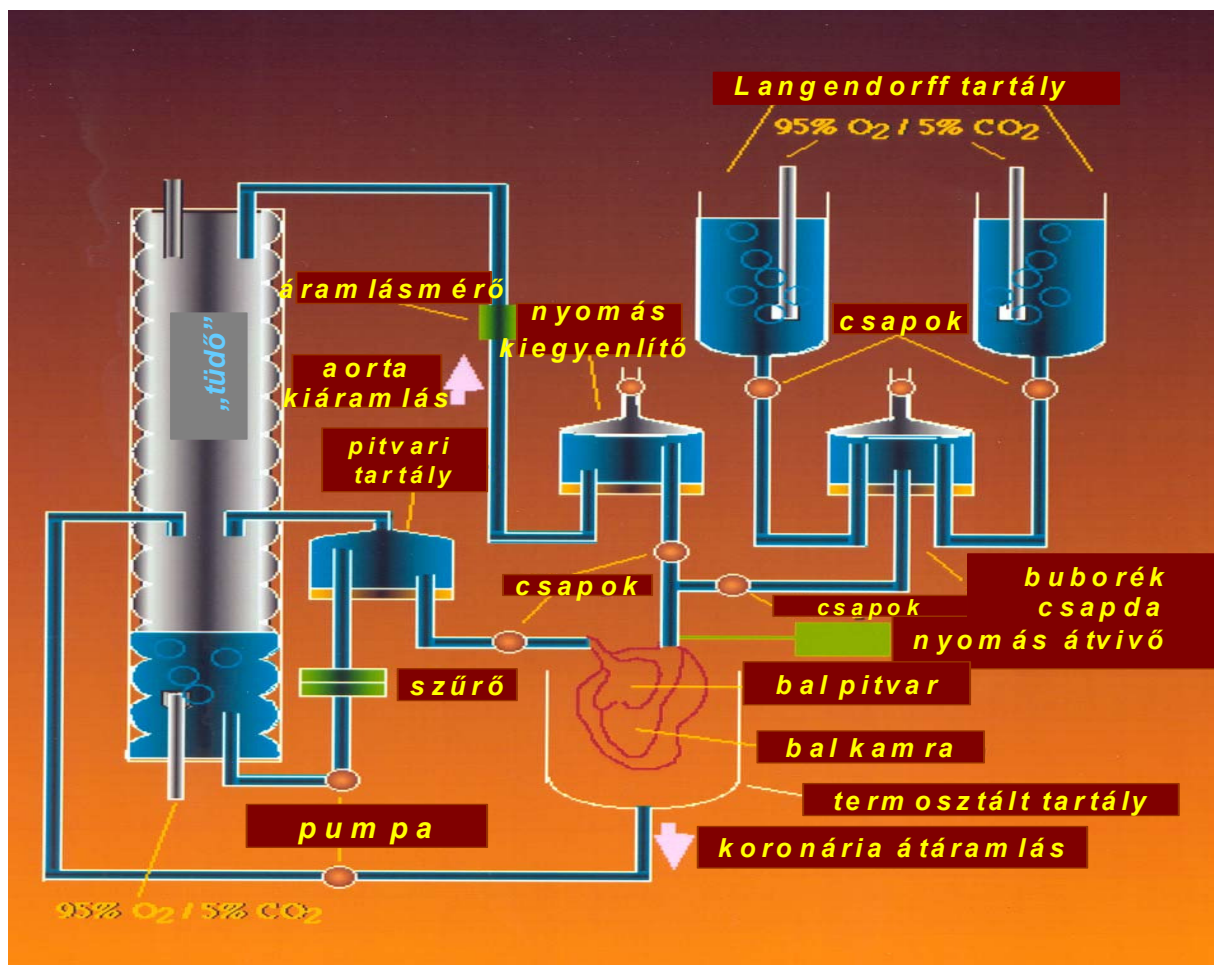
A kísérlet során az azonos korú nyulak 1,0 %-os koleszterinnel dúsított laboratóriumi állateledelt, a kontroll csoport tagjai pedig hagyományos koleszterinmentes eledelt kaptak (ad libitum). Az állatok etetése 8 héten keresztül történt. A 8 hét letelte után a szívek izolálását megelőzően az állatok 1000 IU/ttkg i.v. heparint, majd ketamine/xilazine (40/5 mg/ttkg) elegyét kapták intravénásan.

c, Előkezelés standardizált szőlőkivonattal:

A kísérlet során a kb. 300 g tömegű hím Sprague-Dawley patkányok 3 csoportját külön-külön 3 héten keresztül 50 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 200 mg/ttkg koncentrációjú standardizált szőlőkivonattal etettük naponta. A koncentráció legpontosabb bejuttatásához gyomorszondát használtunk. A SSZK-t piros, zöld és kék-fekete szőlők, magvas és mag nélküli változataikból állították elő (California Table Grape Commission, Fresno, CA, U.S.A.). A SSZK konzisztenciája szárított finom por volt. A kontroll állatok szintén gyomorszondán keresztül, 100 g testtömegre vonatkoztatva 45 μ g glükóz és 45 μ g fruktóz elegyét kapták naponta. Erre azért volt szükség, hogy teljes mértékben kizárjuk annak lehetőségét, hogy a jótékony hatásért a cukrok a felelősek. A másik kontroll csoport tagjai a laboratóriumi állateledelen kívül mást

nem kaptak. Ezeket a továbbiakban „natív-kontroll” csoportnak nevezzük. Az anesztéziát 65 mg/ttkg koncentrációjú pentobarbitál oldattal idéztük elő, a véralvadás megakadályozására pedig 500 IU/ttkg heparint alkalmaztunk intravénásan.

A mellkas megnyitása után mindhárom kísérlet során ugyanúgy jártunk el. A szívet kimetszettük és hideg perfúziós oldatba (Krebs-oldat) helyeztük. A preparálást követően a szívet az aortán és a vena pulmonalis-on keresztül ún. izolált „dolgozó-szív” perfúziós készülékkel tartottuk életben (1. ábra).



1. ábra. Izolált „dolgozó-szív” perfúziós készülék

A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit puffer volt, melynek összetétele a következő (mM-ban kifejezve): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,7 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 0,36 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 10 glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95 % O₂ és 5 % CO₂ keverékével telítettük (pH: 7,4 , 37 °C). A szívet 5 percig Langendorff-módszer szerint, tehát az aortán keresztül perfundáltuk 37 °C-on és konstans perfúziós nyomáson, mely 100 cm-es vízoszlop nyomásával volt egyenértékű (10 kPa).

Iszkémia/reperfúzió kiváltása:

A „mosási” periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk – megszüntetve az aortán keresztüli perfúziót, (a készülék Langendorff-részét kiiktatva) a szíveket a bal pitvar felől perfundáltuk, és az aortán keresztül történő kiáramlás útját (zárt rendszert létrehozva) kapcsoltuk a készülék „dolgozó” részéhez (Yamamoto és mtsai. 1984., Tosaki és mtsai. 1990). Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, s így meghatározott ideig (30 percig) „globál iszkémiát” hoztunk létre. A reperfúzió indításához megszüntettük az elzárásokat, s a reperfúziós fázis időtartama 120 perc volt.

Az iszkémia és a reperfúzió teljes ideje alatt, annak érdekében, hogy megvédjük a miokardiumot a kiszáradástól, a termosztált üvegedényt – mely a szívet körülvette – befedtük, s így a páratartalmat konstans (90-100 %) értéken tartottuk. A hőmérséklet ellenőrzését Type-K termo couple mikroprocesszoros termométerrel végeztük.

A posztiszkémiás szívfunkciók mérése, és a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció regisztrálása:

Iszkémia előtt (dolgozó módban) és a reperfúzió során (a 60. és 120. percekben) regisztráltuk a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlás (CF) és az aorta kiáramlás (AF) mértékét, valamint a bal kamrai nyomást (LVDP). Az aorta kiáramlást kalibrált áramlásmérővel, a koronária átáramlás mértékét pedig a szívből kicsöpögő folyadék meghatározott ideig történő gyűjtésével mértük. A szívfrekvenciát és a bal kamrai nyomást a készülékhez kapcsolt számítógépes rendszer segítségével határoztuk meg.

A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardiogramot (EKG), melyet a szívhez közvetlenül kapcsolódó két ezüst elektróddal vezettünk el. Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a kamrafibrilláció (VF) előfordulását, amelynek kialakulásakor szabálytalan alapvonal volt látható az EKG-on. Ezután a szíveket defibrilláltuk, és regisztráltuk a szívfunkciókat a már fent leírt módon.

Az α -MSH hatásának vizsgálata a molekulárbiológiai folyamatokra:

Az apoptózis követésére a DNS fragmentációjának vizsgálatát használtuk. A programozott sejthalál egy fázisában, a sejtmagban lévő DNS „feldarabolódik”, ami a gélelektroforetikus lemezen jellegzetes „létra” képben jelenik meg, mivel a különböző nagyságú komponensek molekulatömegüktől és töltésüktől függően vándorolva eltérő helyen adnak UV-elnyelést a lemezen.

A szíveket az előbbieken ismertetett 30 perc globál iszkémiának tettük ki, s a 120 perc reperfüzió leteltével vizsgáltuk az apoptózis kifejlődését. A vizsgálat során 80 mg szövetmintát folyékony nitrogénnel homogenizáltunk, majd 300 μ l lízis pufferrel, 60 μ l proteináz-K oldattal erősen összeráztuk, és egy órán át 55 °C-on inkubáltuk. Az inkubáció leteltével 300 μ l kötőpuffert és 150 μ l izopropanolt adtunk hozzá. Ezt egy erőteljes keverés és centrifugálás (1000 g) követte. A centrifugálást egy speciális Eppendorf tubusban végeztük, amelynek a belsejében egy mikropórusú szűrő helyezkedik el, és ez képes megkötni a fragmentálódott DNS-molekulákat. Ezután a szűrőre 650 μ l inhibitor puffert, 650 μ l mosó puffert vittünk, és újra centrifugáltuk (1000g) a megfelelő tisztítás végett. A szűrőről a fragmenseket 70 °C -os elúciós pufferrel mostuk le, és a mintát gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább (18 perc, 75 mV). A gél szerkezete 1,5 % -os agaróz gél volt.

Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata:

Az infarktusos területet kétféleképpen tanulmányozhatjuk. Az egyik a koronária descendens bal oldali ágának lekötése: egy hajlított sebészi tű segítségével sebészi varróanyagot húztunk át az említett koronária eredési helye alatt, majd a varróanyag végeit egy kis műanyag csövön vezettük keresztül. A „regionális iszkémiát” úgy hoztuk létre, hogy a csövet a szív felszínére szorítottuk és egy sebészi érfogóval a csöből kilógó varróanyag végeit leszorítottuk. A leszorítás sikerességét a koronária kiáramlás mérésével ellenőriztük. Amennyiben a CF legalább 60 %-ra lecsökkent, abban az esetben az okklúziót sikeresnek véltük. Ekkor a szívet Langendorff módszer szerint perfundáltuk a kísérletek végéig, mivel a koronária lekötésének ideje alatt „dolgozó”-módban a szív aritmiássá válna és kamrafibrilláció lépne fel. A szívet a 120 perc regionális iszkémia leteltével 1 %-os trifeniltetrazolium (TTC)-oldattal festettük meg az aorta-kanül oldalágán keresztül. A TTC-oldat az intakt miokardiumot piros színnel festette, míg az infarktusos területek fehérek maradtak.

A másik lehetőség, hogy a globál iszkémia után festjük meg a szíveket 1 %-os TTC-oldattal. A vizsgálat után a szíveket -70 °C-on tartottuk, majd a fagyott miokardiumból éles pengével metszeteket készítettünk az apiko-bazális tengelyre merőleges síkban. A metszetek

tömegét megmértük, és szárítás után két üveglap közé helyezve őket egy szkener és egy planimetriás software (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA.) segítségével meghatároztuk valamennyi metszet infarktusos területének értékét. Ezen területértékeket megszoroztuk a metszetek tömegeivel, és az eredményeket összegeztük. Végül az infarktusos területek nagyságát százalékosan fejeztük ki az infarktust szenvedett szívizom tömege és az össztömeg hányadosaként. Regionális iszkémiát váltottunk ki az α -MSH vizsgálata során, globál iszkémiát pedig a SSZK és a PC vizsgálatánál.

A malonaldehid monitorozása:

Az oxidatív stressz kialakulását nagyon jól jelzi a szívben lévő malonaldehid tartalom. Minél nagyobb a malonaldehid szint, annál erősebb az oxidatív stressz. Ennél fogva azok az anyagok (gyógyszerek) melyek csökkenteni képesek a malonaldehid szintet, jótékony hatással bírnak az oxidatív stressz visszaszorításában.

A malonaldehid méréséhez egy származékképzési reakciót alkalmaztunk, amihez 2,4-dinitrofenilhidrazint (DNPH) használtunk. A származékot pentánnal extraháltuk, majd 25 μ l eluenssel HPLC (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.) Beckman Ultrasphere C18 (3mm) kolonnájára injektáltuk. Az eluens összetétele: acetonitril:víz:ecetsav (40:60:0,1). Ezután izokratikus nyomáson és 307, 325, 356 nm-n detektáltuk (Cordis és mtsai. 1995).

A SSZK szabadgyökfogó tulajdonságának mérése:

A szőlő polifenolos komponenseket tartalmaz, így ezen vizsgálatok során arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a SSZK képes-e reagálni a különböző szabadgyökökkel és ha igen, akkor milyen mértékben. A „scavenger” aktivitás meghatározásához Lumat LB 9507 típusú luminometert (EG & G Berthold, Bad Wildbad, Germany) használtunk (Maulik és mtsai. 1997).

A szuperoxid-aniont kémiai állítottuk elő xantinból (100 μ M), xantin-oxidáz enzim (7 mU) hozzáadásával, 500 μ l reakciós puffer (10 mM nátrium-karbonát, pH 9,0, 28 mM luminol) jelenlétében. A reakció a xantin luminométerbe történő injektálásával kezdődik. A hidroxil-gyök előállításához szükséges puffer xantin-oxidázt (0,6 mU), 10 μ M nátrium-karbonátot, pH 9,0, 28 μ M luminolt, 100 μ M xantint, 100 μ M etilén-diamin-tetra-acetátot (EDTA) és 100 μ M FeCl₃-ot tartalmaz.

A „scavenger” aktivitást a szuperoxid-anionra 10 mU/ml szuperoxid-dizmutázzal (SOD), a hidroxil-gyökre pedig 500 μ g/ml dimetil-tioureával (DMTU) hasonlítottuk össze.

Iszkémia/reperfúzió kiváltása prekondicionált szívekben:

A PC nem más, mint rövid periódusú IS/RE-s folyamatok egymás utáni ismétlése, annak ciklusszámától függően (1XPC, 2XPC, 3XPC és 4XPC). A rövid periódus kísérleteinkben 5 perc globál iszkémia és 5 perc reperfúziót jelent. A PC-t a hiperkoleszterinémias és nem-hiperkoleszterinémias csoport nyulaival is elvégeztük (csoportonként 6 állat). A PC befejezése után 30 perc globál iszkémia következett, amit 120 perc reperfúzió követett. A ciklusszámot 1 és 4 között választottuk ki, mivel előzetes tanulmányok alapján ez az intervallum tűnik a leghasznosabbnak a miokardium védelmére, ill. az aritmia előfordulás visszaszorításának szempontjából az ép szívizomban (Chen és mtsai. 1999., Gysembergh és mtsai. 1999., Imagawa és mtsai. 1999., Kloner és mtsai. 2002., Maulik és mtsai. 1999., Morgen és mtsai. 1999., Sato és mtsai. 2000., Schultz és mtsai. 1998).

Statisztika:

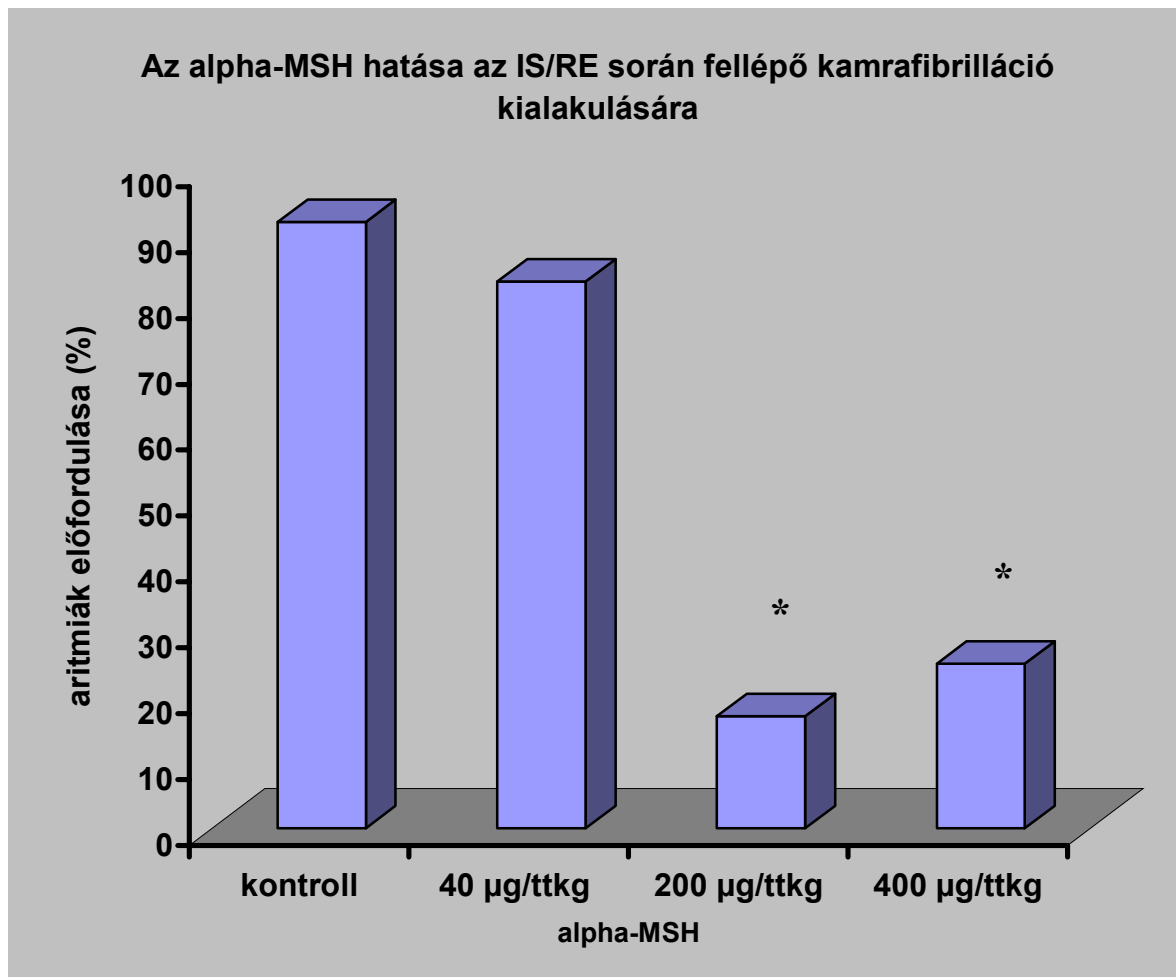
A szívfunkciók (HR, CF, AF, LVDP) értékeinek összehasonlításakor a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg. Először „kétutas” variancia analízist végeztünk, hogy megtudjuk, van-e különbség a különböző csoportok adatai között. Az α -MSH-val előkezelt kísérleteink során ezeket Bonferroni-teszttel, a SSZK-al történő kísérletek során Scheffe-teszttel, a prekondicionálás tanulmányozásánál pedig Dunnett-teszttel egészítettük ki. A VF és a VT nem parametrikus eloszlást követ (nem követi a Gauss eloszlást), ezért ezen paraméterek összehasonlításakor chí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és kezeletlen (kontroll) csoportok összehasonlításakor. Szignifikánsnak tekintettük a változást, ha a $p < 0,05$.

Eredmények

I. Az α -MSH hatása

Az állatok kiválóan tolerálták az α -MSH kezelést és semmilyen kóros és látható tünet nem jelent meg kezelésük során.

1.) α -MSH hatása a reperfüzió indukálta kamrafibrilláció kialakulására:



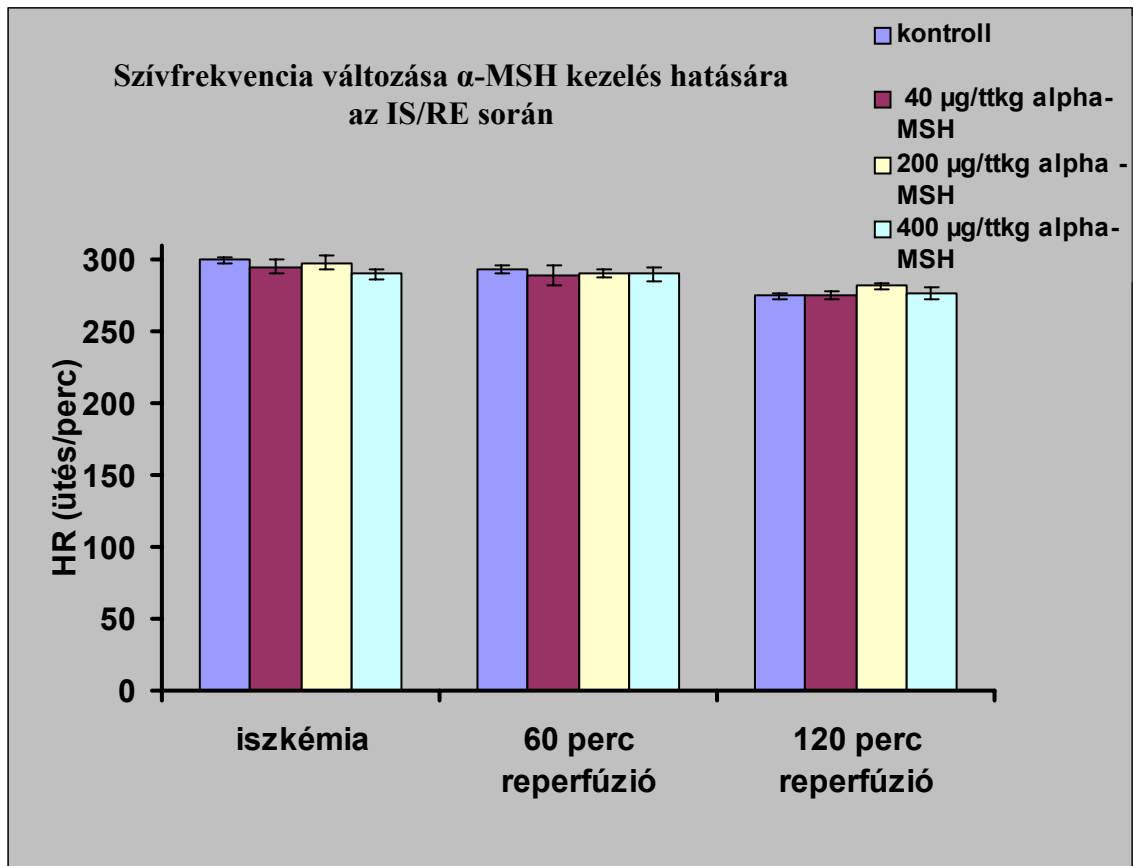
2. ábra. Az α -MSH hatása a kamrafibrilláció előfordulására (* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

Az ábrán látható, hogy a 200 $\mu\text{g/ttkg}$ és 400 $\mu\text{g/ttkg}$ koncentrációjú α -MSH kezelés csökkentette a kamrai fibrillációk kialakulását a kezeletlen kontroll értékhez viszonyítva 92 %-ról, 17 %-ra ($p < 0,05$) és 25 %-ra ($p < 0,05$) .

A 200 $\mu\text{g/ttkg}$ ill. 400 $\mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelés következtében a csökkenés statisztikailag szignifikánsnak bizonyult.

