

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A hemoxigenáz-1 enzimrendszer szerepe a
szívizskémiában**

dr. Czompa Attila

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

A hemoxigenáz-1 enzimrendszer szerepe a szívizskémiában

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

Írta: dr. Czompa Attila gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Leprán István, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2015. október 16. 11 óra.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Csont Tamás Bálint, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Leprán István, az MTA doktora
Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. október 16. 13 óra.

Tartalomjegyzék

A doktori értekezés előzményei és célkitűzései	1
Anyagok és módszerek.....	3
Kísérleti állatok – egerek és patkányok.....	3
Transzgén egér	3
Kezelési protokoll meggy-mag-kivonattal patkányokban.....	4
Kezelési protokoll egerekben	4
Izolált dolgozó szív preparátum	4
Az iszkémia kiváltása.....	4
A patkányszív pumpafunkciójának mérése.....	5
Kamrafibrilláció követése és az egérszív pumpafunkcióinak mérése.....	5
Fehérje izolálás és Western blot.....	5
Infarktusos terület meghatározás.....	6
Immunhisztokémia	7
RT-PCR.....	7
HO-1 aktivitásmérés.....	8
Szöveti CO szint meghatározása	8
Intracelluláris Na ⁺ , K ⁺ és Ca ²⁺ tartalom-mérés	9
Statisztikai elemzés	9
Az értekezés új tudományos eredményei	10
A meggy-magbél-kivonat hatása iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben .	10
A meggy-magbél-kivonat hatása a balkamra funkciókra	10
A meggy-magbél- kivonat hatása az infarktus által érintett terület nagyságára.....	10
A meggy-magbél-kivonat kezelés hatása túlélési útvonalak aktiválására.....	10
HO-1 fehérje expressziójának változása meggy-magbél-kivonat hatására	11
A HO-1 enzim szerepe az I/R károsodások kivédésében transzgén egereken.....	11
Patkány HO-1 expresszió igazolása Tg egerekben	11
A HO-1 expresszió hatása az egér bal kamra-funkciókra	12
Szöveti CO tartalom változása	12
A HO-1 expresszióváltozás hatása a miokardium intracelluláris ionösszetételére	12
A HO-1 expresszióváltozás hatása az infarktus által érintett terület nagyságára és a kamrafibrilláció gyakoriságára.....	13
Megbeszélés	14
Összefoglalás.....	20
Saját közlemények jegyzéke	21
Köszönetnyilvánítás	24

A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A kardiovaszkuláris megbetegedések következtében elszenvedett halálozások napjainkban is vezetik a statisztikákat. Az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek különböző gyógyító és megelőző eljárások kifejlesztésére, így ez az arány az elhalálozásokat illetően javuló tendenciát mutat. A különféle kardiovaszkuláris megbetegedéseknek manapság így is kétszer annyi áldozata van, mint a daganatos megbetegedéseknek.

A nemzetgazdaságilag és a társadalmilag is nyomasztó kardiovaszkuláris megbetegedésekkel kapcsolatos problémákat elsősorban a kórképek megelőzésével, illetve a hajlamosító tényezők korai felismerésével, valamint elhárításával lehet megoldani, vagy mérsékelni. A kórképek megelőzésében rendkívül fontos szerep jut az élő szervezet öngyógyító törekvéseinek elősegítésében meghatározó szerepet játszó preventív kezeléseknek, melyek magukban foglalják a természetes anyagok étrendkiegészítőként vagy funkcionális élelmiszerként való használatát. A kardiovaszkuláris megbetegedések miatt bekövetkező elhalálozások között az egyik legsúlyosabb következménnyel az iszkémiás szívbetegségek (ISZB) járnak. Az ISZB prevenciójának három fontos eleme van, amelyek az életmód változtatás és a rizikótényezők csökkentése; profilaktikus gyógyszerek alkalmazása; és a fiatalabb koszorúérbetegek hozzátartozóinak szűrése és oktatása.

Napjainkban egy új irányvonal rajzolódik ki, miszerint a szintetikus gyógyszerek mellett a növényi hatóanyagok gyógyszerként vagy preventív céllal történő alkalmazása egyre fontosabbá válik. Ennek egyik oka sok esetben a növényi derivátumok olcsóbb előállításának költsége, valamint kedvezőbb mellékhatás profilja. Egyre több tanulmány számol be arról, hogy bizonyos növények vagy természetes hatóanyagok profilaktikus adagolása jelentősen csökkenti az iszkémia/reperfúzió (I/R) következményeit különböző állatmodellekben. Ilyen természetes eredetű anyag többek között a meggybogyó, amely Magyarországon nagy mennyiségben áll rendelkezésre, mint ipari hulladék.