2.) α -MSH hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére:

2/a. α -MSH hatása a szívfrekvenciára:

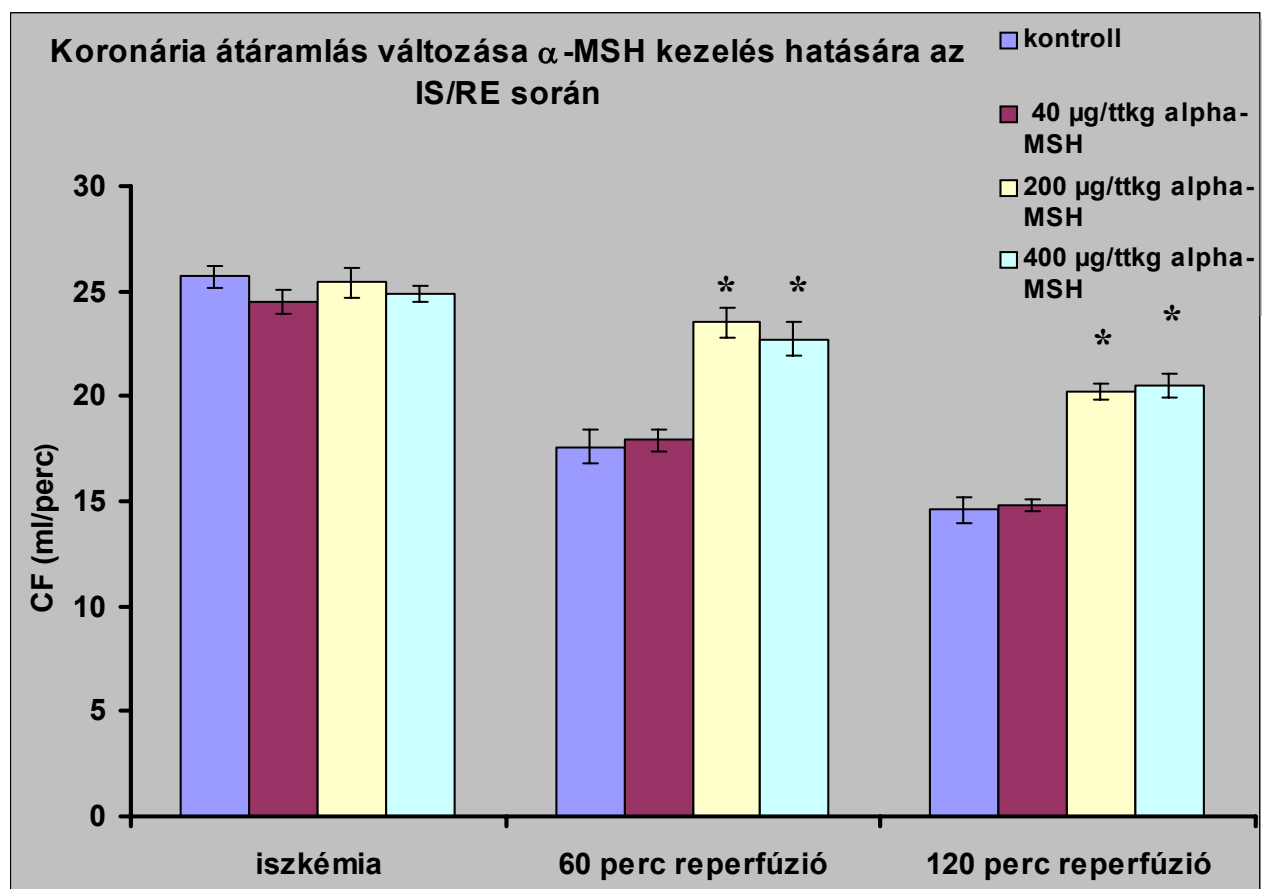


3. ábra. Az α -MSH hatása a szívfrekvenciára

A kezeletlen csoport szívfrekvencia értékei 300 ± 2 ütés/perc értékről 60 perc elteltével 293 ± 3 ütés/perc-re, illetve 120 perc elteltével 275 ± 2 ütés/perc-re változtak. A $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei a fentiek alapján 295 ± 5 ütés/perc-ről 289 ± 7 ütés/perc-re, ill. 275 ± 3 ütés/perc-re módosultak. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei 298 ± 5 ütés/perc-ről 291 ± 3 ütés/perc-re, ill. 282 ± 2 ütés/perc-re csökkentek. A $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei 290 ± 3 ütés/perc-ről 290 ± 5 ütés/perc-re, ill. 277 ± 4 ütés/perc-re változtak.

Az eredmények azt mutatják, hogy a szívfrekvencia nem változott jelentős mértékben az alkalmazott kezelés következtében, egyik dózis esetén sem.

2/b. α -MSH hatása a koronária átáramlásra:

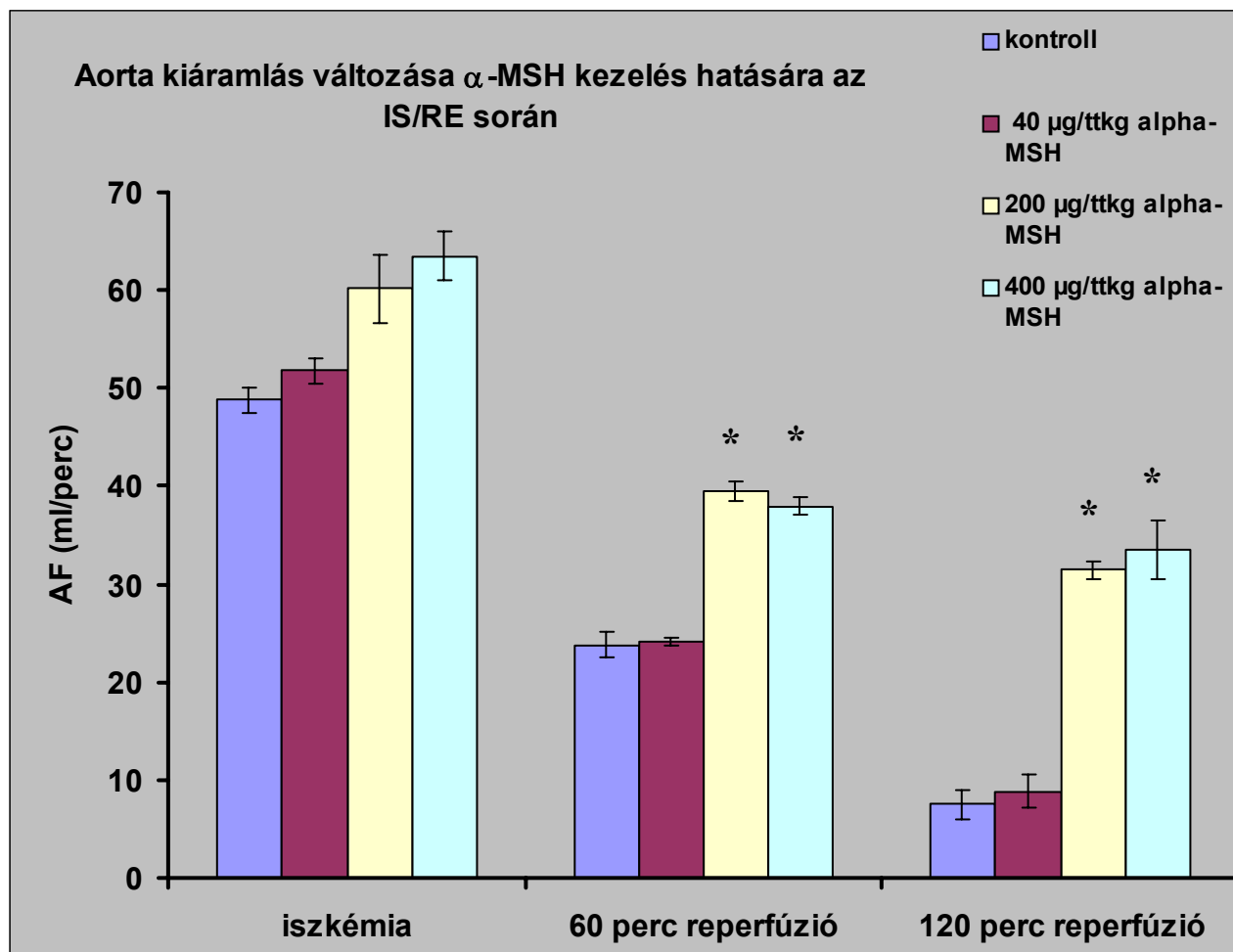


4. ábra. α -MSH hatása a koronária átáramlásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen csoport koronária átáramlás értékei $25,7 \pm 0,5$ ml/perc értékről 60 perc elteltével $17,6 \pm 0,8$ ml/perc-re, illetve 120 perc elteltével $14,6 \pm 0,6$ ml/perc-re változtak. A $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei a kontroll csoporthoz hasonló változást mutatnak ($17,9 \pm 0,5$ ml/perc a 60. percben és $14,8 \pm 0,3$ ml/perc a 120. percben), azaz javulás nem történt. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei a fentiek alapján $25,4 \pm 0,7$ ml/perc-ről $23,5 \pm 0,7$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $20,2 \pm 0,4$ ml/perc-re ($p < 0,05$) módosultak. A $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok koronária átáramlás értékei $24,9 \pm 0,4$ ml/perc-ről $22,7 \pm 0,8$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $20,5 \pm 0,6$ ml/perc-re ($p < 0,05$) változtak.

A 4. ábráról könnyen leolvasható, hogy a $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok CF értékei nem javultak, azonban az alkalmazott nagyobb dózisok szignifikáns mértékben javították a koronária átáramlás értékein a kontroll csoportok értékeihez viszonyítva.

2/c. α -MSH hatása az aorta kiáramlásra:

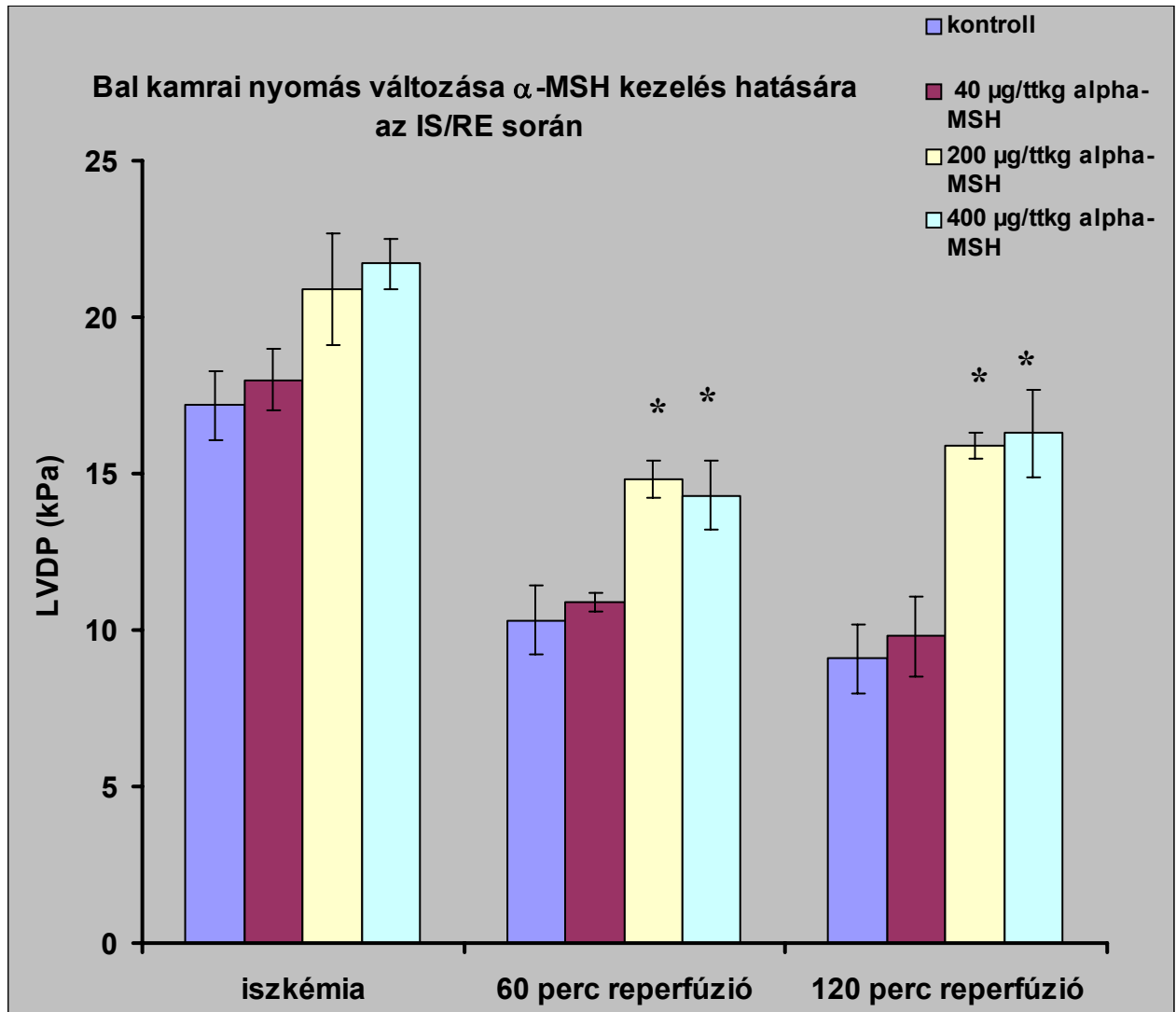


5. ábra. α -MSH hatása az aorta kiáramlásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen csoport aorta kiáramlás értékei $48,8 \pm 1,3$ ml/perc értékről az IS-át követő RE 60-ik percére $23,8 \pm 1,3$ ml-re , illetve 120 perc elteltével $7,5 \pm 0,5$ ml/perc-re módosultak. A $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei a fentiek alapján $51,8 \pm 1,3$ ml/perc-ről a reperfúzió során $24,2 \pm 0,4$ ml/perc-re, ill. $8,8 \pm 0,6$ ml/perc-ra változtak. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei $60,2 \pm 3,5$ ml/perc-ről $39,5 \pm 1$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $31,5 \pm 0,9$ ml/perc-re ($p < 0,05$) nőttek. A $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei $63,5 \pm 2,5$ ml/perc-ről $37,9 \pm 0,9$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $33,5 \pm 3$ ml/perc-re ($p < 0,05$) módosultak.

Az 5. ábrán látható, hogy a $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok AF értékei nem javultak. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ és $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei azonban szignifikáns javulást mutattak a kontroll csoporthoz képest, ami már az iszkémia előtti mérés esetén megnyilvánult (igaz, ott nem volt szignifikáns a változás).

2/d. α -MSH hatása a bal kamrai nyomásra:



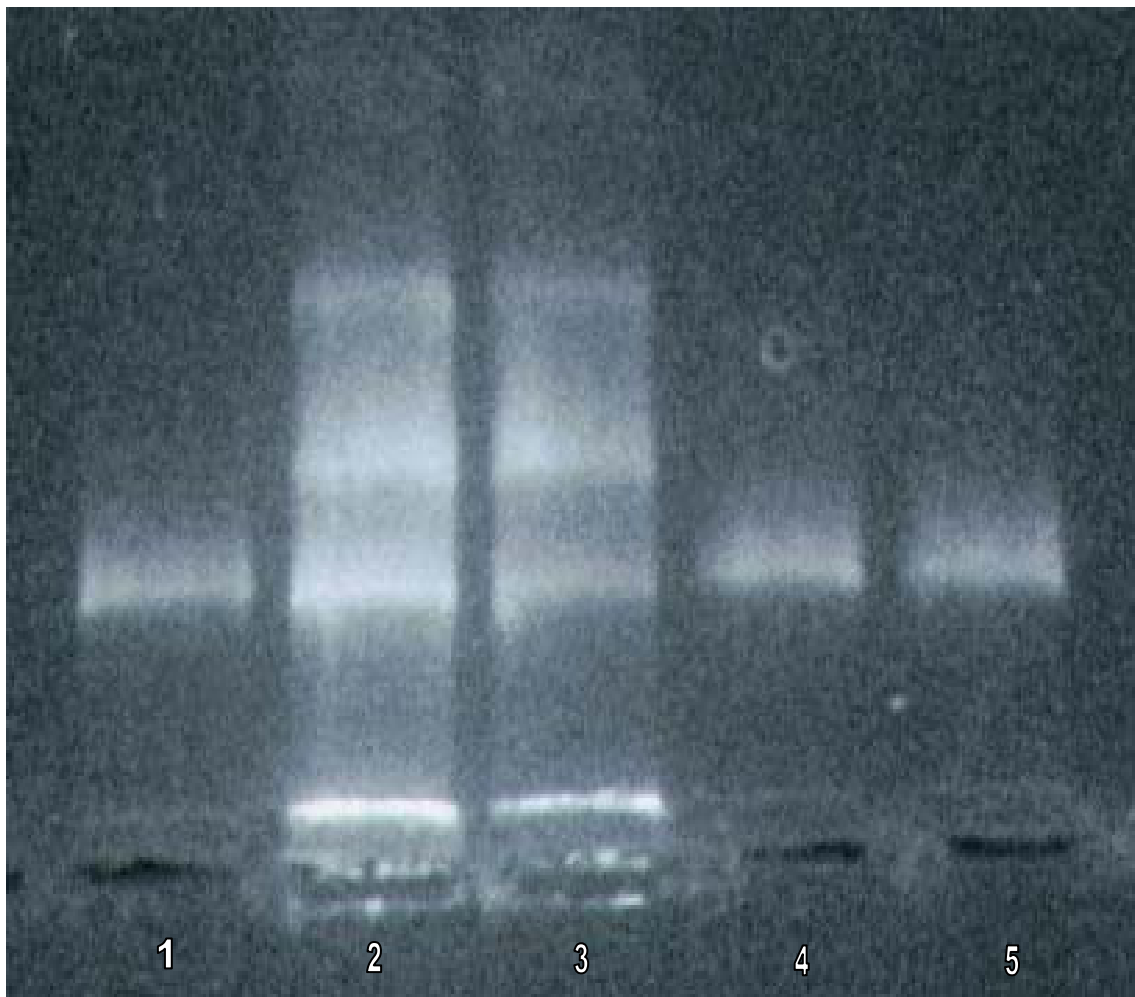
6. ábra. α -MSH hatása a bal kamrai nyomásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen csoport bal kamrai nyomás értékei $17,2 \pm 0,5$ kPa értékről az IS-át követő RE 60-ik percére $10,3 \pm 0,5$ kPa-ra, illetve 120 perc elteltével $9,1 \pm 0,4$ kPa-ra változtak. A $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei a fentiek alapján $18,0 \pm 0,6$ kPa-ról $10,9 \pm 0,3$ kPa-ra, ill. $9,8 \pm 0,3$ kPa-ra módosultak. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok értékei $20,9 \pm 1,1$ kPa-ról $14,8 \pm 0,6$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $15,9 \pm 0,4$ kPa-ra ($p < 0,05$), míg a $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok értékei $21,7 \pm 0,8$ kPa-ról $14,3 \pm 0,4$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $16,3 \pm 1,4$ kPa-ra ($p < 0,05$) változtak.

A 23. ábra azt mutatja, hogy a $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok LVDP értékei nem javultak számottevő mértékben a kontroll csoport értékeihez képest, ellenben a $200 \mu\text{g/ttkg}$ ill. $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-al kezelt állatok értékei szignifikáns növekedést mutattak. A nagyobb dózissal kezelt állatok LVDP értékeinél – az aorta kiáramlás

értékeihez hasonlóan – már a preiszkémiás fázisban is javuló tendenciát látunk a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, bár ez nem szignifikáns.

3.) α -MSH hatása az apoptózisra:

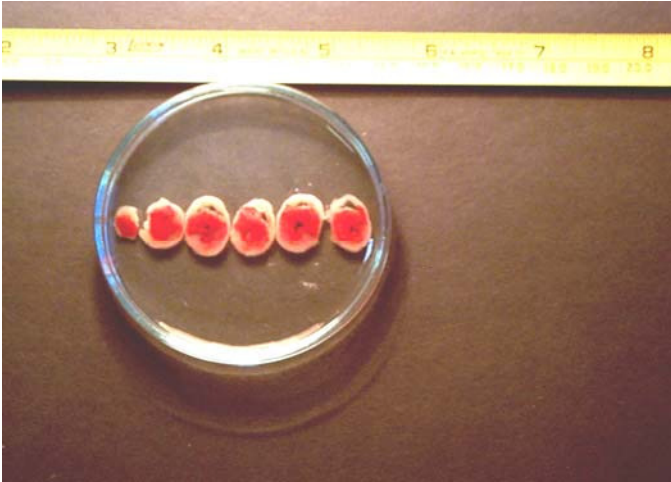


7. ábra. α -MSH hatása a DNS fragmentálódásra

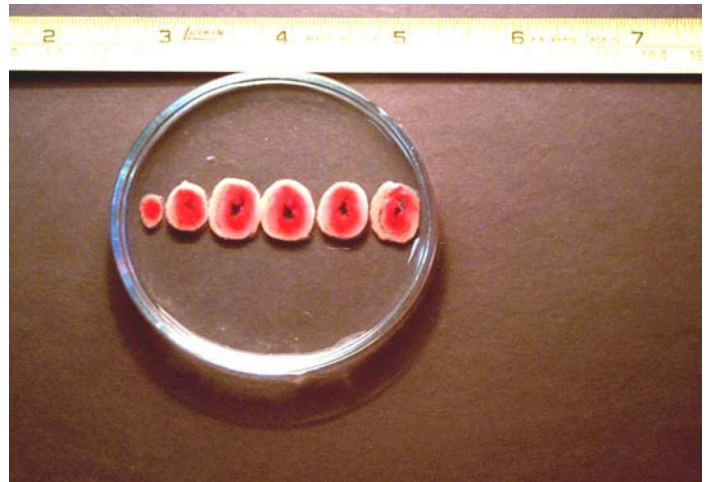
- 1. Nem iszkémiás, aerob kontroll**
- 2. IS/RE, gyógyszermentes kontroll**
- 3. IS/RE, 40 μ g/ttkg α -MSH**
- 4. IS/RE, 200 μ g/ttkg α -MSH**
- 5. IS/RE, 400 μ g/ttkg α -MSH**

A 7. ábrán jól látható, hogy az IS/RE során károsodott kezeletlen kontroll, ill. a 40 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ $\alpha\text{-MSH}$ -val kezelt állatok esetében észlelhető a „DNS-létra”, hiszen létrejött a programozott sejthalál folyamata, amit a DNS fragmentációja jelez (2. és 3.oszlop). A 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ és 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ $\alpha\text{-MSH}$ -val kezelt állatok esetében pedig gyakorlatilag ugyanaz látható, mint a nem iszkémiás, aerob kontrollnál, azaz a DNS töredezése elmarad. Ezek után indokoltan kezdtünk bele a következő munkafázisba, hiszen ha az előkezelés gátolta az apoptózist, akkor nagy valószínűséggel képes csökkenteni az infarktusos terület nagyságát is.

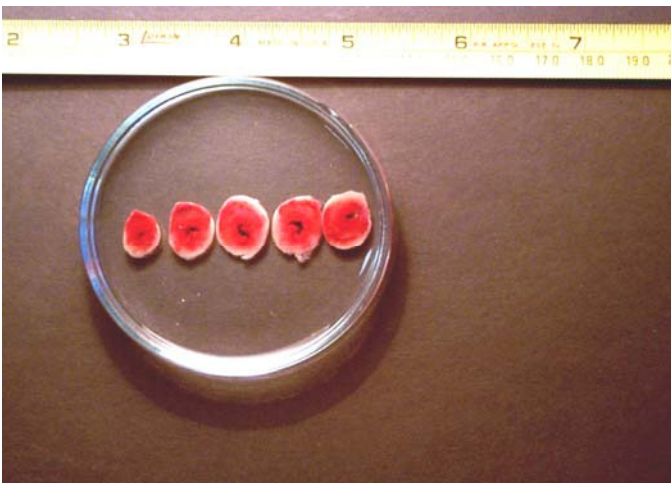
4.) α -MSH hatása az infarktusos terület nagyságára:



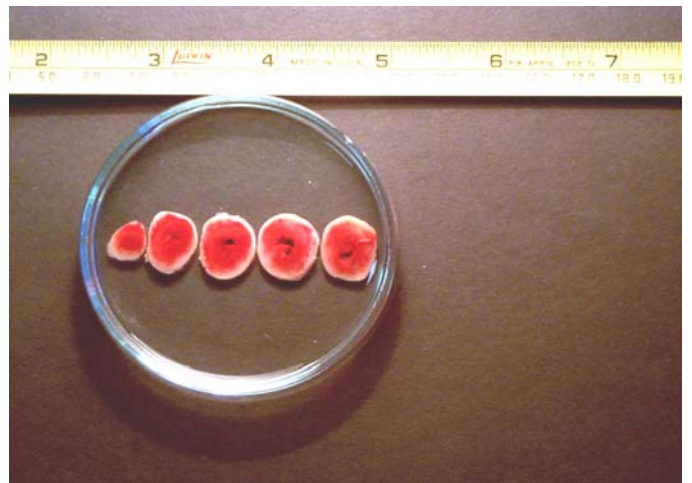
**A. Kezeletlen szív
IS/RE utáni metszetei**



**B. 40 μ g/ttkg α -MSH-val kezelt
szív IS/RE utáni metszetei**



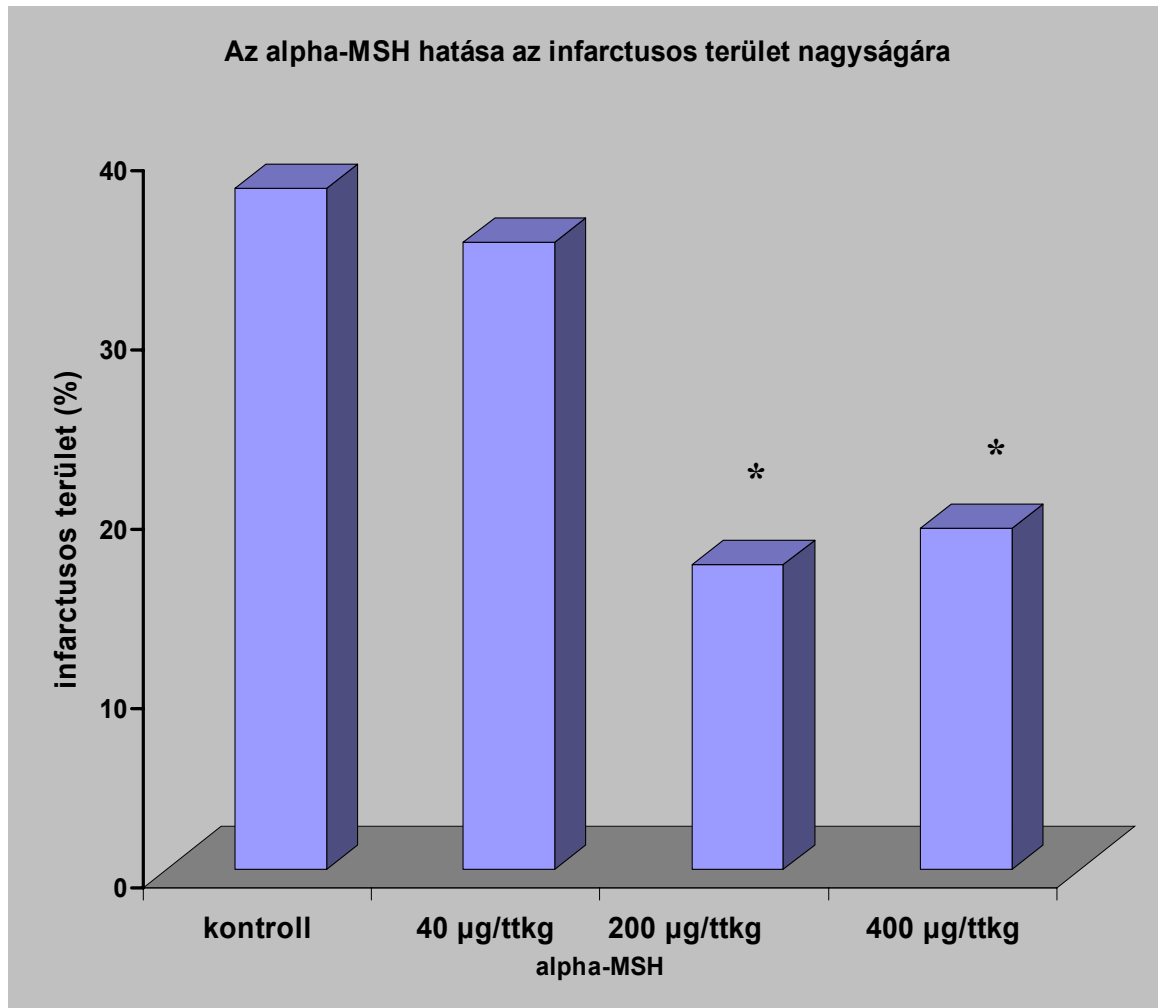
**C. 200 μ g/ttkg α -MSH-val kezelt
szív IS/RE utáni metszetei**



**D. 400 μ g/ttkg α -MSH-val kezelt
szív IS/RE utáni metszetei**

8. ábra. Az α -MSH kezelés hatása az infarktusos területre

A kezeletlen szív infarktusz területének nagysága 38 ± 5 %. Ez azt jelenti, hogy a szív több mint harmad része sérülést szenvedett az iszkémia miatt. A $40 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val kezelt szíveknél az infarktusz terület nagysága 35 ± 4 %. A $200 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val kezelt szíveknél ugyanez az érték 17 ± 3 %-ra csökkent. A $400 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val kezelt szívek infarktusz területének nagysága 19 ± 4 % volt.

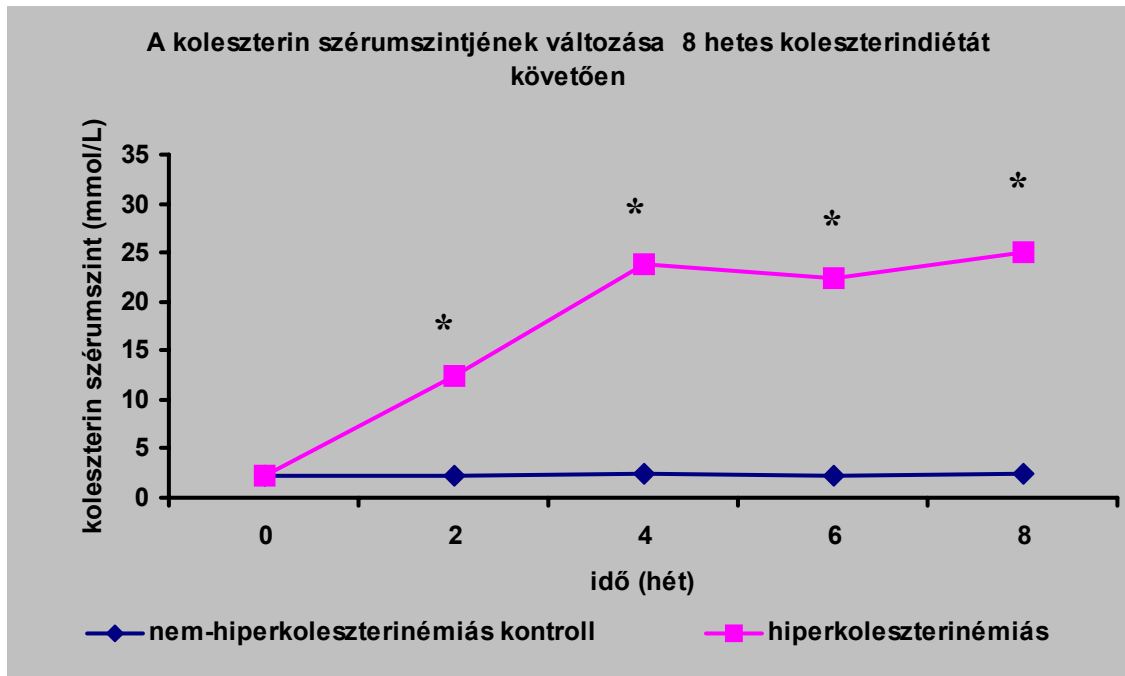


9. ábra. Az α -MSH infarktusz területek nagyságára gyakorolt hatása
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A $40 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os α -MSH kezelés nem volt képes megvédeni a miokardiumot a koronária okklúzió során bekövetkezett károsodástól, nem javított az IS/RE által kiváltott szövetelhalás mértékén. A $200 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ és $400 \mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val kezelt szívek esetében szignifikáns javulás volt tapasztalható. Az alkalmazott közepes és nagy dózisú kezelés mintegy felére csökkentette az infarktusz terület nagyságát (9. ábra).

II. A prekondicionálás hatása

1.) A koleszterin diéta hatása a szérumszintre:

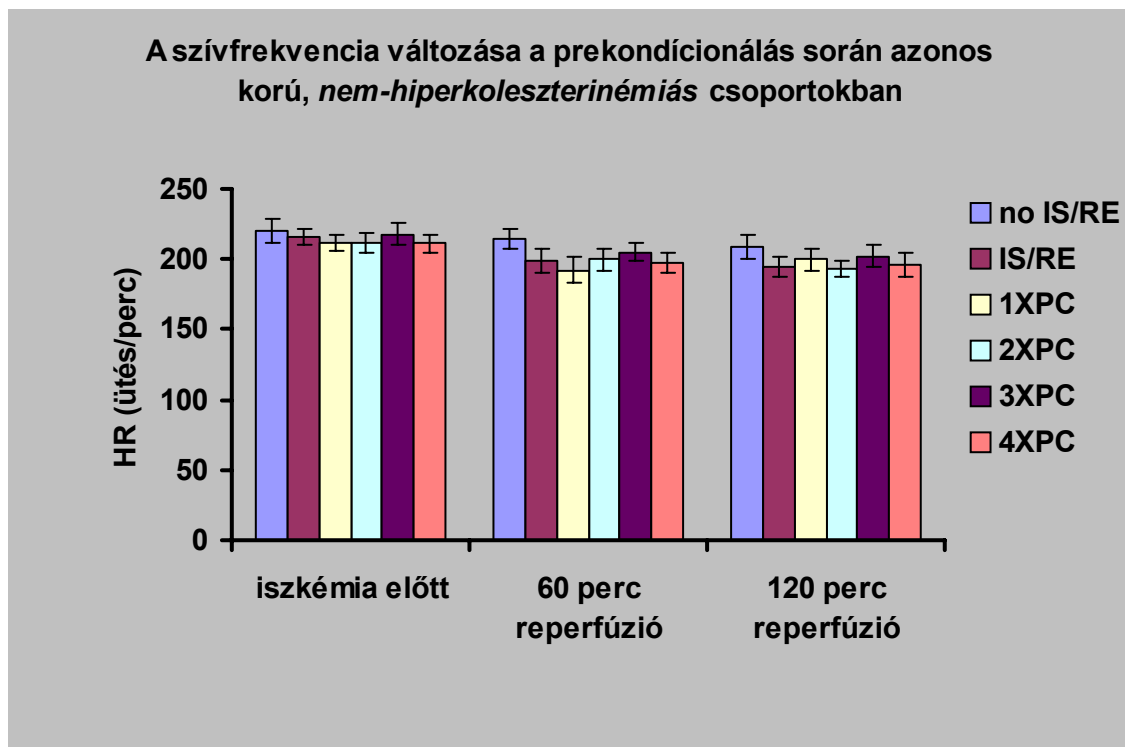


10. ábra. A koleszterin szérumszintjének változása 8 hetes koleszterin diétát követően

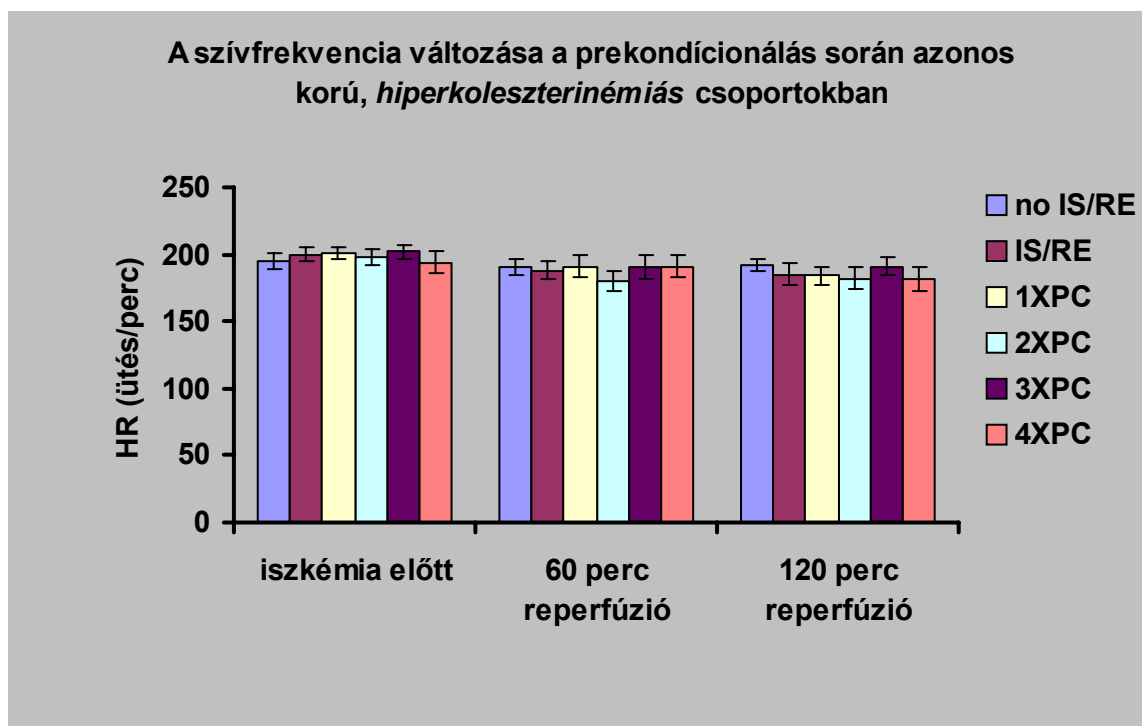
A *-al jelölt értékek szignifikánsak ($p < 0.05$) a nem-hiperkoleszterinémias kontroll csoportokhoz képest. A koleszterin diétában nem részesült (nem-hiperkoleszterinémias) csoportban a szérumban lévő koleszterin egyenletes plazmaszintet mutatott (2,2 mmol/L, 2,2 mmol/L, 2,4 mmol/L, 2,3 mmol/L, 2,4 mmol/L). A hiperkoleszterinémias csoport vérének koleszterin szintje már a 2. héten 12,5 mmol/L-re ($p < 0,05$), a 4. héten 23,8 mmol/L-re ($p < 0,05$), a 6. héten 22,4 mmol/L-re ($p < 0,05$), a 8. héten 25,1 mmol/L-re ($p < 0,05$) emelkedett. Ezen értékek statisztikailag szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoportokhoz képest.

2.) A prekondicionálás hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére:

2/a. PC hatása a szívfrekvenciára:

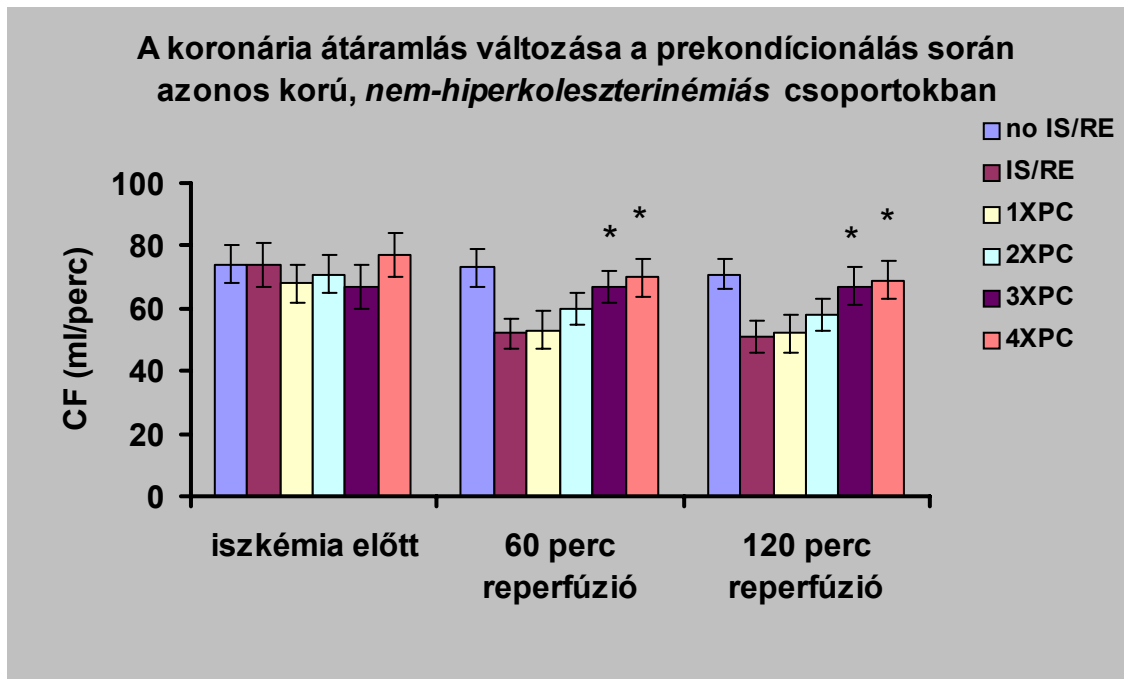


11. ábra. A PC hatása a nem-hiperkoleszterinémias nyulak szívfrekvenciájára

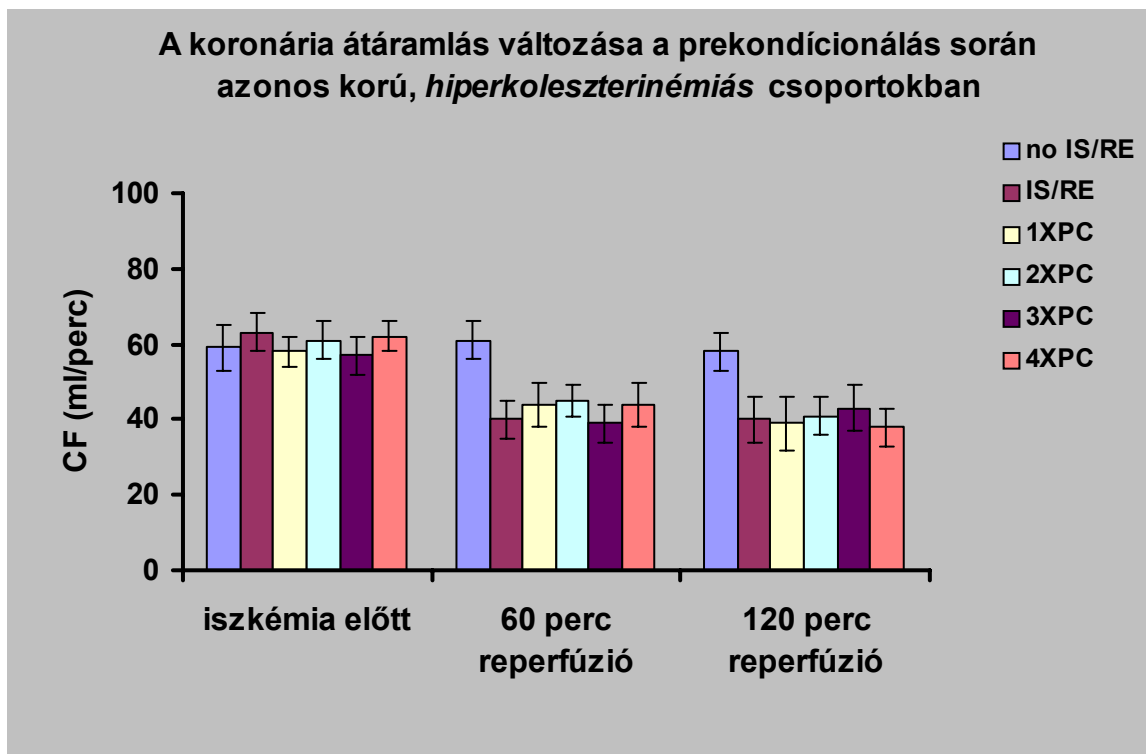


12. ábra. A PC hatása a hiperkoleszterinémias nyulak szívfrekvenciájára

2/b. A PC hatása a koronária átáramlásra:

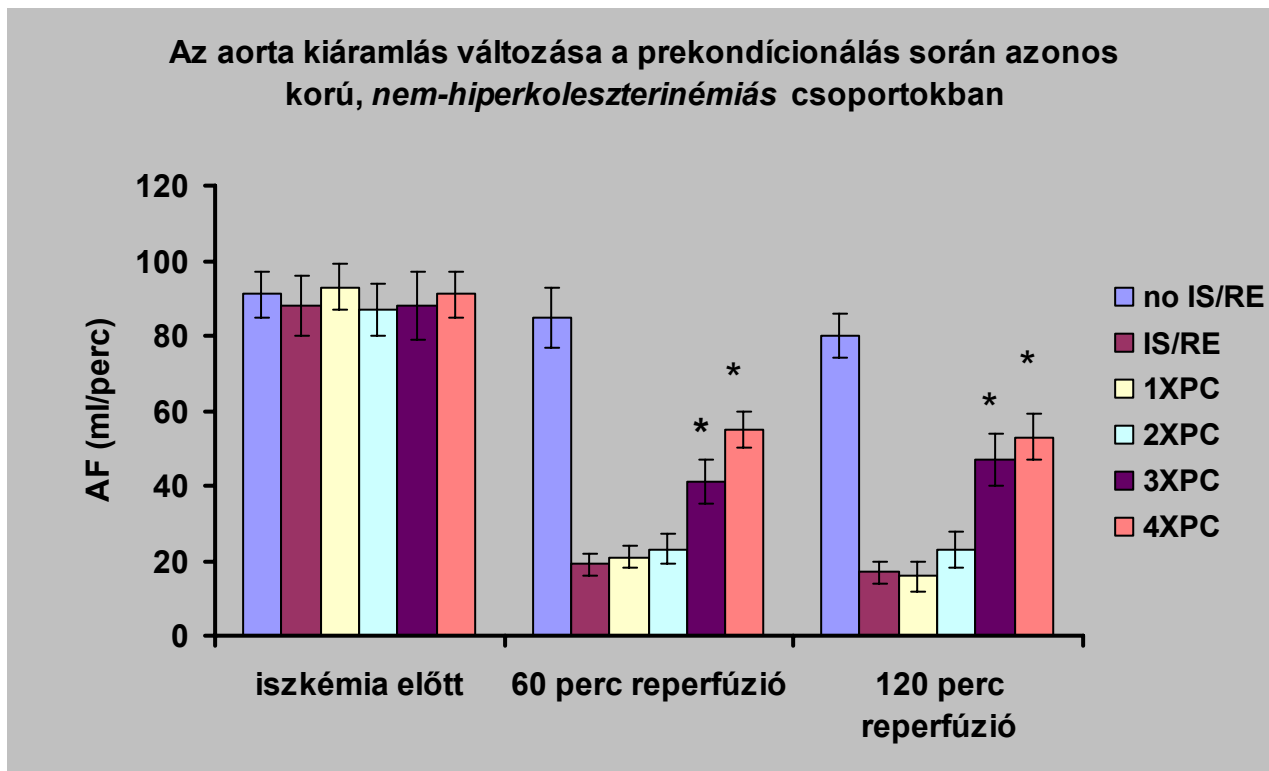


13. ábra. A PC hatása a nem-hiperkoleszterinémias nyulak koronária átáramlására

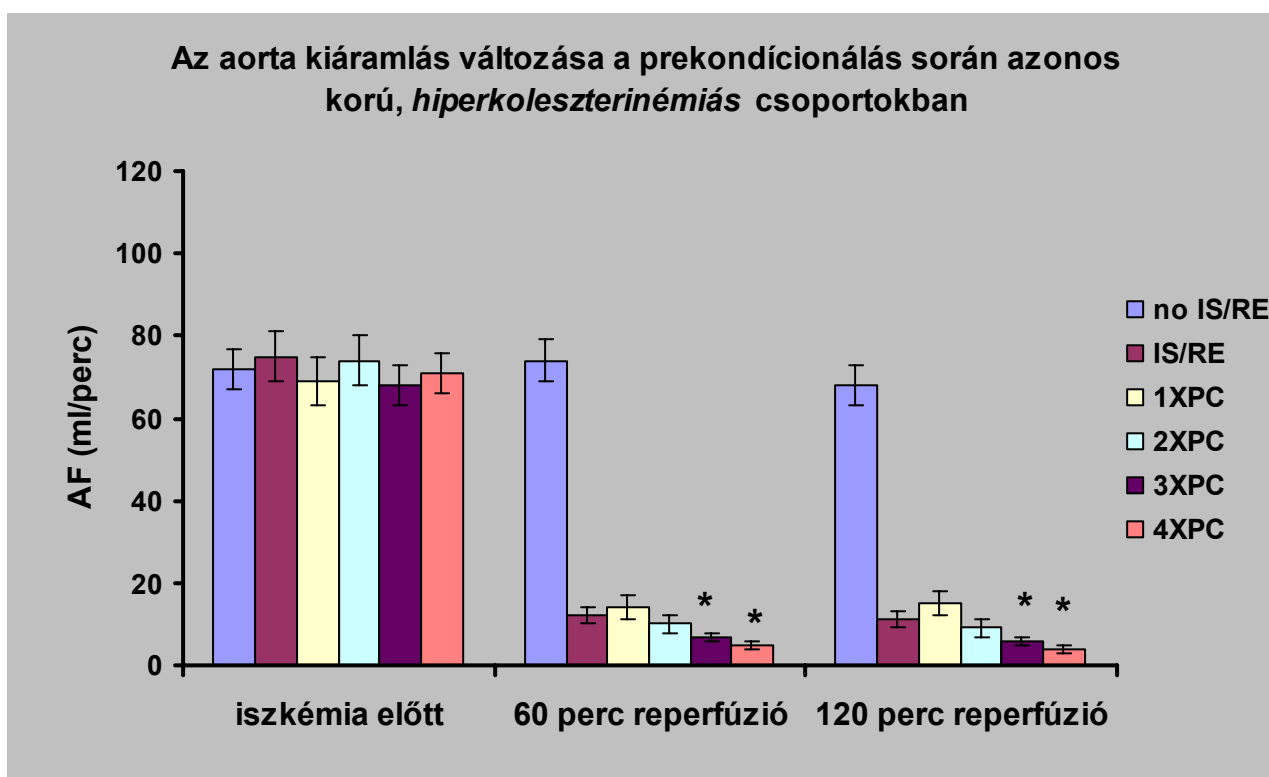


14. ábra. A PC hatása hiperkoleszterinémias nyulak koronária átáramlására

2/c. A PC hatása az aorta kiáramlásra:

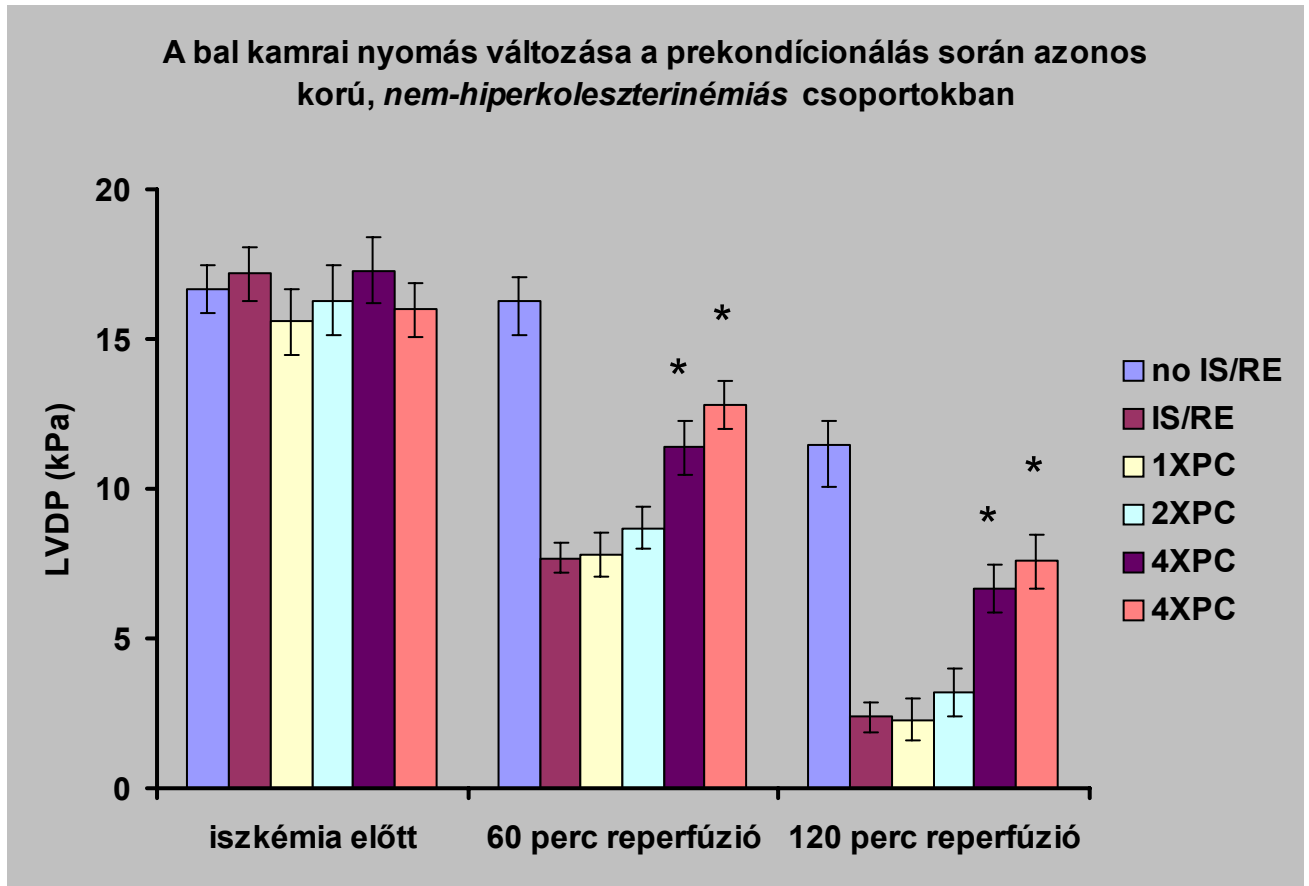


15. ábra. Az aorta kiáramlás változása a prekondicionálás során azonos korú, nem-hiperkoleszterinémiás csoportokban

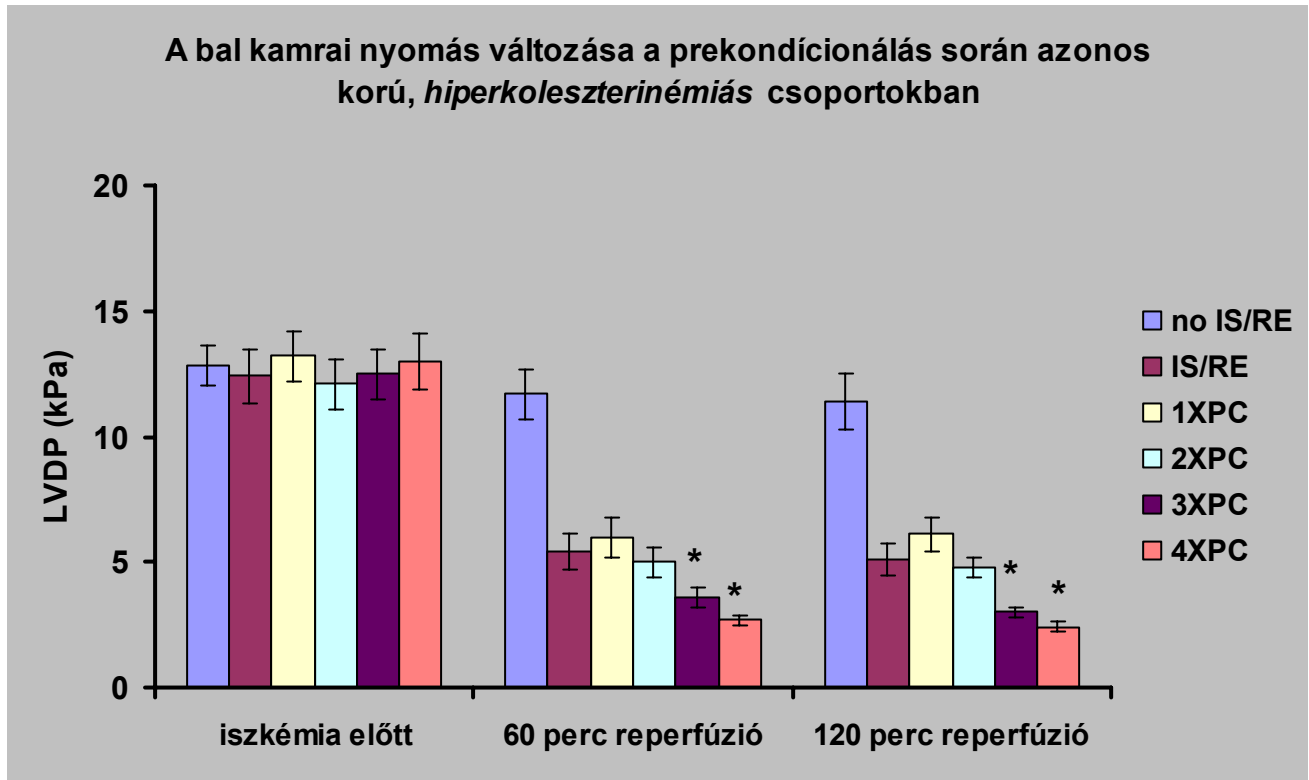


16. ábra. Az aorta kiáramlás változása a prekondicionálás során azonos korú, hiperkoleszterinémiás csoportokban

2/d. A PC hatása a bal kamrai nyomásra:



17. ábra. A bal kamrai nyomás változása a prekondicionálás során azonos korú, nem-hiperkoleszterinémias csoportokban



18. ábra. A bal kamrai nyomás változása a prekondicionálás során azonos korú, hiperkoleszterinémias csoportokban

Tanulmányaink második részében a PC hatásait hasonlítottuk össze a nem-hiperkoleszterinémias és a hiperkoleszterinémias csoport eredményeinek tükrében. A posztisztkémias szívfunkciók együttes értékelésére azért van szükség, mert ez így képez komplex logikai rendszert. A jelmagyarázat kiegészítéseként meg kell említenünk (ámbar a rövidítések listáján szerepel) azok pontos jelentését. A „no IS/RE” aerob (negatív) kontrollt jelenti, tehát ebben az esetben nem történt 30 perc iszkémia és 120 perc reperfúzió. Az IS/RE a pozitív kontrollt jelenti, azaz a szívet 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Az 1XPC, 2XPC, 3XPC, 4XPC azt jelenti, hogy a 30 perc iszkémiát megelőzően a szíveken hány ciklusú PC-t hajtottunk végre. Az iszkémia előtti vizsgálatokban azt találtuk, hogy a nem-hiperkoleszterinémias csoport HR, CF, AF, LVDP értékeihez képest a hiperkoleszterinémias csoport ugyanezen értékei szignifikáns csökkenést mutattak ($p < 0,05$). Mivel kísérleteinknek nem az volt a fő célja, hogy választ kapjunk a koleszterindiéta hatásaira, így ezen értékek leírásától és diszkussziójától eltekintek.

A szívfrekvencia vizsgálataiban nem találtunk szignifikáns eltérést a reperfúzió során. A koronária átáramlásnál azt tapasztaltuk, hogy a 3XPC ill. a 4XPC jótékony hatásának bizonyult a C csoportban a pozitív kontrollhoz képest. A C pozitív kontroll CF értéke a 60. percben 52 ± 5 ml/perc, a 120. percben 51 ± 5 ml/perc. Ehhez képest a 3XPC CF értéke a 60. percben 67 ± 5 ml/perc ($p < 0,05$) a 120. percben 67 ± 6 ml/perc ($p < 0,05$) és a 4XPC CF értéke a 60. percben 70 ± 6 ml/perc ($p < 0,05$) a 120. percben 69 ± 6 ml/perc ($p < 0,05$), amelyek statisztikailag javulást mutatnak. A hiperkoleszterinémias csoportban sem javulás, sem romlás nem volt tapasztalható a reperfúzió során a koronária átáramlás tekintetében.

A C csoportban a pozitív kontroll AF értéke a reperfúzió 60. percében 19 ± 3 ml/perc a 120. percben 17 ± 3 ml/perc. Ezen érték a 3XPC hatására a 60. percben 41 ± 6 ml/perc ($p < 0,05$), a 120. percben 47 ± 7 ml/perc ($p < 0,05$), és a 4XPC hatására a 60. percben 55 ± 5 ml/perc ($p < 0,05$), a 120. percben 53 ± 6 ml/perc ($p < 0,05$). Az egészséges állatok AF értékeit kedvezően befolyásolta a PC, hiszen statisztikailag szignifikáns növekedést láthatunk (15. ábra). Az AF a HC csoportban a reperfúzió 60. percében a pozitív kontroll esetén 12 ± 2 ml/perc, a 120. percben 11 ± 2 ml/perc. Ugyanezen érték a 3XPC hatására a 60. percben 7 ± 1 ml/perc ($p < 0,05$), a 120. percben 6 ± 1 ml/perc ($p < 0,05$), és a 4XPC hatására a 60. percben 5 ± 1 ml/perc ($p < 0,05$), a 120. percben 4 ± 1 ml/perc ($p < 0,05$). A HC csoportban tehát a PC a remélt javulással ellentétben szignifikáns romlást eredményezett az AF tekintetében (16. ábra).

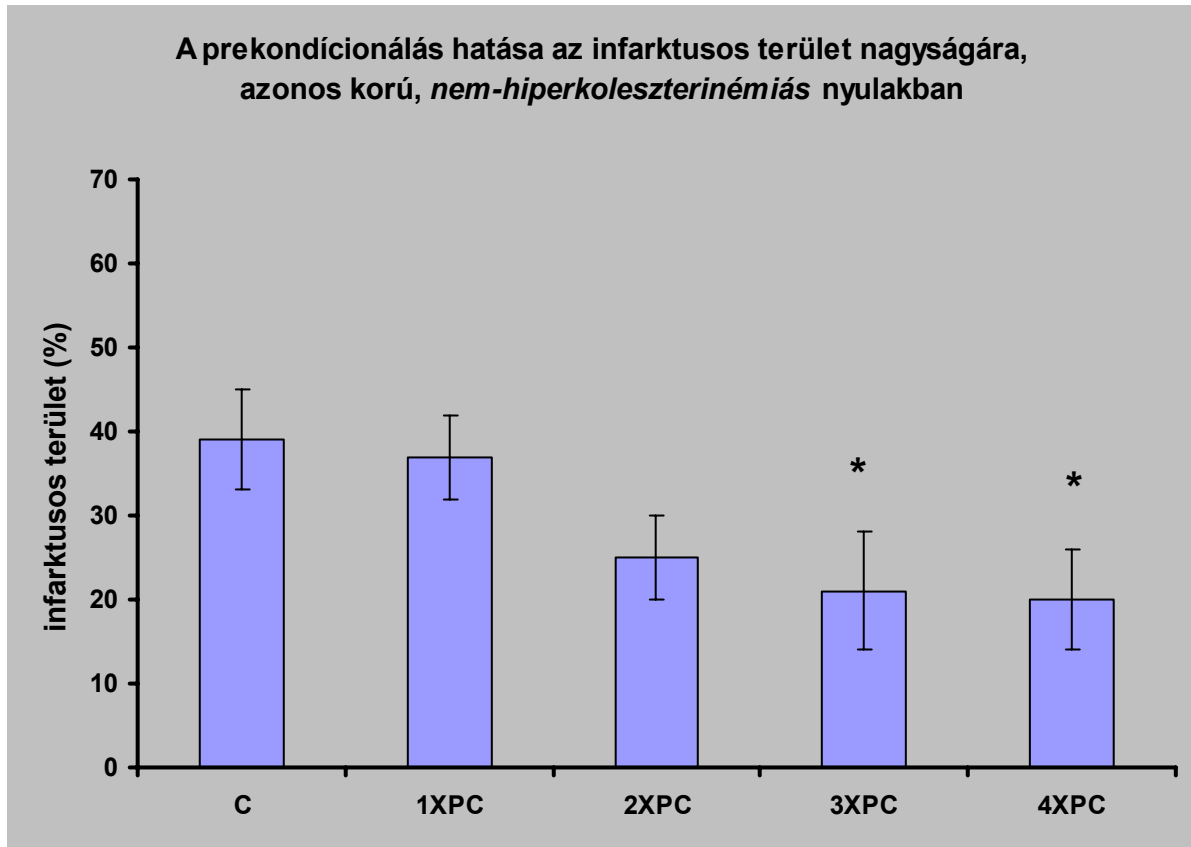
A 17. ábráról leolvashatjuk, hogy a C csoportban a pozitív kontroll LVDP értéke a reperfúzió 60. percében $7,7 \pm 0,5$ kPa, a 120. percben $2,4 \pm 0,5$ kPa. Ezen érték a 3XPC hatására

a 60. percben $11,4 \pm 0,9$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $6,7 \pm 0,8$ kPa ($p < 0,05$) és a 4XPC hatására a 60. percben $12,8 \pm 0,8$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $7,6 \pm 0,9$ kPa ($p < 0,05$). Az egészséges állatokra tehát ebben az esetben is kedvezően hatott a PC.

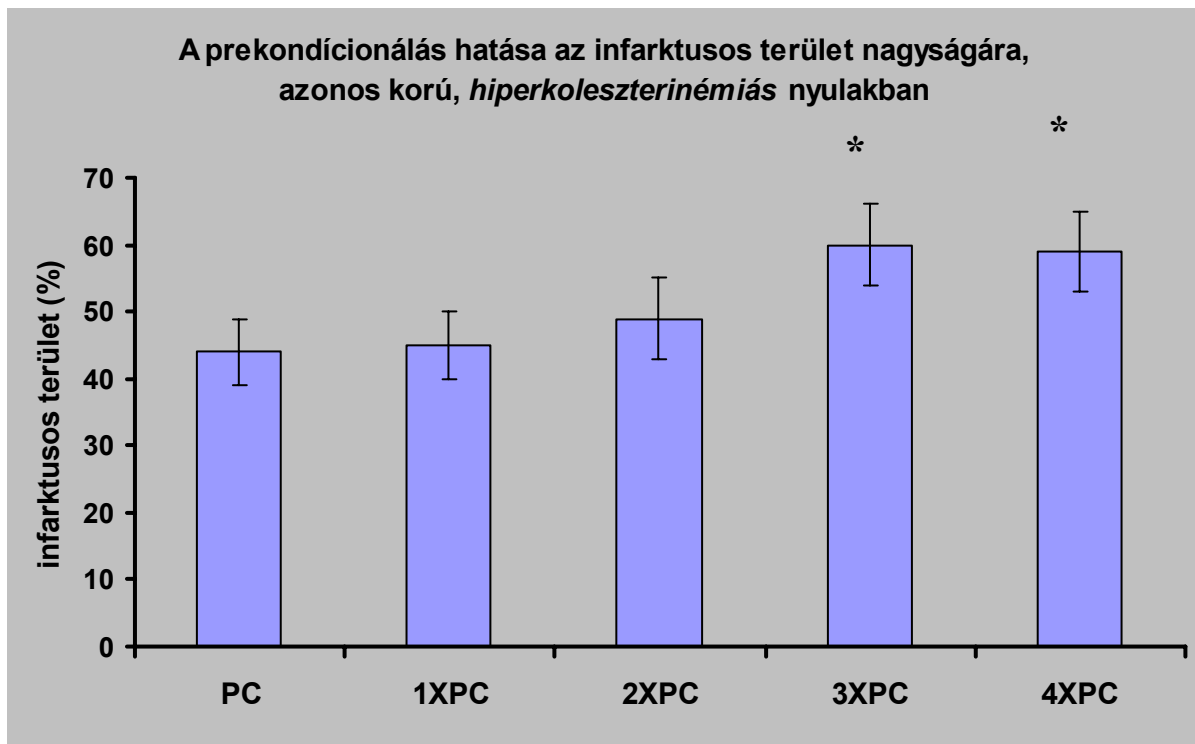
A 18. ábra jól demonstrálja, hogy a HC csoportban a pozitív kontroll LVDP értéke a reperfúzió 60. percében $5,4 \pm 0,7$ kPa, a 120. percben $5,1 \pm 0,6$ kPa. Ez az érték a 3XPC hatására a 60. percben $3,6 \pm 0,2$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $3 \pm 0,2$ kPa ($p < 0,05$) és a 4XPC hatására a 60. percben $2,7 \pm 0,2$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $2,4 \pm 0,2$ kPa ($p < 0,05$).

Eredményeink, összhangban számos korábbi tanulmánnyal azt igazolják, hogy a PC jelensége képes megvédeni az ép miokardiumot az IS/RE során elszenvedett károsodásoktól (Baxter és mtsai. 1995., 1996., Dickson és mtsai. 2001., Iliodromitis és mtsai. 1997., Kositprapa és mtsai. 2001., Morgan és mtsai. 1999., Schultz és mtsai. 1998.). Azt mindenképpen hangsúlyoznunk kell, hogy az előzőleg „sérült” beteg állatok esetén a PC a posztisztkémiás szívfunkciók terén nem bizonyult hasznosnak, sőt kimondottan károsnak tekinthető az iszkémiás szívizomkárosodás felépülése szempontjából. Végül a grafikonokról azt is leolvashatjuk, hogy a PC nem okoz szignifikáns változást 1 ill. 2 ciklusszám esetén.

3.) Prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára:



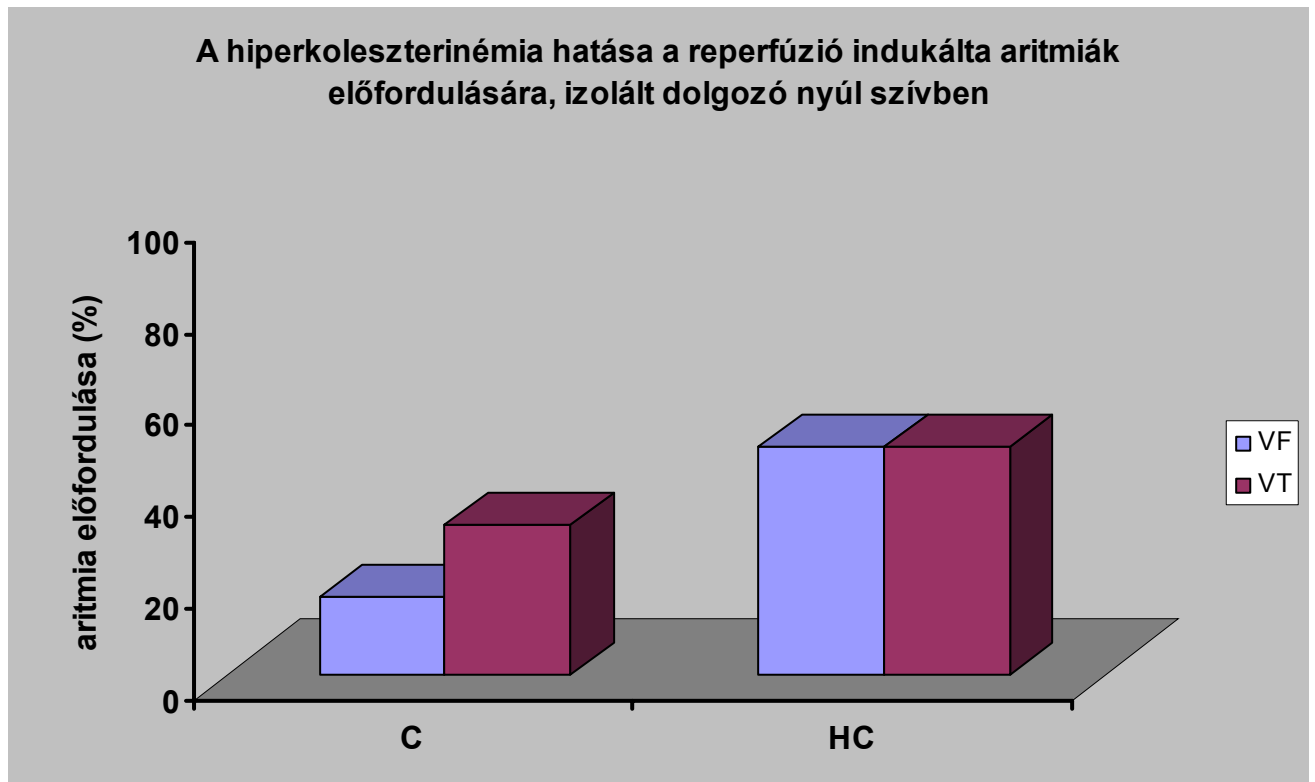
19. ábra. A prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára, azonos korú, *nem-hiperkoleszterinémias*, izolált nyúlszív-modellben



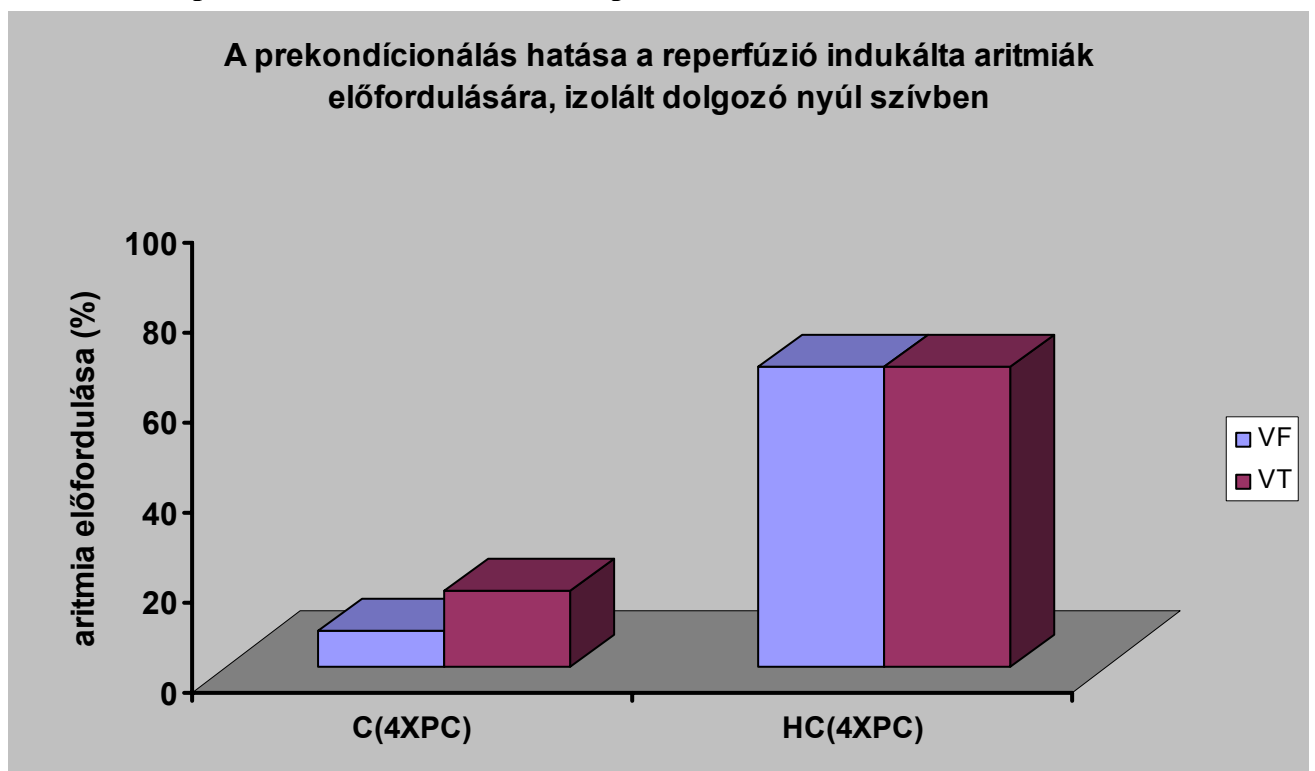
20. ábra. A prekondicionálás hatása az infarktusos terület nagyságára, azonos korú, *hiperkoleszterinémias*, izolált nyúlszív-modellben

A 19. ábra mutatja, hogy az egészséges (C) állatok szíveinek több mint harmad része ($39\pm 6\%$) elhalt a 30 perc iszkémia és a 120 perc reperfúzió során. A PC ciklusszámától függően, az elhalt terület nagysága 1XPC esetén $37\pm 5\%$ -ra, 2XPC-nál $25\pm 5\%$ -ra, 3XPC-nál, $21\pm 7\%$ -ra ($p<0,05$), 4XPC esetén pedig $20\pm 6\%$ -ra ($p<0,05$) csökkent. Az egészséges állatok szíveinek tehát kimondottan előnyös a PC, hiszen a 3XPC ill. a 4XPC szignifikáns módon csökkentette az infarktus kiterjedését, ami kedvező módon befolyásolja a szív adaptációját és túlélési esélyét. A beteg állatok (HC) vizsgálata során azt figyelhetjük meg, hogy a prekondicionálás ciklusszámától függően az infarktus mérete növekedett. A 20. ábra azt demonstrálja, hogy a prekondicionálás nélküli HC-ás csoport szívei az IS/RE lejártaival $44\pm 5\%$ -os szövetelhalást szenvedtek, amely majdnem a szívszövet felét jelenti. A HC-ás csoportban azonban a remélt protektív hatás az előző kísérletekkel megegyezően elmaradt, hiszen a ciklusszám növekedésével az infarktus nagysága $45\pm 5\%$, $49\pm 6\%$, $60\pm 6\%$ ($p<0,05$), $59\pm 6\%$ -ra ($p<0,05$) növekedett. Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a PC az egészséges állatokon (C) jótékony hatásának bizonyult, ezzel szemben a beteg (HC) patkányok szívein nem javított, hanem statisztikailag is szignifikáns elhalás növekedést (romlást) idézett elő.

4.) A PC és a HC hatása az aritmiák megjelenésére:



21. ábra. A hiperkoleszterinémia hatása a reperfúzió indukálta aritmiák előfordulására



22. ábra. A prekondicionálás hatása a reperfúzió indukálta aritmiák előfordulására

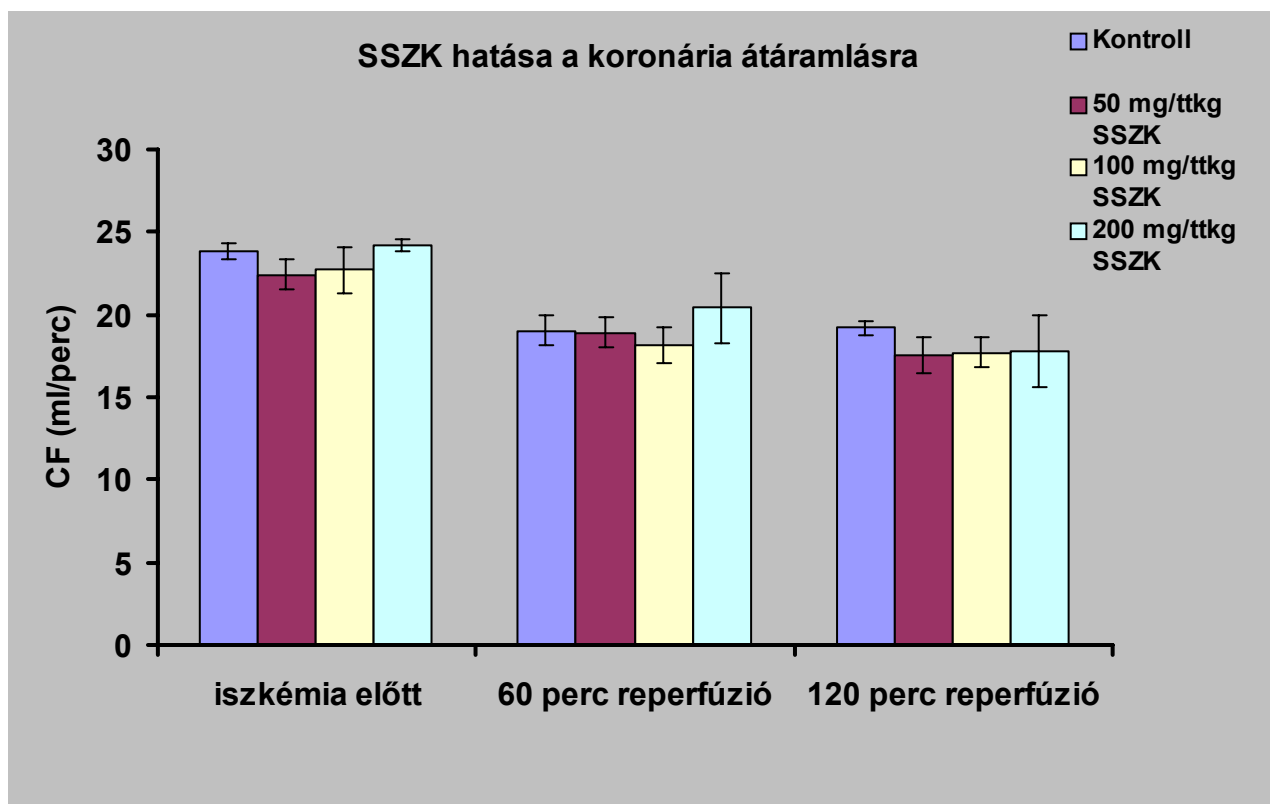
A 21. ábra mutatja, hogy a 8 hetes koleszterindiéta hogyan befolyásolta az aritmiák előfordulási gyakoriságát. A nem-hiperkoleszterinémiás kontroll (C) csoportban a 30 perc iszkémiát követően 17 %-ban fordult elő a VF és 33 %-ban a VT. Ebben a kísérletben az

iszkémia előtt nem alkalmaztunk PC-t, mert arra voltunk kíváncsiak, hogy a koleszterindiéta milyen módon befolyásolja a szív aritmiára való hajlamát. Várakozásunknak megfelelően, ezek az értékek mindkét esetben (VF, VT) 50 %-ra növekedtek a hiperkoleszterinémias állatok esetén, ami azt jelenti, hogy a koleszterindús táplálék bevitele kimondottan hátrányosan érintette a HC-ás csoport tagjait. Kísérletünkben arra is választ kerestünk, hogy mi történik akkor, ha a két csoport elemeit 4XPC-nak vetjük alá a 30 perces iszkémia előtt. A 4XPC-t azért választottuk, mert az befolyásolta legnagyobb mértékben a posztisztkémiás szívfunkciókat és az infarktusz terület nagyságát is. A 22. ábra jól szemlélteti, hogy az egészséges patkányoknál (C) a 4XPC a VF-ót 8 %-ra, a VT-át pedig 17 %-ra csökkentette. A (HC)-ás állatokban ezek az értékek mindkét esetben (VF, VT) 67 %-ra emelkedtek, ami egy fokozott aritmiakészséget mutat. Előző kísérleteinkkel analóg módon a PC itt sem hozott pozitív eredményeket a „beteg” csoport szempontjából.

III. A SSZK hatása

1.) A SSZK hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére:

1/a. SSZK hatása a koronária átáramlásra:

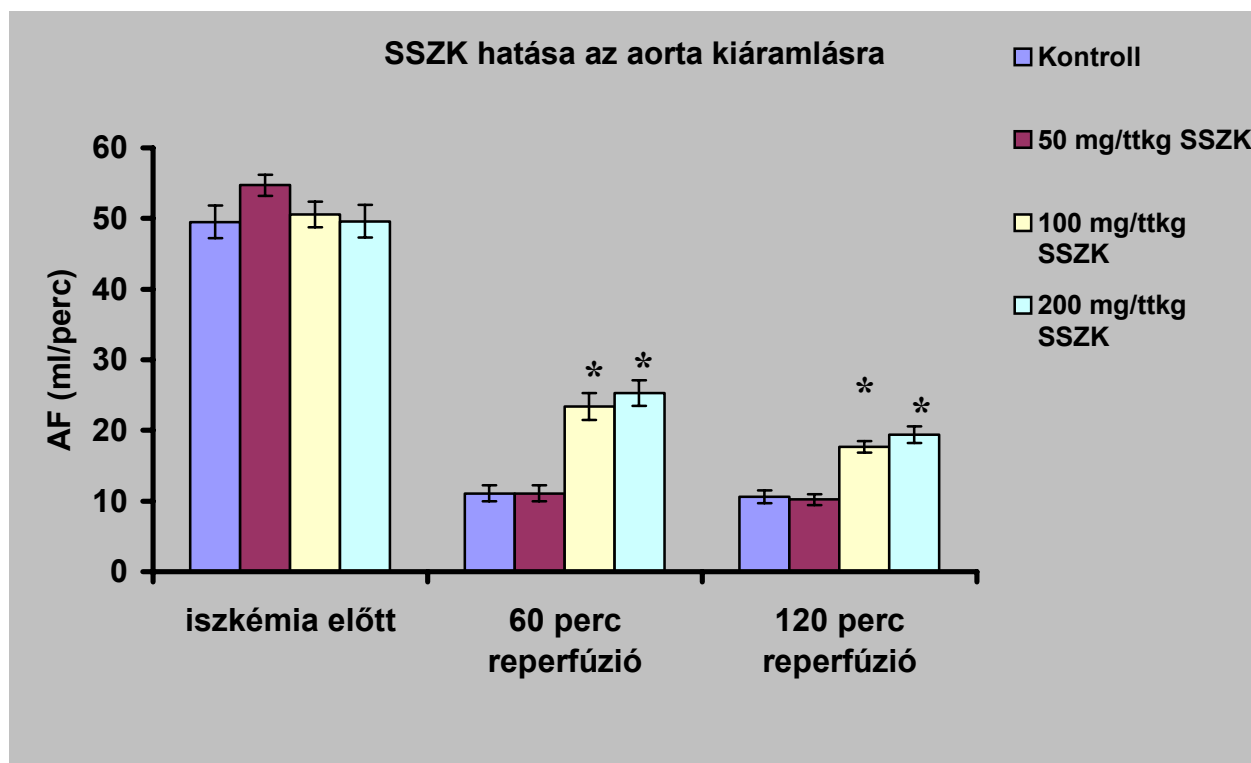


23.ábra. A SSZK hatása a koronária átáramlásra

A kezeletlen csoport koronária átáramlás értékei az iszkémiát követő RE során $23,8 \pm 0,5$ ml/perc értékről 60 perc elteltével $19,0 \pm 0,9$ ml/perc-re, illetve 120 perc elteltével $19,2 \pm 0,4$ ml/perc-re változtak. Az 50 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok értékei az iszkémia előtti $22,4 \pm 0,9$ ml/perc értékről 60 perc reperfúzió elteltével $18,9 \pm 0,9$ ml/percre, 120 perc reperfúzió elteltével pedig $17,5 \pm 1,1$ ml/percre változtak. A 100 mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei a fentiekkel egyező protokoll szerint $22,7 \pm 1,4$ ml/perc-ről $18,1 \pm 1,1$ ml/perc-re, ill. $17,7 \pm 0,9$ ml/perc-re módosultak. A 200 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok koronária átáramlás értékei $24,2 \pm 0,4$ ml/perc-ről $20,4 \pm 2,1$ ml/perc-re, ill. $17,8 \pm 2,2$ ml/perc-re változtak.

A 23. ábrán látható, hogy a SSZK kezelésben részesült állatok CF értékei szignifikáns változást nem mutattak, még nagyobb dózis alkalmazása esetén sem, tehát a koronária átáramlásra a SSZK előkezelésnek izolált patkány szíven nincs hatása.

1/b. SSZK hatása az aorta kiáramlásra:



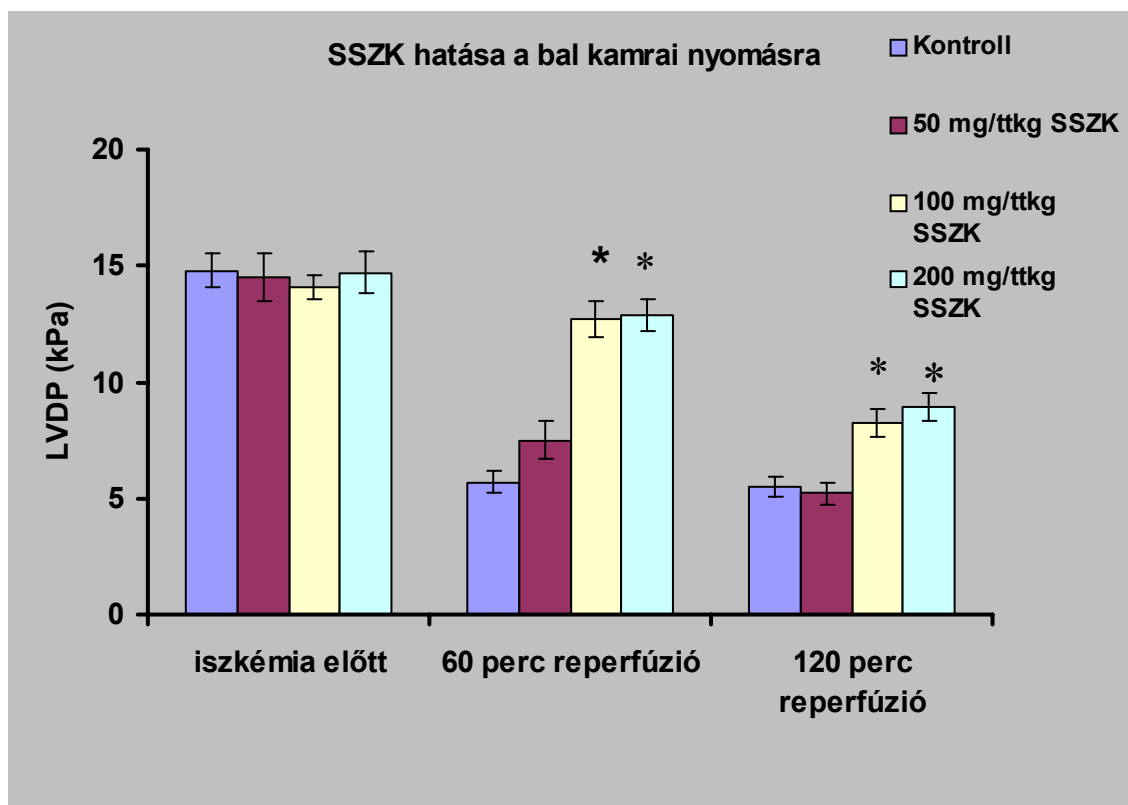
24. ábra. A SSZK hatása az aorta kiáramlásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen csoport aorta kiáramlás értékei a RE folyamán $49,5 \pm 2,3$ ml/perc értékről 60 perc elteltével $11,1 \pm 1,1$ ml/perc-re, illetve 120 perc elteltével $10,6 \pm 0,9$ ml/perc-re módosultak.

Az 50 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok értékei $54,7 \pm 1,5$ ml/perc-ről $11,1 \pm 1,1$ ml/perc-re, ill. $10,2 \pm 0,8$ ml/perc-re változtak. A 100 mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei $50,6 \pm 1,8$ ml/perc-ről $23,4 \pm 1,9$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $17,7 \pm 0,8$ ml/perc-re ($p < 0,05$) változtak. A 200 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok értékei $49,6 \pm 2,3$ ml/perc-ről $25,3 \pm 1,8$ ml/perc-re ($p < 0,05$), ill. $19,4 \pm 1,2$ ml/perc-re ($p < 0,05$) módosultak.

A 24. ábrán látható, hogy a 50 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok AF értékei nem javultak, míg a 100 mg/ttkg és 200 mg/ttkg SSZK-al etetett állatok értékei szignifikáns javulást mutattak a kontroll csoporthoz képest, tehát a nagyobb dózisu előkezelések kedvezően hatnak az aorta kiáramlásra.

1/c. SSZK hatása a bal kamrai nyomásra:



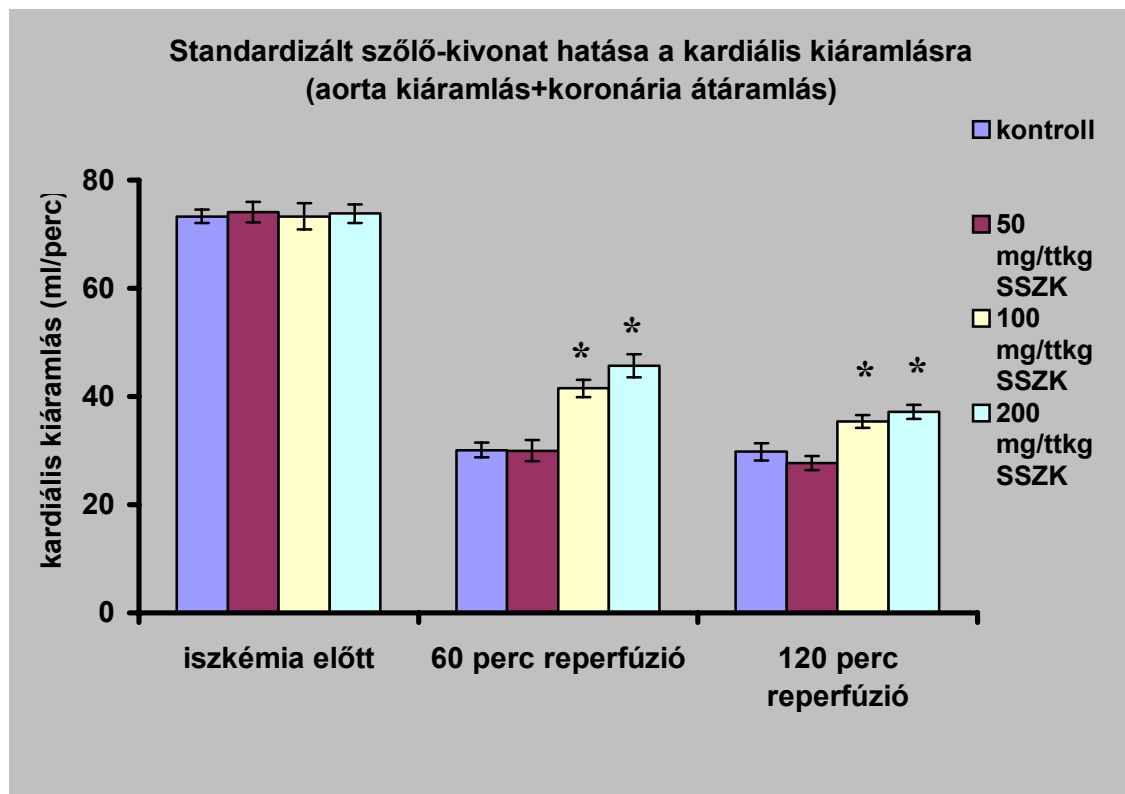
25.ábra. A SSZK hatása a bal kamrai nyomásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen csoport bal kamrai nyomás értékei a RE folyamán $14,8 \pm 0,7$ kPa értékről 60 perc elteltével $5,7 \pm 0,5$ kPa-ra, illetve 120 perc elteltével $5,5 \pm 0,4$ kPa-ra változtak. Az 50 mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei a fentiek alapján $14,5 \pm 1,0$ kPa-ról $7,5 \pm 0,8$ kPa-ra, ill. $5,2 \pm 0,5$ kPa-ra módosultak. A 100 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok értékei $14,1 \pm 0,5$ kPa-ról $12,7 \pm 0,8$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $8,2 \pm 0,6$ kPa-ra ($p < 0,05$), míg a 200 mg/ttkg

SSZK-al előkezelt állatok értékei $14,7 \pm 0,9$ kPa-ról $12,9 \pm 0,7$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $8,9 \pm 0,6$ kPa-ra ($p < 0,05$) változtak.

A 25. ábráról leolvasható, hogy az 50 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok LVDP értékei nem javultak számottevő mértékben a kontroll csoport értékeihez képest, ellenben a 100 mg/ttkg ill. 200 mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei szignifikáns növekedést mutattak. A nagyobb dózisokkal kezelt állatok LVDP értékei az aorta kiáramlás értékeihez hasonlóan, szignifikáns különbséget nem mutattak, a preiszkémias fázisban. AZ LVDP értékei is bizonyítják, hogy a megfelelő dózisu standardizált szőlőkivonat szignifikánsan javítja a patkányszív pumpafunkcióját.

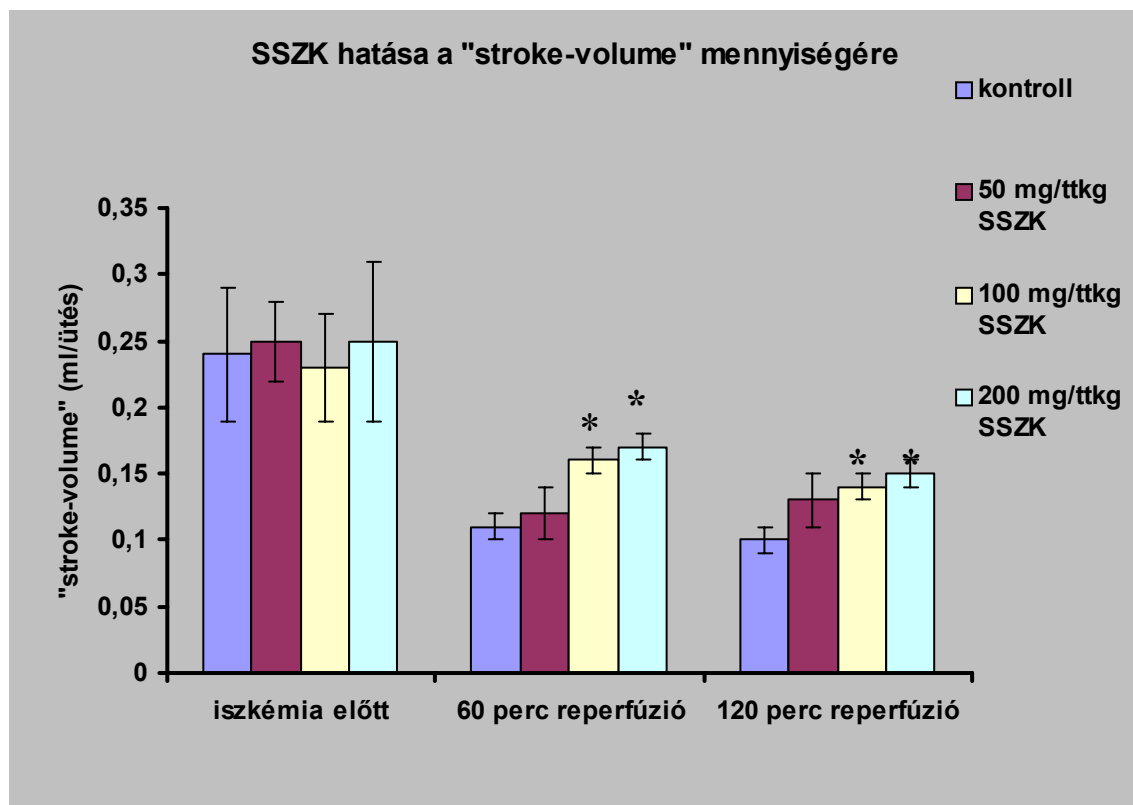
1/d. SSZK hatása a kardiális kiáramlásra:



26. ábra. A SSZK hatása a kardiális kiáramlásra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kardiális kiáramlás értéke nem más, mint a szívből kiáramló összefolyadék mennyisége, azaz a koronária átáramlás és az aorta kiáramlás összege, amelyeket az előző két ábra értékeiből pontosan kiszámolhatók. Fontos megemlítenünk, hogy az előző ábrákhoz hasonlóan itt is a nagyobb dózisok bizonyultak hatásosnak, annak ellenére, hogy a koronária átáramlás önmagában nem okozott szignifikáns változást. A 100 mg/ttkg és a 200 mg/ttkg SSZK viszont szignifikáns javulást okozott a kardiális kiáramlásban ($p < 0,05$).

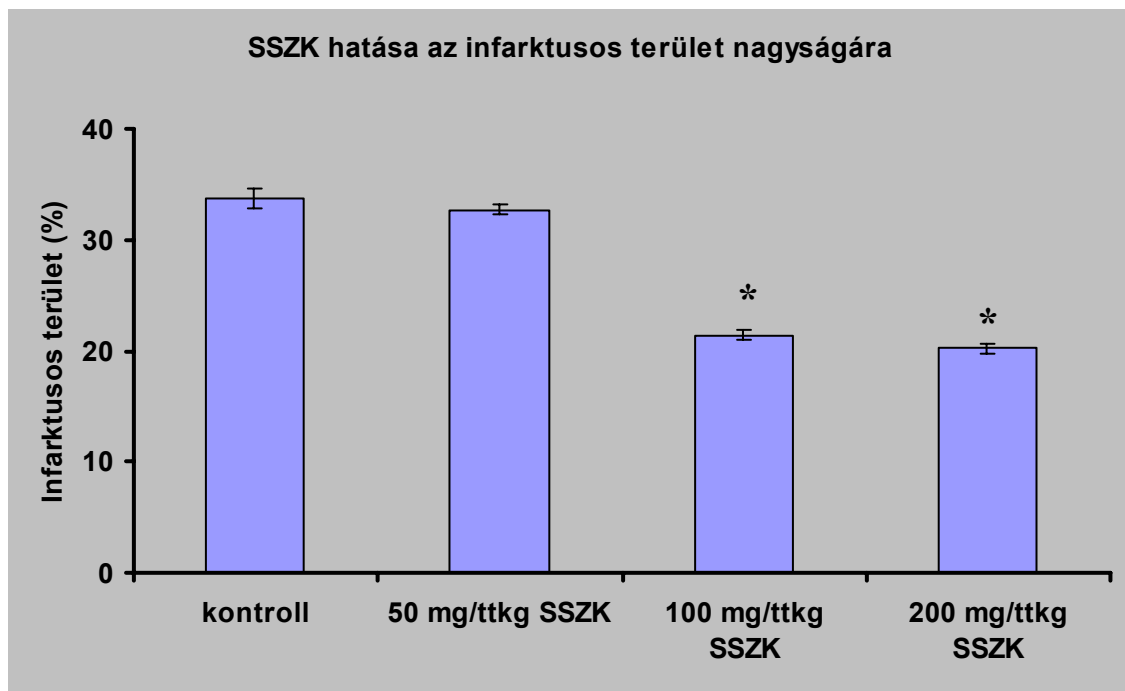
1/e. SSZK hatása a „stroke-volume”-ra:



27. ábra. A SSZK hatása a „stroke-volume”-ra
(* p < 0,05 a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A „stroke-volume” nem más, mint az egy szívizom összehúzódással kipumpált összefolyadék mennyisége. Értékét tehát úgy kapjuk, hogy a kardiális kiáramlás értékét elosztjuk a szívfrekvenciával. A kezeletlen csoport iszkémia előtti $0,24 \pm 0,05$ (ml/ütés) értékről 60 perc elteltével $0,11 \pm 0,01$ -re (ml/ütés) ill. 120 perc elteltével $0,1 \pm 0,01$ -re (ml/ütés) csökkent. Az 50 mg/ttkg SSZK-al etetett állatok szignifikáns javulást nem mutattak ($0,25 \pm 0,05$ ml-ről $0,12 \pm 0,02$ ml-re ill. $0,13 \pm 0,02$ ml-re változtak szívizom összehúzódásonként $p < 0,05$). A 100 mg/ttkg SSZK-al előkezelt állatokon azonban már szignifikáns javulás volt észlelhető, hiszen $0,23 \pm 0,04$ ml-ről $0,16 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) ill. $0,14 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) változtak összehúzódásonként. A 200 mg/ttkg SSZK hasonlóan jótékony hatásúnak bizonyult, hiszen az értékeket szívizom összehúzódásonként $0,25 \pm 0,06$ ml-ről $0,17 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) ill. $0,15 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) javította.

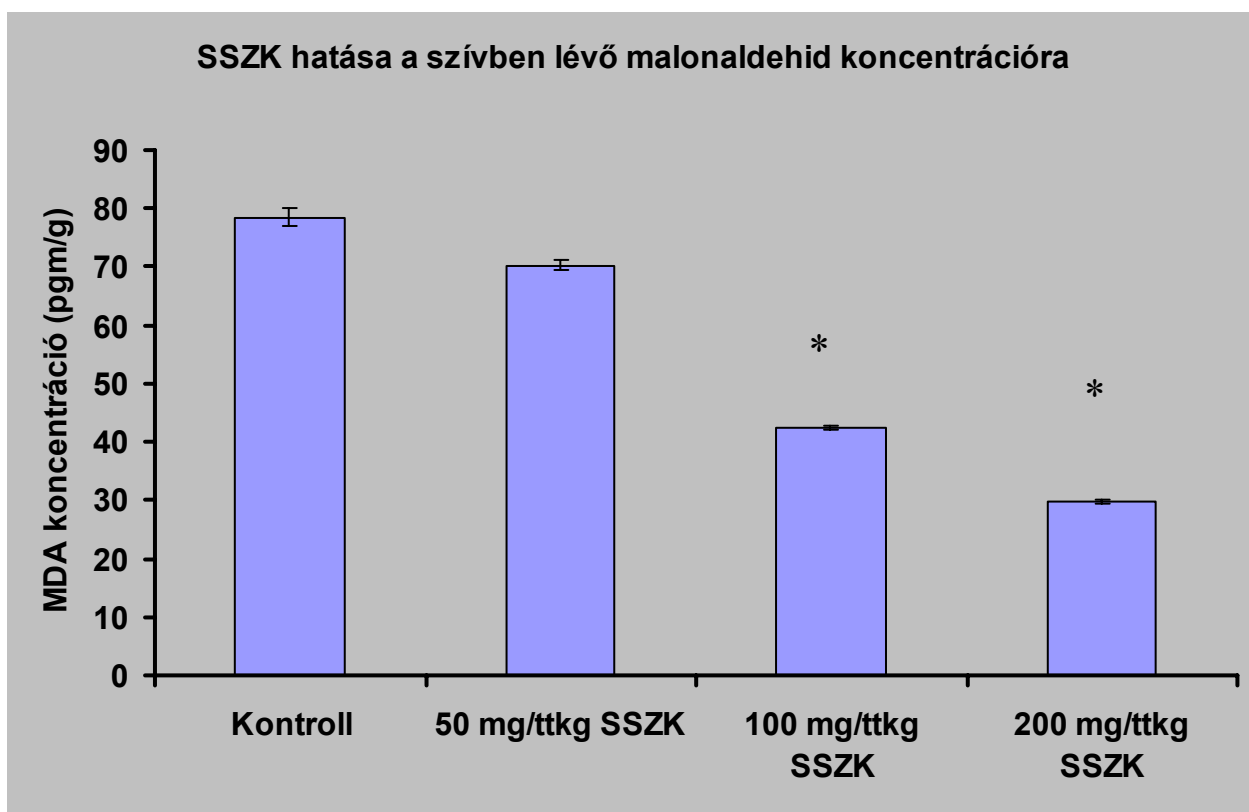
2.) SSZK hatása az infarktusos terület nagyságára:



28. ábra. A SSZK hatása az infarktusos terület nagyságára
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

A kezeletlen kontroll csoport patkányszíveinek infarktusos területének nagysága $33,8 \pm 0,9$ %, ami azt jelenti, hogy a szív harmada elhalt. Az 50 mg/ttkg SSZK előkezelés hatására ez az érték alig csökkent ($32,7 \pm 0,5$ %), tehát a legkisebb dózis alkalmazása nem bizonyult hatékonynak. Ezzel ellentétben a 100 mg/ttkg SSZK alkalmazása már statisztikailag szignifikáns javulásnak tekinthető, hiszen az elhalt terület $21,4 \pm 0,4$ %-ra ($p < 0,05$) redukálódott. A 200 mg/ttkg SSZK bizonyult a leginkább kardioprotektívnek az infarktusos terület nagyságának tekintetében, mert $20,2 \pm 0,5$ %-ra ($p < 0,05$) csökkentette az infarktus kiterjedését. A posztisztkémiás szívfunkciókkal megegyezően itt is a két nagyobb dózis okozott szignifikáns javulást.

3.) SSZK hatása a szívben lévő malonaldehid koncentrációra:

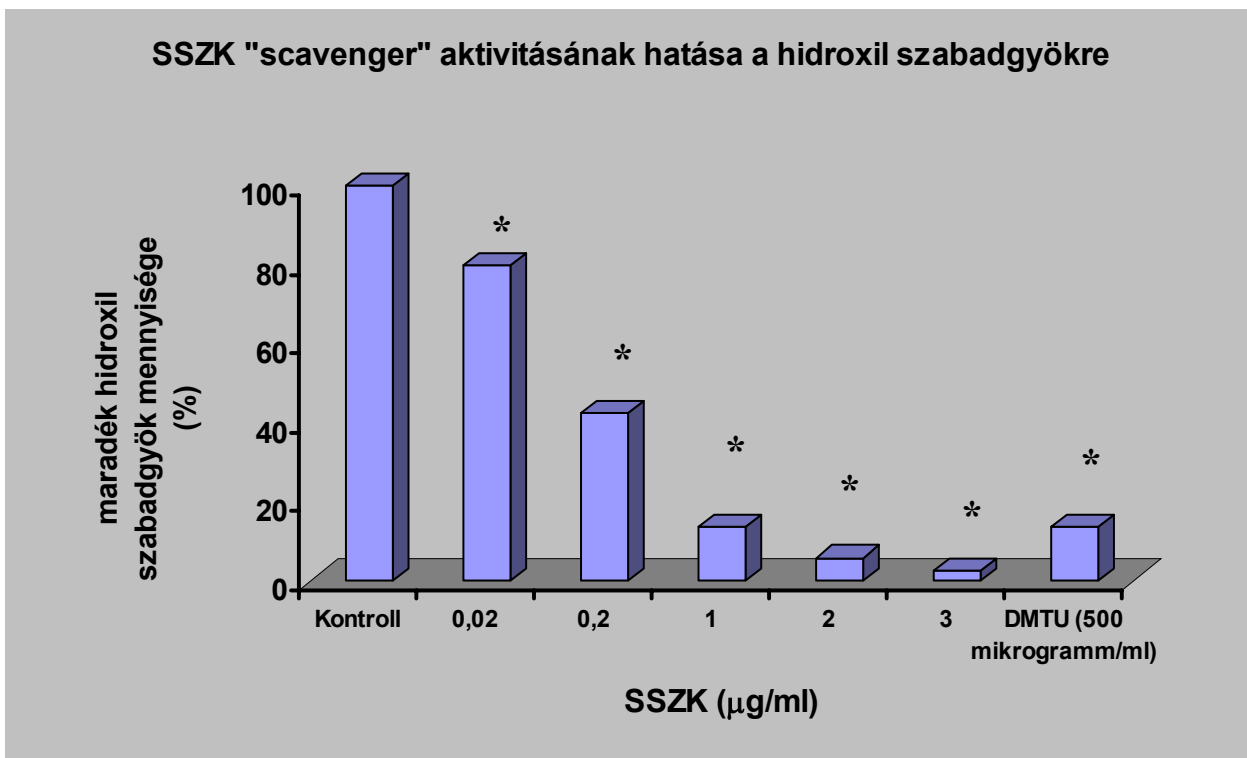


29. ábra. A SSZK hatása a szívben lévő MDA koncentrációra
(* $p < 0,05$ a kontroll csoporthoz viszonyítva)

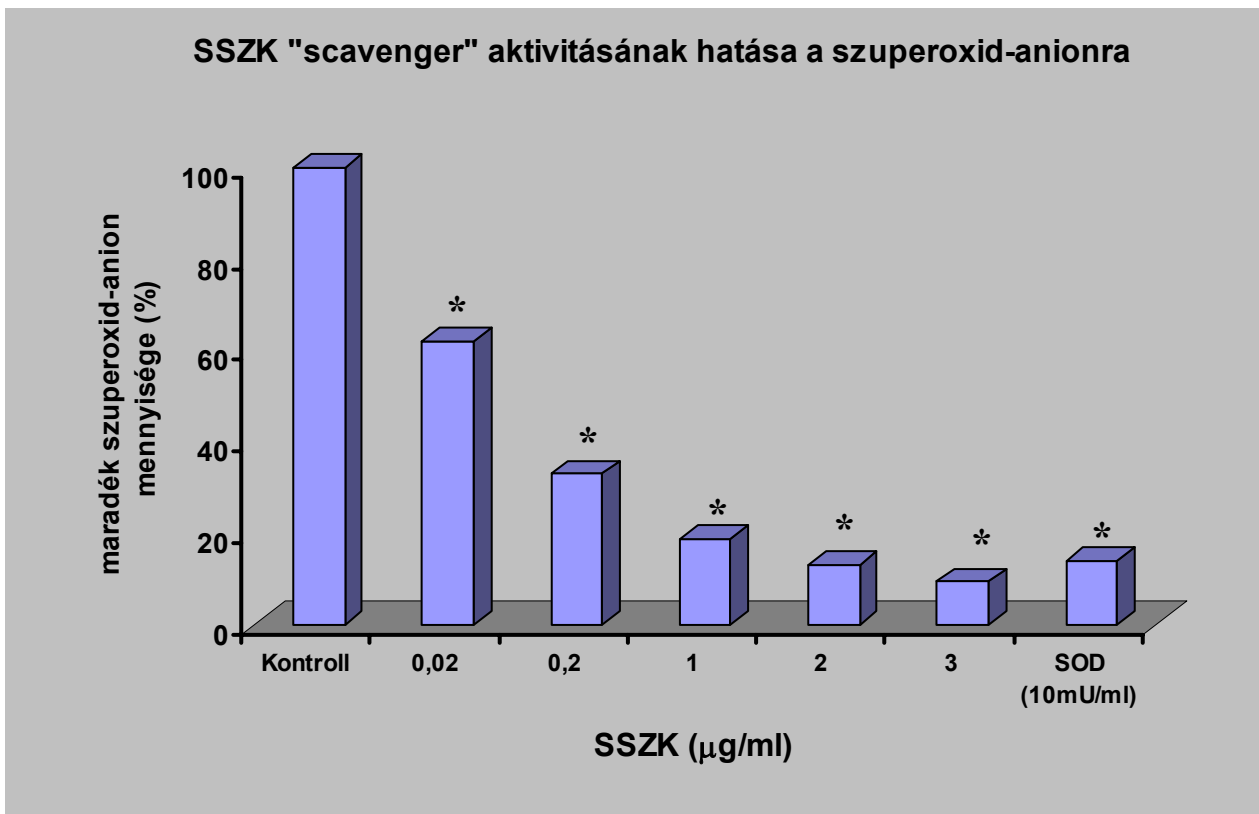
A szívben mérhető MDA koncentráció az egyik legmegbízhatóbb és legreprodukálhatóbb követési módszer az oxidatív stressz mérésére. Minél magasabb a MDA koncentráció, annál nagyobb mértékben van jelen az oxidatív stressz az adott szövetben, ezért az olyan vegyületek, amelyek képesek a MDA szintet csökkenteni a szívben, hozzájárulhatnak az IS/RE során károsodott szívsvövet adaptálódásához.

Az MDA koncentráció a kezeletlen kontroll csoportokban $78,5 \pm 1,6$ pgm/g volt. Az 50 mg/ttkg SSZK kezelés szignifikáns változást nem okozott, mert a MDA koncentráció csupán $70,2 \pm 0,9$ pgm/g-ra változott. A 100 mg/ttkg SSZK kezelés azonban már $42,5 \pm 0,04$ pgm/g-ra ($p < 0,05$) ill. a 200 mg/ttkg SSZK pedig $29,8 \pm 0,4$ pgm/g-ra ($p < 0,05$) csökkentette a MDA koncentrációt a szívben. A nagyobb dózisú SSZK-ok alkalmazásával tehát csökkenthetjük az oxidatív stresszt a miokardiumban.

4.) A SSZK „scavenger” aktivitása a hidroxil szabadgyökkel és a szuperoxid-anionnal szemben:



30. ábra. A SSZK "scavenger" aktivitásának hatása a hidroxil szabadgyökre



31. ábra. A SSZK "scavenger" aktivitásának hatása a szuperoxid-anionra

Az oxidatív stressz meghatározásának másik aspektusa a hidroxil szabadgyök és a szuperoxid-anion mérése, közvetlenül in vitro módon.

A 30-31. ábrákon látható kontroll csoport nem tartalmazott SSZK-t, így ennek megfelelően gyökfogó kapacitása nem lehetséges. A kontroll csoport értelemszerűen nem képes sem a hidroxil, sem a szuperoxid-anion megkötésére, így ebben az esetben a szabadgyökök maradék mennyiségei 100 %-nak tekinthető. A hidroxil szabadgyökök mennyisége 0,02 µg/ml SSZK koncentrációnál már 80 %-ra ($p < 0,05$), 0,2 µg/ml SSZK-nál 42,9 %-ra ($p < 0,05$), 1 µg/ml SSZK-nál 13,6 %-ra ($p < 0,05$), 2 µg/ml SSZK-nál 5,7 %-ra ($p < 0,05$), 3 µg/ml SSZK-nál 2,2 %-ra ($p < 0,05$) csökkent. Összehasonlítás végett az 500 µg/ml DMTU önmagában 13,7 %-ra ($p < 0,05$) csökkentette a hidroxil szabadgyök maradék százalékos mértékét.

A szuperoxid-anion mennyisége 0,02 µg/ml SSZK koncentráció esetén 62 %-ra ($p < 0,05$), 0,2 µg/ml SSZK-nál 33 %-ra ($p < 0,05$), 1 µg/ml SSZK-nál 18,7 %-ra ($p < 0,05$), 2 µg/ml SSZK-nál 13,3 %-ra és 3 µg/ml SSZK-nál 9,4 %-ra csökkent. Összehasonlításként a 10 mU/ml SOD 14,1 %-ra ($p < 0,05$) csökkentette a szuperoxid-anion százalékos mértékét önmagában.

Összefoglalva, a SSZK „scavenger” aktivitását illetően elmondhatjuk, hogy már a legkisebb dózisú kivonat is szignifikánsan csökkentette a szabadgyökök jelenlétét, hozzájárulva így a miokardium védelméhez.

Diszkusszió

a, α -MSH kezelés:

Köztudott, hogy az iszkémia alatt károsodott miokardium a reperfüzió során tovább sérülhet (Tennant és mtsai. 1985). A folyamatban szerepet játszó faktorok behatóbb tanulmányozása, ismerete elősegítheti a témakör klinikai fontosságának felbecsülését, és a megelőzés terápia megközelítésében is hasznosnak bizonyulhat.

Sok tényezőről állították, hogy kritikus szereppel bír az IS/RE indukálta szívizomkárosodás kialakulásában, de ezen tényezők fontossága ma már bizonytalan, sőt néha ellentmondásos. Amennyiben sikerül akár egyetlen patológias faktort vagy szignáltranszdukciós útvonalat befolyásolnunk, és a megfelelő kórélettani utat gátolni tudjuk – pl. farmakológiai beavatkozás hatására – akkor képesek lehetünk javítani a posztisztkémiás szívfunkciókat.

A kísérleteink egyik részében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az α -MSH kezelés kedvezően tudja-e befolyásolni az IS/RE során károsodott miokardiumot. Vizsgálni kívántuk az α -MSH hatását a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére és a reperfüzió indukálta aritmiák kialakulásának csökkentésére. Választ szerettünk volna kapni arra, hogy az α -MSH képes-e gátolni az apoptózist, és ha igen, akkor mekkora dózis szükséges a programozott sejthalál gátlásához. Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy koronária lekötés során képes-e az α -MSH csökkenteni az infarktusz terület nagyságát.

Kísérleteink igazolták, hogy a 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ és a 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH előkezelés a posztisztkémiás periódus alatt szignifikánsan javította a CF, AF, ill. LVDP értékeket összehasonlítva a kezeletlen kontroll állatok értékeivel.

Már korábban leírták, hogy a szívfrekvenciát csökkentő vegyületek (gyógyszerek) képesek megvédeni a miokardiumot az IS/RE káros hatásaitól (Bernier és mtsai. 1989). Fontos megjegyezni, hogy kísérleteinkben az α -MSH protektív hatásához nem kapcsolódik semmilyen változás a szívfrekvenciában. Mivel az α -MSH kezelést az iszkémia kiváltása előtt 12 órával hajtottuk végre, így arra következtethetünk, hogy a protektív hatás jelentős része már a preisztkémiás fázisban bekövetkezik. Ezt a megállapítást támasztja alá az a tény is, hogy a 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ és 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH-val előkezelt állatok preisztkémiás AF és LVDP értékei megnövekedtek a kontroll csoport értékeihez képest. Érdekes ugyanakkor, hogy a CF értékeinél nem tapasztaltunk hasonló változást a preisztkémiás fázisban, bár a reperfüziós fázis

alatt regisztrált értékek az AF és az LVDP értékeihez hasonlóan szignifikáns mértékben javultak a kontroll csoportok értékeihez viszonyítva.

Az α -MSH szívfunkciókra kifejtett kedvező hatásának lehetséges magyarázataként azokra a kísérleti eredményekre utalunk, melyek azt támasztják alá, hogy a melanokortin peptidek gátolni képesek a szívben az iszkémia által kiváltott szövetkárosodás mértékét azáltal, hogy csökkentik a szívizom aritmia készségét (Bazzani és mtsai. 2001). A peptid hatásáért az indukálható NO-szintáz enzim aktivitás csökkenését és a szabadgyökök keletkezésének gátlását teszik felelőssé. Megfigyelések szerint a hatás kifejlődéséért a melanokortin receptorok (MC1-MC5 receptor család) közül az MC3 tehető felelőssé (Guarini és mtsai. 2002., Miori és mtsai. 2003). A munkacsoport vizsgálatai viszont azt igazolták, hogy az MC receptor családtól független lehet a citoprotektív hatás, mivel a peptid egy fragmense (ACTH4-10, amely vegyület nem hat MC receptorokon) is képes kivédeni az iszkémia által kiváltott szövetkárosodást. A gasztrointesztinális traktusban végzett kísérletek alapján (Zou és mtsai. 2003) feltételezzük, hogy a hatásban szerepet játszik a NF- κ B, IL-6 és a neutrofil granulocyták infiltrációjának csökkentése, illetve a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim expressziójának növelése.

A reperfüzió során fellépő aritmiák kialakulását a 200 μ g/ttkg és a 400 μ g/ttkg α -MSH előkezelés redukálta, védve ezzel a szívet a kimerüléstől. Felmerül a kérdés, hogy a reperfüzió során megfigyelt antifibrillációs hatás az α -MSH hatásainak direkt következménye, vagy másodlagosan jelentkezik más mechanizmusokhoz kapcsolatosan. Említést érdemelnek a Vecsernyes és mtsai. (2000) által közölt eredmények, miszerint az α -MSH előkezelés képes megemelni a vér glükokortikoid szintjét. A glükokortikoidok szintjének emelkedése megvédi az IS/RE-n átesett szöveteket feltehetőleg a hősokk fehérje 72 és szabadgyök mechanizmusokon keresztül (Pearl és mtsai. 2002., Valen és mtsai. 2000).

Az apoptózis gyakran bekövetkezik mind akut, mind krónikus szövetkárosodás esetén, melyért különböző szignáltranszdukciós és molekuláris folyamatok felelősek, bár ennek pontos háttere még nem ismert.

Az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a 200 μ g/ttkg és a 400 μ g/ttkg α -MSH előkezelés csökkentette az apoptózis mértékét. Ennek egyik lehetséges okát Jo és mtsai. (2001) kutatták, melyben kimutatták, hogy az α -MSH szignifikánsan csökkenti a Fad és Fas ligand proteinek expresszióját, védve ezzel az IS/RE során károsodott szívet. Hasonló védőhatást írtak le Bazzani és mtsai. (2001) az ACTH egy másik aktív fragmensével kapcsolatban.

Érthető feltételezésünk volt, hogy ha az apoptózis mértéke az előkezelések hatására csökkent, akkor az α -MSH képes lehet limitálni az infarktusos terület nagyságát is, mivel a

nekrotizált sejtek között apoptotikus sejteket is találtak az infarktos területeken (Elsasser és mtsai. 2000., Jonassen és mtsai. 2000., Maulik és mtsai.1998). Bár még nem tisztázott, és nem is képezi jelen tanulmány tárgyát annak eldöntése, hogy milyen mértékben szerepel az apoptózis és a nekrosis külön-külön a miokardiális infarktus kialakulásában, de valószínűleg egy „nekro-apoptotikus” mechanizmus idézi elő a sejtkárosodást. Az α -MSH és a melanokortin peptidok gyulladáscsökkentő hatását több esetben, így artritiszben és iszkémiában is igazolták (Wikberg és mtsai. 1999). Ez a hatás gyakran hozható összefüggésbe gyulladást kiváltó citokinek – mint az interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6 és tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) – csökkent termelődésével, illetve gyulladáscsökkentő citokinek – interleukin-10, interleukin-8 – megnövekedett mennyiségével (Luger és mtsai. 1997).

A kísérletsorozatból egyértelműen kitűnik, hogy a 200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ és a 400 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ α -MSH előkezelés az infarktos terület nagyságát szignifikáns mértékben csökkentette. Az eredményeket elemezve feltűnik, hogy a 200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ és a 400 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ α -MSH előkezelés hatásai nem különböznek egymástól szignifikáns mértékben. Ez felveti annak a valószínűségét, hogy az α -MSH hatása, illetve a hatás kialakulásában legalább részben szerepet játszó MC-receptorcsalád szaturálódik.

b, Prekondicionálás hatása:

A prekondicionálás jelenségét már évtizedek óta ismerjük. A „védelem első ablakaként” Murry és mtsai. (1986) mutatták be először, hogy a szívszövet ATP kimerülését lassítani lehet, ha az iszkémiás periódust egy rövid iszkémia és egy rövid időtartamú reperfüzió előzi meg. Kutyákon végzett kísérleteik alapján azt találták, hogy 5 perc a circumflexa okklúzió majd 5 perc reperfüzió utáni iszkémiás inzultus során szignifikánsan csökkent az infarktos terület nagysága, ahhoz a csoporthoz képest, ahol a rövid iszkémia/reperfüziós prekondicionálás kimaradt. A kutatók ezután azt vizsgálták, hogy a rövid iszkémia/reperfüziós periódusok hasznosak-e abban az esetben is, hogy ha a „hosszú” idejű iszkémiát nem közvetlenül a prekondicionálás után, hanem azt követően 24 órával idézzük elő. Az eredmény biztató volt, hiszen a prekondicionált szívek sokkal jobb paramétereket mutattak a kontroll (nem-prekondicionált) csoporthoz képest, akár 24 óra múlva is. Ezt nevezték a „védelem második vonalának” (Baxter és mtsai. 1994). Számos tanulmányban foglalkoztak a prekondicionálással, hogy kiderítsék annak pontos okát és részletes hatásmechanizmusát. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy inkább összetett mechanizmusok interakciójáról van szó, mintsem egy egyszerű folyamatról, amely egyedül lenne felelős a prekondicionálás jótékony hatásáért.

Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül említjük meg a legfontosabbakat:

Az α -adrenoceptorok stimulációjával utánozhatjuk a prekondicionálás hatását. In vivo nyúlön végzett kísérletben a norepinefrinnel kezelt állatok szíveinek infarktusz területének nagysága szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen kontroll állatokhoz képest. Ezzel összhangban α -adrenerg-blokkoló (prazosim) előzetes adásával a védő hatás elmarad. Az infarktusz terület csökkenése nem csak a norepinefrin adásával váltható ki, hanem olyan molekulákkal is, amelyek a norepinefrin felszabadulását serkenteni képesek, pl.: tiramin (Bankwala és mtsai. 1994).

A protein tirozin kinázok szignáltranszdukciós folyamata szintén kritikus lépést jelent a prekondicionálásban. Az Src tirozin-kináz inhibitorok iszkémia előtti adása csökkent az infarktusz terület nagyságát (Hattori és mtsai. 2001). Az Src és Lck tirozin kinázok aktivációját a prekondicionálás során Ping és mtsai. (1999) is lejegyezték. Ugyanez elmondható a hőszokk fehérje 27 kinázról és a kazein kináz 2-ről is (Kim és mtsai. 1999), s a protein tirozin-kinázok pedig kapcsolatban vannak a NO produkcióval (Tang és mtsai. 2003). A MAPKAPK2 és a p38 MAPK szerepe szintén igazolt a prekondicionálásban (Nakano és mtsai. 2000).

A foszfolipáz D (PLD) stimulációja is jelentős védelmet nyújt a miokardiumnak, melyet nátrium-oleát (aktiválja a PLD-t) előkezeléssel bizonyítottak (Cohen és mtsai. 1996).

Fontos még említést tennünk a delta-opioid receptorok fontosságáról, melynek hatékonyságát naloxon ill. naloxon methiodiddal igazolták. A kísérlet során a kis dóziszú naloxon methiodiddal parciális blokkolást értek el, ami a kardioprotektív hatás elmaradását jelentette. A kis dóziszú naloxon nem befolyásolta a védő hatást, így arra a következtetésre jutottak, hogy a kardioprotektív hatás kifejlődéséért perifériás receptorok a felelősek (Dickson és mtsai. 2001., Schultz és mtsai. 1997).

A $G_{i/o}$ (Hu és mtsai. 1995.), NF- κ B (Morgan és mtsai. 1999., Sasaki és mtsai. 1999), bradikinin (Kositprapa és mtsai. 2001), szabadgyökök (Lebuffé és mtsai. 2003., Oldenburg és mtsai. 2002), prostanoidok (Li és mtsai. 1992., Vegh és mtsai. 1990., Xuan és mtsai. 2003), és az angiotenzin receptorok (Fryer és mtsai. 2002) szerepe szintén igazolt.

Attól függetlenül, hogy a mai napig erős vitát vált ki, ennek ellenére a két legfontosabb mechanizmus nagy valószínűséggel az ATP-szenzitív K^+ csatornák (K_{ATP}) és az adenzin ill. az adenzin-receptorok működése (Auchampach és mtsai. 1992., Gross és mtsai. 2002., Schwartz és mtsai. 2002., Wang és mtsai. 2001). Bár ellentmondó adatok is napvilágot láttak, az adenzin-receptorok szerepét mindenki elfogadta és alátámasztotta. Ennek bizonyítására adenzin-receptor-blokkolókkal (PD 115, 199) kezelték a szíveket, s ebben az esetben a kardioprotektív hatás elmaradt (Bunch és mtsai. 1992., Cave és mtsai.

1993., Thornton és mtsai. 1993). Liu és mtsai. (1992) azt igazolták, hogy ha adenosin A1-receptor agonistával (2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosin) kezelték a szívet, akkor a protektív hatás ugyanúgy kifejlődött, mintha az prekondicionálással jött volna létre. A későbbiekben az adenosin hatásait szoros összefüggésbe hozták a foszfatidilinozitol 3-kinázzal és a tirozin-kinázzal (Krieg és mtsai. 2002., Qin és mtsai. 2003). A fent említett tanulmányok során kiemelt fontosságú, hogy a különböző hatástani mechanizmusok tanulmányozása során a kutatók elsősorban nem beteg, hanem ép, egészséges szívekkel kísérleteztek. Az egészséges szíven megfigyelt jótékony hatások ellenére egy előzőleg károsodott, beteg szív egészen másképp reagálhat a prekondicionálásra, mint az egészséges szívszövet. Éppen ezért tartottuk fontosnak, hogy PC kísérleteinket ne csak egészséges, hanem beteg szíveken is elvégezzük.

Jelen tanulmányunknak nem volt célja a hatásmechanizmusok vizsgálata, célunk annak feltérképezése volt, hogy a PC jótékony hatásai kifejeződnek-e előzőleg sérült (beteg) hiperkoleszterinémias szíven, és ha igen, akkor azok milyen módon befolyásolják a szívfunkciókat (HR, CF, AF és LVDP), az infarktusz terület nagyságát és az aritmiák előfordulási gyakoriságát. A kísérletek alapján láthatjuk, a kutatók az ép szíven vizsgált prekondicionálás hatásmechanizmusának felderítését helyezték előtérbe, háttérbe szorultak viszont olyan faktorok, amelyeknek valóban szüksége lenne a PC jótékony hatására, mint pl.: diabétesz mellitusz, öregedés, ateroszklerózis, hipertrófia, hipertónia, szívelégtelenség. Érdeemes megemlíteni Ghosh és mtsai. (2001) eredményeit, mely szerint a diabéteszes szívekben a prekondicionálás jótékony hatásának hiánya, a mitokondriális K_{ATP}-csatornák diszfunkciója a felelős, ami eltérő szignál-transzdukciós útvonalat eredményez az egészséges szívekhez képest.

Egy másik fontos faktor az öregedés. Az idős emberek szervezetébe bevitt gyógyszerek farmakokinetikája és farmakodinámiája erősen különbözhet a fiatal vagy akár a középkorú betegektől, ami miatt más dózisban kapják gyógyszereiket. Ennek kapcsán teljes joggal merül fel az a kérdés, hogy a PC hatásai hogyan változnak a kor előrehaladtával. Publikációk tucatjai számoltak be a PC és az öregedés kapcsolatáról. Kivétel nélkül, egymás kísérleteit megalapozva írták le tapasztalataikat arról, hogy a PC jótékony hatásai csökkenek vagy teljesen meg is szűnhetnek idősebb betegeknél (Lee és mtsai. 2002., Longobardi és mtsai. 2000., Wu és mtsai. 2001). Ezért is volt fontos, hogy munkánk során az egészséges és az előzőekben „sérült” állatok is egyaránt azonos korúak legyenek. Itt érdemes megjegyeznünk, hogy ha egy akut miokardiális infarktust előtt 48 órával angina pectoris észlelhető, akkor az infarktus lefolyása sokkal stabilabb, kisebb károsodással jár és sokkal kisebb a hirtelen szívhalál bekövetkezésének esélye. Azonban ez a megállapítás elsősorban

fiatal és középkorú betegekre igaz. Az idős embereken sajnos az előzőekben kialakult anginás roham nemhogy javítana, hanem ront a miokardium állapotán (Abete és mtsai. 1997).

A prekondicionálás kardioprotektív hatásának elmaradásáról mások is beszámoltak. Szilvassy és mtsai. (1995) „pacing”-el indukált prekondicionálás során, szintén a kardioprotektív hatás elmaradását tapasztalták ateroszklerotikus nyulakban. Kyriakides és mtsai. (2002) hiperlipidémiás csoportban vizsgálták a ballon ismételt felfújásának hatásait angioplasztika során. Kísérleteik azt mutatják, hogy a miokardiális iszkémia redukciója elmaradt a beteg csoportban, azonban a koleszterol plazma szintjének csökkentésével a kardioprotekció megjelenésére számíthatunk. A fentiek alapján láthatjuk, hogy a hiperlipidémia negatív módon befolyásolja a PC hatásait, bár ennek a pontos okát azonban még nem tudjuk. A mitokondriális és szarkolemma membrán mikroviszkózitásának megváltozása ill. a lipidek akkumulációja és redisztribúciója a miocitákban feltehetően inkább felelőssé tehető, mintsem a szérum magas lipoprotein szintje, mivel a miociták morfológiai változása már tíz napos koleszterindús diéta esetén kimutatható (Hexeberg és mtsai. 1993., Venter és mtsai. 1991). Ezzel összhangban előrehaladott HC esetén a prekondicionált, iszkémia/reperfúzióknak kitett szívszövet nem képes regenerálódni, így egyre jobban romló szívfunkciókat, az infarktus kiterjedését, aritmiákra való nagyobb hajlamot mutatnak.

Ahhoz, hogy egyértelműen eldönthessük azt a kérdést, hogy a prekondicionálásnak kedvező hatása van-e a beteg szíven is, ahhoz összehasonlítást kellett végeznünk a szívfunkciók, az infarktusos terület, az aritmiák előfordulásának gyakorisága (VT, VF) terén, az azonos korú egészséges (nem-hiperkoleszterinémiás) és az előzőleg károsodott szívű nyulak (hiperkoleszterinémiás) között. Eredményeinkből kitűnik, hogy az azonos korú hiperkoleszterinémiás nyulak posztiszkémiás funkciói erőteljesen leromlottak, és az infarktusos terület mérete szignifikánsan megnőtt az előzetes PC hatására, annak ciklusszámától függően. Modellünkben az előrehaladott HC kialakulása után (8 hét), szívelégtelenség kifejlődését figyeltük meg, még a prekondicionálás és az iszkémia/reperfúzió előtt. A nem-hiperkoleszterinémiás állatokban a reperfúzió indukálta VF ill. a VT előfordulása 17 % ill. 33 % volt, ami a hiperkoleszterinémiás állatok esetében 50 % ill. 50 %-ra növekedett. Amennyiben az iszkémia/reperfúzió előtt „négy ciklusú” (4XPC) prekondicionálással befolyásoltuk a szíveket, akkor a nem-hiperkoleszterinémiás csoportban a VF és VT értékei 8 %-ra ill. 17 %-ra csökkentek. Ezzel ellentétben a hiperkoleszterinémiás csoportban a VF és a VT értékei 67 %-ra ill. 67 %-ra növekedtek.

Eredményeink tehát a nem-hiperkoleszterinémiás csoportban megerősítették a prekondicionáló iszkémiás periódusok védő hatását a későbbi hosszabb iszkémia után vizsgált hemodinamikai, elektrofiziológiai és patomorfológiai paramétereken. Ezzel szemben a

hiperkoleszterinémias csoportban a PC szignifikánsan rontotta mind az élettani, mind a patomorfológiai paramétereit, a prekondicionáló periódusok számával (tendenciát tekintve) egyenes arányban. Ez arra utal, hogy hiperkoleszterinemiában a rövid időtartamú iszkémiás periódusok nem „prekondicionáló”, hanem sokkal inkább károsító hatásúak.

Vizsgálataink megerősítették azt a korábbi megfigyelésünket, hogy az iszkémiás prekondicionálás, mint a szív iszkémiás adaptációját fokozó jelenség, az egészséges szívre jellemző. A hiperkoleszterinémias állapotban tapasztalható, nem pontosan ismert mechanizmussal létrejövő válaszképtelenség a rövid időtartamú iszkémiás periódusok prekondicionáló ingerére aláhúzza a diszlipidémia kóroki szerepét a fejlett országokban népbetegségnek számító kardiovaszkuláris megbetegedésekben.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a PC mechanizmusa, beleértve a „védelem első és második ablakát” ill. a különböző aktuális klinikai szituációkat, csupán ép miokardiumon nyert igazolást. A helyzet paradox voltát az képezi, hogy az iszkémiás prekondicionálás kedvező hatására éppen a már előzetesen is károsodott szívizomnak lenne a legnagyobb szüksége elhúzódó hipoxiával járó esemény során. Jelenleg e paradoxon feloldásában látjuk az iszkémiás prekondicionálás legnagyobb kihívását.

A felmerült kérdés megoldásához további kutatások szükségesek melyek mintái két különböző forrásból vehetők: (a) – előzőleg valamely betegségben szenvedő, illetve sérült állatok szívszövetéből, valamint (b) - korábbi vagy jelenlegi betegségen átesett humán miokardiumból illetve az a) és b) pontokban leírt vizsgálati adatokból és megfigyelésekből. Amennyiben a beteg vagy az előzően károsodott szívszövetből származó prekondicionálási eredmények javítják a beteg szívizom felépülését, s mindez a kapott adatok értékelésével megalapozottá válik, akkor kijelenthetjük, hogy a prekondicionálás inkább hasznos, mint káros az előzőleg beteg szívizomban, mely a dilemma megoldódásához vezet.

c, SSZK hatása:

Kísérleteink harmadik fázisának eredményei azt mutatják, hogy a 100 mg/ttkg és a 200 mg/ttkg SSZK-al etetett állatok ellenállóbbak az iszkémia/reperfúzió során létrejött miokardiális károsodásokkal szemben, mint a SSZK-al nem etetett kontroll állatok. A SSZK-al etetett patkányok szívei szignifikáns javulást mutattak a posztiszkémiás funkciók, infarktusos terület tekintetében a kontroll állatokhoz képest. A SSZK-al etetett állatok szívében a malonaldehid koncentráció is kisebb volt, bizonyítva ezzel a SSZK in vivo antioxidáns tulajdonságát. A kontroll állatok 100 g testtömegre vonatkozóan 45 µg glükózt és 45 µg fruktózt kaptak, ezzel egyértelműen kizártuk azt, hogy a jótékony hatásokért a glükóz

és a fruktóz a felelős. Az oxidatív stressz és a szabadgyökök kulcsfontosságú szerepet játszanak a különböző szívbetegségekben mint pl.: a kongesztív szívelégtelenség, kardiomiopátia, hipertrófia, ateroszklerózis és iszkémiás szívbetegség (Das és mtsai. 1994). Normál állapot esetén egy egészséges egyensúly áll fenn a szabadgyökök képződése és az antioxidáns hatású enzimek és „scavenger”-ek között. Ennek az egyensúlyi állapotnak a zavara esetén lecsökken a gyökfogók kapacitása és megnő a szabadgyökök koncentrációja. A reperfüzió során keletkezett szabadgyökökről és azok káros hatásáról számtalan közlemény beszámolt (Arroyo és mtsai 1987., Tósaki és mtsai. 1996), mint azt már a bevezetés fejezetben említettük. A szabadgyökök közül a szuperoxid-anion (O_2^-) a legártalmatlanabb, a hidroxil szabadgyök (OH^\cdot) pedig a legveszélyesebb a sejtekre. A biomolekulák, beleértve a lipideket, a proteineket, és a DNS-t is, potenciális célpontjai a OH^\cdot gyöknek, ebből kifolyólag maradandó károsodás érheti a sejteket és szöveteket. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a SSZK közvetlenül is képes a szabadgyökök közömbösítésére, mely a malonaldehid szint szignifikáns csökkenésében nyilvánult meg a SSZK-al kezelt csoportoknál. Az iszkémia/reperfüzió során felszabaduló szabadgyökök nem képesek kifejteni káros hatásukat, a SSZK antioxidáns tulajdonsága révén, védve így a szívet az aritmiától és egyéb károsodástól.

A vörösborban lévő antioxidánsokról már évek óta kiderült, hogy jótékony hatással bírnak az emberi szervezetre, mind a daganatok kifejlődésének megakadályozásában, mind a kardioprotekció terén. Mivel a vörösbor alapanyaga a szőlő, így elvileg ugyanazon hatóanyagok találhatóak meg mindkettőben csak más arányban és mennyiségben. Éppen ezért tanulmányaink során arra kerestük a választ, hogy a standardizált szőlőkivonatnak megvan-e ugyanazon jótékony hatása mint a vörösbornak. A szőlő a többi zöldséggel és gyümölccsel ellentétben nagy hányadban tartalmaz antioxidáns sajátságú polifenolokat. Az egyik legfontosabb összetevője a resveratrol majdnem kizárólag a szőlőben fordul elő a hazai élelmiszerek közül. A resveratrol a reperfüzió indukálta szövetkárosodások csökkentése mellett nagyon hatékonyan bizonyult a nekrozis és az apoptózis visszaszorításában is (Ray és mtsai. 1999), sőt a daganatok kemopreventív aktivitásában is kulcsfontosságú szerepet játszik, s ebben a témakörben antimutagén anyagként olvashatunk róla (Jang és mtsai. 1997). Képes gátolni a trombocitaaggregációt, ami köztudott, hogy az egyik legnagyobb rizikófaktor az ateroszklerózis kialakulásában (Bertelli és mtsai. 1995). Érdekes jelenség még, hogy a resveratrol antioxidáns tulajdonsága révén PC 12 sejtekben csökkentette az oxidatív stresszt (Chanvitayapongs és mtsai. 1997). A resveratrol jótékony hatásai mellett meg kell még említenünk a szőlőmagkivonatból nyert proanthociánok kardioprotektív hatását, melynek

során csökkent a kamrai aritmiák előfordulása, valamint az apoptotikus kardiomiociták száma is (Sato és mtsai. 2001). A szőlőmagból kivont proanthocyanok gátolni képesek proapoptikus géneket pl.: JNK-1 és c-Jun (Sato és mtsai. 1999).

Összefoglalva az eddigieket elmondhatjuk, hogy a szőlő szintén kardioprotektívnek mutatkozik, hiszen olyan egyedülálló komponensek alkotják, amelyek már külön-külön is protektív hatásúak a különböző betegségek kialakulásának megakadályozásában, illetve a már kialakult károsodások visszaszorításában.

Összegzés

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

Kísérleteink első részében az α -MSH hatását vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ ill. 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH előkezelés szignifikáns javulást okozott a posztisztkémiás szívfunkciókban, az infarktusos terület nagyságának visszaszorításában ill. az apoptózis gátlásában. Az α -MSH alacsonyabb koncentrációja (40 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$) szignifikáns javulást nem okozott a posztisztkémiás károsodások megelőzésében. Az α -MSH jelentősége endogén hatása révén, egy új gyógyszerfejlesztésben nyilvánulhat meg.

Kísérleteink második részében arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a PC jótékony hatásai kifejeződnek-e már előzően beteg (hiperkoleszterinémias) szívekben. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a 3XPC ill. a 4XPC szignifikáns mértékben rontotta a posztisztkémiás szívfunkciókat, az infarktusos terület nagyságának kiterjedését ill. az aritmiák előfordulásának gyakoriságát. HC-ás állatokban elmondhatjuk, hogy a PC jelensége csak az ép (egészséges) szívszövetet képes megvédeni a hosszú idejű iszkémiától. A beteg miokardium tehát nem adaptálódik a PC-hoz.

Kísérleteink harmadik részében a SSZK hatásait vizsgáltuk. A 100 mg/ttkg ill. a 200 mg/ttkg SSZK kedvezően befolyásolta a posztisztkémiás szívfunkciókat, csökkentette az infarktusos terület nagyságát, csökkentette a szívben mérhető MDA koncentrációt. A SSZK „scavanger” aktivitásának bizonyítására in vitro kísérleteinkben a nagyobb dózisok alkalmazása szignifikáns mértékben csökkentette a szuperoxid-anion és a hidroxil szabadgyök képződését ill. maradékmennyiségét. Az 50 mg/ttkg SSZK szignifikáns eltéréseket nem okozott a kontroll csoporthoz képest. A SSZK vizsgálati eredményei egyértelműbb választ adnak a „Francia-paradox” kérdésének megértése ill. ebben az esetben is fennállhat az új gyógyhatású készítmény fejlesztésének a lehetősége.

Summary

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

In the first part of our experiments, we examined the effect of the treatment of α -MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone). The goal of our experiments was to study whether α -MSH treatment could afford cardiac protection against ischemic-reperfusion-induced injury. Our results suggest that α -MSH is able to improve postischemic cardiac function, to reduce myocardial infarct size and the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation and to attenuate apoptotic cell death. The lowest concentration of α -MSH (40 μ g/kg) failed to significantly reduce the cardiac failure. These results are rather exciting, because they could disclose a new therapeutic approach in the treatment of ischemia/reperfusion induced injury.

In the second part of our study, we examined the effects of various cycles of preconditioning (PC) on cardiac function, infarct size, and the incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated hearts obtained from rabbits with hypercholesterolemia. The results of our study show that HC resulted in a low recovery in postischemic cardiac function and increased infarct size in the isolated rabbit heart. PC increased the vulnerability of the myocardium to the reperfusion-induced arrhythmias in hypercholesterolemics indicating that PC may be an “intact heart” phenomenon.

The results of our last experiments demonstrated that the hearts of the rats fed (100 mg/kg and 200 mg/kg) were resistant to myocardial ischemic/reperfusion injury. The SGE-fed rat hearts displayed significant improvement in postischemic left ventricular function and reduced myocardial infarct size with those of control animals fed a mixture of glucose and fructose. The hearts of SGE-fed rats contained reduced amount of malonaldehyde, suggesting that SGE functioned as an *in vitro* anti-oxidant after consumption. Because of the presence of several unique polyphenolic compounds, grapes not only may function as *in vivo* anti-oxidant but also may trigger intracellular signaling cascades that strengthen the anti-oxidant defenses of the heart.

Irodalom

Abete, P., Ferrara, N., Cacciatore, F., Madrid, A., Bianco, S., Calabrese, C., Napoli, C., Scognamiglio, P., Bollella, O., Cioppa, A., Longobardi, G., Rengo, F. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart? *J. Am. Coll. Cardiol.* 30: 947–954, 1997.

Agullo-Ortuno, M.T., Albaladejo, M.D., Parra, S., Rodriguez-Manotas, M., Fenollar, M., Ruiz-Espejo, F., Tebar, J., Martinez, P. Plasmatic homocysteine concentration and its relationship with complications associated to diabetes mellitus. *Clinica-Chimica-Acta.* 326 (1-2):105-112, 2002.

Arroyo, C.M., Kramer, J.H., Dickens, B.F. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS. Lett.* 221:101–4, 1987.

Auchampach, J.A., Grover, G.J., Gross, G.J. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc. Res.* 26: 1054–1062, 1992.

Baer, D.J., Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Campbell, W.S., Brown, E.D., Taylor, P.R. Moderate alcohol consumption lowers risk factors for cardiovascular disease in postmenopausal women fed a controlled diet. *Am. J.Clin. Nutr.* 75(3):593-9, 2002.

Bankwala, Z., Hale, S.L., Kloner, R.A. Alpha-adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation* 90. 1023–1028, 1994.

Baxter, G.F., Marber, M.S., Patel, V.C., Yellon, D.M. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 90. 2993–3000, 1994.

Baxter, G.F., Goma, F.M., Yellon, D.M. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 115: 222–224, 1995.

Bazzani, C., Guarini, S., Botticelli, A.R., Zaffe, D., Tomasi, A., Bini, A., Cainazzo, M.M., Ferrazza, G., Mioni, C., Bertolini, A. Protective effect of melanocortin peptides in rat myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 1082-1087, 2001.

Becker, A., Kostense, P.J., Bos, G., Heine, R.J., Dekker, J.M., Nijpels, G., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D.A. Hyperhomocysteinaemia is associated with coronary events in type 2 diabetes. *Journal-of-Internal-Medicine.* 253 (3): 293-300, 2003.

Bernier, M., Curtis, M.J., Hearse, D.J. Ischemia-induced and reperfusion-induced arrhythmias: importance of heart rate. *Am. J. Physiol.* 256, H21-H31, 1989.

Bertelli, A.A.E., Giovannini, L., Giannessi, D. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 17:1–3, 1995.

Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1897–1918, 2001.

Bolli, R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction (“stunned myocardium”). *Am. J. Coll. Cardiol.* 12, 239-249, 1988.

Bunch, F.T., Thornton, J., Cohen, M.V., Downey, J.M. Adenosine is an endogenous protectant against stunning during repetitive episodes in the heart. *Am. Heart. J.* 124: 1440–1446, 1992.

Catania, A., Delgado, R., Airaghi, L., Cutuli, M., Garofalo, L., Carlin, A., Demitri, M.T., Lipton, J.M. Alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann-N-Y-Acad-Sci.* 885: 183-187, 1999.

Cave, A.C., Collis, C.S., Downey, J.M., Hearse, D.J. Improved functional recovery by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischemic isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* 27: 663–668, 1993.

Chanvitayapongs, S., Draczynska-Lusiak, B., Sun, A.Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport.* 6:1499–1502, 1997.

Chen, W., Glasgow, W., Murphy, E., Steenbergen, C. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am. J. Physiol.* 276: H2094–H2101, 1999.

Cohen, M.V., Liu, Y., Liu, G.S., Wang, P., Weinbrenner, C., Cordis, G.A., Das, D.K., Downey, J.M. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* 94: 1713–1718, 1996.

Corder, R., Douthwaite, J., Lees, D.M., Khan, N.Q., Viseu Dos Santos, A.C., Wood, E.G., Carrier, M.J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 27;414(6866):863-4, 2001.

Curtis, M.J., Pugsley, M.K., Walker, M.J.A. Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* 27, 703-719, 1993.

Das, D.K., Maulik, N. Evaluation of antioxidant effectiveness in ischemia reperfusion tissue injury. *Methods. Enzymol.* 233:601–10, 1994.

De Groot, M.J., Coumans, W.A., Willemsen, P.H., van der Vusse, G.J. Substrate-induced changes in the lipid content of ischemic and reperfused myocardium. Its relation to hemodynamic recovery. *Circ. Res.* 72: 176-86, 1993.

de Lorgeril, M., Salen, P., Paillard, F., Laporte, F., Boucher, F., de Leiris, J. Mediterranean diet and the French paradox: two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 54(3):503-15, 2002.

de Oliveira, E., Silva, E.R., Foster, D., McGee Harper, M., Seidman, C.E., Smith, J.D., Breslow, J.L., Brinton, E.A. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation.* 102 (19):2347-52, 2000.

Dickson, E.W., Blehar, D.J., Carraway, R.E., Heard, S.O., Steinberg, G., Przyklenk, K. Naloxon blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1751–1756, 2001.

Elsasser, A., Suzuki, K., Schaper, J. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32: 711-724, 2000.

Fryer, R.M., Auchampach, J.A., Gross, G.J. Therapeutic receptor targets of ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 55: 520–525, 2002.

Gaziano, J.M., Buring, J.E., Breslow, J.L. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its sub-fractions and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl. J. Med.* 329:1829–34, 1993.

Gensini, G.F., Comeglio, M., Colella, A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *European-Heart-Journal.* 19 (SUPPL. A) A53-A61, 1998.

Ghos, S., Standen, N.B., Galinianes, M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37:711-718, 2001.

Gottlieb, R.A., Bureson, K.O., Kloner, R.A., Babior, B.M., Engler, R.L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 94, 1621-1628, 1994.

Gross, G.J. The role of mitochondrial K(ATP) channels in the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning in dogs. *Br. J. Pharmacol.* 137: 939–940, 2002.

Guarini, S., Schiöth, H.B., Miori, C., Cainazzo, M.M., Ferrazza, G., Guiliani, D., Wikberg, J.E.S., Bertolini, A., Bazzani, C. MC⁺ receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischaemia/reperfusion-induced arrhythmias. *NS- Arch. Pharmacol.* 366, 177-182, 2002.

Gysemergh, A., Lemaire, S., Piot, C., Sportouch, C., Richard, S., Klöner, R.A., Przyklenk, K. Pharmacological manipulation of Ins(1,4,5)P₃ signaling mimics preconditioning in rabbit heart. *Am. J. Physiol.* 277: H2458–H2469, 1999.

Harrold, J.A., Widdowson, P.S., Williams, G. Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4 (MC-4-R), but not melanocortin-3 (MC-3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC-4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes.* 48: 267-271, 1999.

Hattori, R., Otani, H., Uchiyama, T., Imamura, H., Cui, J., Maulik, N., Cordis, G.A., Zhu, L., Das, D.K. Src tyrosine kinase is the trigger but not the mediator of ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.* 281: H1066–H1074, 2001.

Hearse, D.J., Bolli, R. Reperfusion-induced injury: manifestation, mechanisms and clinical relevance. *Cardiovasc. Res.* 26, 101-108, 1992.

Hexeberg, S., Willumsen, N., Rotevatn, S., Hexeberg, E., Berg, R.K. Cholesterol induced lipid accumulation in myocardial cells of rats. *Cardiovasc. Res.* 27: 442–446, 1993.

Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Shima, Y., Ohshima, S., Fujimoto, M., Yamadori, T., Kawase, I., Tanaka, T. Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of interleukin-4 and interleukin-13 production by activated human basophils. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 134(2):135-40, 2004.

Hu, K., Nattel, S. Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. Involvement of alpha 1B-adrenoceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C. *Circulation* 92: 2259–2265, 1995.

Hughes, S., Smith, M.E., Bailey, C.J. POMC-derived peptides in the neuromuscular system of streptozotocin-diabetic mice. *Peptides* 13: 873-877, 1992.

Ichiyama, T., Sakai, T., Catania, A., Barsh, G.S., Furukawa, S., Lipton, J.M. Systemically administered alpha-melanocyte-stimulating peptides inhibit NF-kappaB activation in experimental brain inflammation. *Brain-Res.* 1999.

Ichiyama, T., Sakai, T., Catania, A., Barsh, G.S., Furukawa, S., Lipton, J.M. Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J-Neuroimmunol.* 99: 211-217, 1999.

Iliodromitis, E.K., Kremastinos, D.T., Katritsis, D.G., Papadopoulos, C.C., Hearse, D.J. Multiple cycles of preconditioning cause loss of protection in open-chest rabbits. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 915–920, 1997.

Imagawa, J., Yellon, D.M., Baxter, G.F. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br. J. Pharmacol.* 126: 701–708, 1999.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275:218–20, 1997.

Jo, S.K., Yun, S.Y., Chang, K.H., Cha, D.R., Cho, W.Y., Kim, H.K., Won, N.H. α -MSH decreases apoptosis in ischemic acute renal failure in rats: possible mechanism of this beneficial effect. *Nephrol. Dial. Transplant*. 16, 1583-1591, 2001.

Jonassen, A.K., Brar, B.K., Mjos, O.D., Sack, M.N., Latchman, D.S., Yellon, D.M. Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 32, 757-764, 2000.

Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*. 104, 569-580, 2001.

Kilburn, K.H. Stop inhaling smoke: prevent coronary heart disease. *Arch. Environ. Health. Hypertens. Res*. 26(3):209-17, 2003.

Kim, E.M., Grace, M.K., Welch, C.C., Billington, C.J., Levine, A.S. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *Am-J-Physiol*. 276(5 Pt 2): R1320-1326, 1999.

Kim, S.O., Baines, C.P., Critz, S.D., Pelech, S.L., Katz, S., Downey, J.M., Cohen, M.V. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem. Cell. Biol*. 77: 559–567, 1999.

Kloner, R.A., Speakman, M.T., Przyklenk, K. Ischemic preconditioning: a plea for rationally targeted clinical trials. *Cardiovasc. Res*. 55: 526–533, 2002.

Kolbeck-Ruhmkorff, C., Zimmer, H.G. Proto-oncogene expression in the isolated working rat heart: combination of pressure and volume overload with norepinephrine. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 27, 501-511, 1995.

Kositprapa, C., Ockaili, R.A., Kukreja, R.C. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 33: 1355–1362, 2001.

Krieg, T., Qin, Q., McIntosh, E.C., Cohen, M.V., Downey, J.M. ACh and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 283: H2322–H2330, 2002.

Kurrelmeyer, K.A., Michael, L.H., Baumgarten, G., Taffet, G.E., Peschon, J.J., Sivasubramanian, N., Entman, M.L., Mann, D.L. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 5456-546, 2000.

Kyriakides, Z.S., Psychari, S., Iliodromitis, E.K., Kolettis, T.M., Sbarouni, E., Kremastinos, D.T. Hyperlipidemia prevents the expected reduction of myocardial ischemia on repeated balloon inflations during angioplasty. *Chest*. 121: 1211– 1215, 2002.

Lawson, C.S., Downey, J.M. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc. Res.* 27: 542–550, 1993.

Lebuffé, G., Schumacker, P.T., Shao, Z.H., Anderson, T., Iwase, H., Vanden, Hoek, T.L. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 284: H299–H308, 2003.

Lee, T.M., Su, S.F., Chou, T.F., Lee, Y.T., Tsai, C.H. Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATPsensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 105: 334–340, 2002.

Li, Y., Kloner, R.A. Cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc. Res.* 26: 226–231, 1992.

Liu, Y., Downey, J.M. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am. J. Physiol.* 263: H107– H112, 1992.

Longobardi, G., Abete, P., Ferrara, N., Papa, A., Rosiello, R., Furgi, G., Calabrese, C., Cacciatore, F., Rengo, F. “Warmup” phenomenon in adult and elderly patients with coronary artery disease: further evidence of the loss of “ischemic preconditioning” in the aging heart. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55: M124–M129, 2000.

Luger, T.A., Scholzen, T., Grabbe, S. The role of α -melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2, 87-93, 1997.

Lyson, K., McCann, S.M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits corticotropin-releasing factor release by blocking protein kinase C. *Neuroimmunomodulation.* 1: 153-158, 1994.

Ma, X.L., Kumar, S., Gao, F., Louden, C.S., Lopez, B.L., Christopher, T.A., Wang, C., Lee, J.C., Feuerstein, G.Z., Yue, T.L. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 99, 1685-1691, 1999.

Marber, M.S, Latchman, D.S., Walker, J.M., Yellon, D.M. Cardiac stress protein elevation 24 hours following brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264–1272, 1993.

Mario, D.A., Alessandra, B., Enrica, B. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular. Research.* 63. 593-602, 2004.

Maulik, N., Engelman, R.M., Rousou, J.A., Flack, J.E. 3rd, Deaton D, and Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 100(19 Suppl): II369–II375, 1999.

Maulik, N., Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Das, D.K. Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis. *Am. J. Physiol.* 274, H242-248, 1998.

Miori, C., Guiliani, D., Cainazzo, M.M., Leone, S., Iannone, C., Bazzani, C., Grieco, P., Novellino, E., Tomasi, A., Bertolini, A., Guarini, S. Further evidence that melanocortins prevent myocardial reperfusion injury by activating melanocortin MC3 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 227-234, 2003.

Morgan, E.N., Boyle, E.M., Yun, W., Griscavage-Ennis, J.M., Farr, A.L., Canty, T.G., Pohlman, T.H., Verrier, E.D. An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann. Thorac. Surg.* 68: 377–382, 1999.

Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124–1136, 1986.

Nakano, A., Baines, C.P., Kim, S.O., Pelech, S.L., Downey, J.M., Cohen, M.V., Critz, S.D. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ. Res.* 86: 144–151, 2000.

Neugebauer, S., Tarnow, L., Stehouwer, C., Teerlink, T., Baba, T., Watanabe, T., Parving, H.H. Total plasma homocysteine is associated with hypertension in Type I diabetic patients. *Diabetologia.* 45 (9): 1315-1324, 2002.

Opie, L.H. Role of calcium and other ions in reperfusion injury. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 5, 237-248, 1991.

Oldenburg, O., Qin, Q., Sharma, A.R., Cohen, M.V., Downey, J.M., Jenoit, J.N. Acetylcholine leads to free radical production dependent on K(ATP) channels, G(i) proteins, phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase. *Cardiovasc. Res.* 55: 544–552, 2002.

Pal, S., Naissides, M., Mamo, J. Polyphenolics and fat absorption. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28(2):324-6, 2004..

Panagiotakos, D.B., Chrysohoou, C., Pitsavos, C., Papaioannou, I., Skoumas, J., Stefanadis, C., Toutouzas, P. The association between secondhand smoke and the risk of developing acute coronary syndromes, among non-smokers, under the presence of several cardiovascular risk factors: The CARDIO2000 case-control study. *B.M.C. Public. Health.* 24;2(1):9, 2002.

Pearl, J.M., Nelson, D.P., Schwartz, S.M., Wagner, C.J., Bauer, S.M., Setser, E.A., Duffy, J.Y. Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann. Thorac. Surg.* 74, 830-836. Discussion 836-837, 2002.

Ping, P., Zhang, J., Zheng, Y.T., Li, R.C., Dawn, B., Tang, X.L., Takano, H., Balafanova, Z., Bolli, R. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of

Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ. Res.* 85: 542-550, 1999.

Ray, P.S., Maulik, G., Cordis, G.A. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free. Radic. Biol. Med.* 27: 160–9, 1999.

Renaud, S., de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339:1523–6, 1992.

Rimm, E.B., Giovannucci, E.L., Willett, W.C. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet.* 338:464–86, 1991.

Sasaki, N., Murata, M., Guo, Y., Jo, S.H., Ohler, A., Akao, M., O'Rourke, B., Xiao, R.P., Bolli, R., Marban, E. MCC-134, a single pharmacophore, opens surface ATP-sensitive potassium channels, blocks mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, and suppresses preconditioning. *Circulation* 107: 1183–1188, 2003.

Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and c- Jun. *Free. Radic. Biol. Med.* 31:729, 2001.

Sato, M., Cordis, G.A., Maulik, N., Das, D.K. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.* 279: H901–H907, 2000.

Sato, M., Maulik, G., Ray, P.S. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:1289–97, 1999.

Schultz, J.E., Hsu, A.K., Barbieri, J.T., Li, P.L. Gross, G.J. Pertussis toxin abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in intact rat heart. *Am. J. Physiol.* 275:H495-H500, 1998.

Schultz, J.E., Kwok, W.M., Hsu, A.K., Gross, G.J. Terikalant, an inward-rectifier potassium channel blocker, does not abolish the cardioprotection induced by ischemic preconditioning in rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 1817–1825, 1998.

Schultz, J.J., Hsu, A.K., Gross, G.J. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 1355–1362, 1997.

Schwartz, L.M., Welch, T.S., Crago, M.S. Cardioprotection by multiple preconditioning cycles does not require mitochondrial K(ATP) channels in pigs. *Am. J. Physiol.* 283: H1538–H1544, 2002.

Scuro, L.S., Simioni, P.U., Gabriel, D.L., Saviani, E.E., Modolo, L.V., Tamashiro, W.M., Salgado, I. Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean

flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. *B.M.C. Biochem.* 21;5(1):5, 2004.

Sheridan, D.J., Penkoske, P.A., Sobel, B.E., Corr, P.B. Alpha adrenergic contributions to dysrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* 65, 161-171, 1980.

Sheu, J.R., Hsiao, G., Chou, P.H., Shen, M.Y., Chou, D.S. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J. Agric.Food. Chem.* 14;52(14):4414-8, 2004.

Simkovich, B.Z., Abdishoo, S., Poizat, C., Hale, S.L., Kedes, L.H., Kloner, R.A. Gene activity changes in ischemically preconditioned rabbit heart gene: discovery array study. *Heart Dis.* 4, 63-69, 2002.

Statisztikai adatok Magyarország 1999. évi egészségügyi helyzetéről *Népegészségügy,* 6/2000.

Suzuki, K., Murtuza, B., Sammut, I.A., Latif, N., Jayakumar, J., Smolenski, R.T., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H., Yacoub, M.H. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 106,(12 Suppl 1), I270-I276, 2002.

Szilvassy, Z., Ferdinandy, P., Szilvassy, J., Nagy, I., Karcsu, S., Lonovics, J., Dux, L., Koltai, M. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: 2559–2569, 1995.

Tang, X.L., Kodani, E., Takano, H., Hill, M., Shinmura, K., Vondriska, T.M., Ping, P., Bolli, R. Protein tyrosine kinase signaling is necessary for NO donor-induced late preconditioning against myocardial stunning. *Am. J. Physiol.* 284: H1441–H1448, 2003.

Tennant, R., Wiggers, C.J. The effects of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.* 112, 351-361, 1985.

Thornton, J.D., Thornton, C.S., Downey, J.M. Effect of adenosine receptor blockade: preventing protective preconditioning depends on time of initiation. *Am.J. Physiol.* 265: H504–H508, 1993.

Tosaki, A., Braquet, P. DMPO and reperfusion injury: arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated guinea pig hearts. *Am. Heart J.* 120, 819-830, 1990.

Valen, G., Kawakami, T., Tahepold, P., Dumitrescu, A., Lowbeer, C., Vaage, J. Glucocorticoid pretreatment protects cardiac function and induces cardiac heat shock protein 72. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H836-H843, 2000.

Valen, G., Kawakami, T., Tahepold, P., Starkopf, J., Kairane, C., Dumitrescu, A., Lowbeer, C., Zilmer, M., Vaage, J. Pretreatment with methylprednisolone protects the isolated rat heart against ischaemic and oxidative damage. *Free Rad. Res.* 33, 31-43, 2000.

Van der Vusse, G.J., Van Bilsen, M., Reneman, R.S. Ischemia and reperfusion-induced alterations in membrane phospholipids: an overview. *Ann. NY. Acad. Sci.* 723, 1-14, 1994.

van Golde, P.H., van der Westelaken, M., Bouma, B.N., van de Wiel, A. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life. Sci.* 16;74(9):1159-66, 2004.

Vecsernyes, M., Biro, E., Gardi, J., Julesz, J., Telegdy, G. Involvement of endogenous corticotropin-releasing factor in mediation of neuroendocrine and behavioral effects to alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Endocr. Res.* 26, 347-56, 2000.

Vegh, A., Szekeres, L., Parratt, J.R. Protective effects of preconditioning of the ischemic myocardium involve cyclo-oxygenase products. *Cardiovasc. Res.* 24: 1020–1023, 1990.

Venter, H., Genade, S., Mouton, R., Huisamen, B., Harper, I.S., Lochner, A. Myocardial membrane cholesterol: effects of ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23: 1271–1286, 1991.

Wang, Y., Kudo, M., Xu, M., Ayub, A., Ashraf, M. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 2037–2046, 2001.

Wikberg, J.E.S. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 375, 295-310, 1999.

Woo, K.S., Chook, P., Young, R.P., Sanderson, J.E. New risk factors for coronary heart disease in Asia. *International-Journal-of-Cardiology.* 62 (SUPPL. 1) S39-S42, 1997.

Wu, Z.K., Pehkonen, E., Laurikka, J., Kaukinen, L., Honkonen, E.L., Kaukinen, S., Laippala, P., Tarkka, M.R. The protective effects of preconditioning decline in aged patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 122: 972–978, 2001.

Xuan, Y.T., Guo, Y., Zhu, Y., Han, H., Langenbach, R., Dawn, B., Bolli, R. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 525–537, 2003.

Yamagishi, K., Iso, H., Kitamura, A., Sankai, T., Tanigawa, T., Naito, Y., Sato, S., Imano, H., Ohira, T., Shimamoto, T. Smoking raises the risk of total and ischemic strokes in hypertensive men. *Zhonghua. Liu. Xing. Bing. Xue. Za. Zhi.* 23(4):297-300, 2002.

Yamamoto, F., Braimbridgem, M.V., Hearse, D.J. Calcium and cardioplegia. The optimal calcium content for the St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 87,908-912, 1984.

Yousef, M.I., Kamel, K.I., Esmail, A.M., Baghdadi, H.H. Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food.Chem. Toxicol.* 42(9):1497-503, 2004.

Zou, L., Sato, N., Attuwaybi, B.O., Kone, B.C. Delayed administration of alpha-melanocyte-stimulating hormone or combined therapy with Bay 11-7085 protects against gut ischaemia-reperfusion injury. *Shock* 20, 469-475, 2003.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tósaki Árpádnak és Dr. Vecsernyés Miklósnak témavezetőimnek, támogatásukért, hasznos tanácsaikért, valamint, hogy Ph.D. tanulmányaim alatt végig biztosították számomra a megfelelő tudományos és anyagi háttérrel.

Köszönöm mindenkinek a segítségét, aki hozzájárult értekezésem létrejöttéhez. Külön köszönöm Almási Anettnek, Bak Istvánnak, Dér Péternek és Koszorús Zsuzsának a kísérletek elvégzésében és a dokumentációkban nyújtott segítséget.

Köszönöm Édesanyám segítségét és támogatását, végül, de természetesen nem utolsó sorban, köszönettel tartozom feleségemnek, Zitának, aki mindvégig mellettem állt, biztatott, és aki nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

Közlemények:

1. **Juhász B**, Der P, Turoczi T, Bacskay I, Varga E, Tosaki A. (2004) Preconditioning in Intact and Previously Diseased Myocardium: Laboratory or Clinical Dilemma? *Antioxid. Redox Signal.* 6, 325-333. **IF: 3.037**
2. Vecsernyes M, **Juhász B**, Der P, Kocsan R, Feher P, Bacskay I, Kovacs P, Tosaki A. (2003) The administration of α -melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 177-83. **IF:2.352**
3. Cui J, **Juhász B**, Tosaki A, Maulik N, Das D. (2002) Cardioprotection With Grapes.*J. Cardivasc. Pharmacol.* 5, 762-9. **IF: 1,602**

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

4. Bak I, Szendrei L, Turoczi T, Papp G, Joo F, Das DK, De Leiris J, Der P, **Juhász B**, Varga E, Bacskay I, Balla J, Kovacs P, Tosaki A. (2003) Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J* 17: 2133-2135 **IF: 7,252**
5. Gesztelyi R, Zsuga J, **Juhász B**, Der P, Vecsernyes M, Jozsef Szentmiklosi A. (2004) Concentration estimation via curve fitting: quantification of negative inotropic agents by using a simple mathematical method in guinea pig atria. *Bull. Math. Biol.* 5, 1439-53 **IF: 1,47**

Tartalomjegyzék

Az értekezés során használt rövidítések	2
Bevezetés	3
Az α -MSH szöveti citoprotektív hatása	8
Célkitűzés	10
Módszerek és anyagok	11
Izolált „dolgozó-szív”-preparátum készítése	11
Iszkémia/reperfúzió kiváltása	13
A posztiszkémiás szívfunkciók mérése, és a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció regisztrálása	13
Az α -MSH hatásának vizsgálata a molekulárbiológiai folyamatokra	14
Az infarktusz terület nagyságának vizsgálata	14
A malonaldehid monitorozása	15
A SSZK szabadgyökfogó tulajdonságának mérése	15
Iszkémia/reperfúzió kiváltása prekondicionált szívekben	16
Statisztika	16
Eredmények	17
1). az α -MSH hatása	17
2.) a PC hatása	26
3.) a SSZK hatása	36
Diskusszió	45
Összegzés	54
Summary	55
Irodalom	56
Köszönetnyilvánítás	67
Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke	68
Tartalomjegyzék	69