Az oxidatív stressz, amely főként a nagymértékű reaktív oxigén és nitrogén gyökök képződésével jellemezhető biokémiai folyamat, az egyik legfőbb sejtkárosító tényező I/R során. Az oxigén részleges redukciója során képződő anyagok rendkívül instabilak és meglehetősen reaktív vegyületek. Eukarióta sejtekben normál körülmények között a légzés, metabolikus folyamatok, fagocitózis, növekedési faktorok és citokinek hatására is keletkeznek oxidatív sajátosságú anyagok. Az oxidatív specieszek toxikus hatásainak ellensúlyozására a

sejtek enzimatis és nem-enzimatis folyamatokat egyaránt felhasználnak. Az utóbbi folyamatokban szerepet játszhat például a glutation, a C-vitamin, az α -tokoferol, míg az enzimatis antioxidáns folyamatokban nagy szerepet játszik a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a kataláz, a glutation-peroxidáz és a hemoxigenáz is.

A hemoxigenázok (HO) olyan evolúciósan konzervált enzimek, amelyek a hem lebontásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálják. A reakció egyes végtermékei fontos szerephez jutnak az élő szervezet biokémiai folyamataiban, így antioxidáns, antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő, antiproliferatív, vazóaktív, antitrombotikus, valamint angiogenezist segítő hatást közvetítenek, melyekkel elősegítik a szövetek túlélését a különböző károsító tényezőket követően.

Kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta a meggy-mag-kivonat hatását a szív iszkémia/reperfúziós károsodásaival szemben is. Tapasztalataink alapján a meggy-magból dózisfüggő módon csökkenti a kamrafibrillációk kialakulásának a valószínűségét, valamint az infarktusos terület nagyságát és javítja a posztisztkémias szívfunkciókat. Ezek mellett csökkentette a kaszpáz-3 expressziót.

A pontosabb molekuláris mechanizmusok tisztázására azonban még nem került sor, így célkitűzéseink között szerepelt részben annak a vizsgálata, hogy a meggy-magból szilárd frakciója képes-e indukálni a HO-1 szintjét a szívszövetben. Ez a hipotézis azt követően vetődött fel, hogy kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a meggy-magból-kivonat képes volt az I/R okozta retinakárosodásokat csökkenteni patkányok szemében. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a HO-1 rendszer vajon milyen módon érintett a miokardiális infarktus okozta károsodások kivédésében, valamint hogy az esetleges HO-1 overexpresszió hogyan járul hozzá a meggy-magból-kivonat lehetséges kardioprotektív hatásaihoz.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok – egerek és patkányok

Kísérleteink egy részében hím Sprague Dawley típusú patkányokat, valamint hím vad típusú (NTg), HO-1 transzgén (Tg) és HO-1 knock-out ($KO^{-/-}$) egereket is felhasználtunk (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Németország). Minden állat esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Uniós- és a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban. Az állatoknak a standard rágcslótáphoz és vízhez szabad hozzáférésük volt, az egerek testsúlya 25-35 g volt, a patkányoké pedig 220-300 g.

Transzgén egér

A transzgén állatok létrehozása az Araujo és mtsai által leírt módon történt [233]. Röviden: CFY egér megtermékenyített petesejtjébe pronukleáris mikroinjekcióval juttaták be az 52 kb hosszúságú patkány HO-1-et kódoló konstruktot, amely 27 kb 5' upstream régióból, 16 kb 3' downstream régióból és a 8,3 kb HO-1 gént tartalmazó régióból állt. A klónozás a patkány P1 genom könyvtár alapján PCR segítségével történt két olyan primer felhasználásával, amelyek megegyeztek a patkány HO-1 gén első (5'-GCT-TCG-GTGGGT-TAT-CTG-CCG-TTA-T-3' és 5'-CAG-TCT-TAC-AGG-CGG-GGA-ATGTGA-G-3'), és ötödik exonjával (5'-GAG-ACG-CCC-CGAGGA-AAA-TCC-CAG-AT-3' és 5'-CCC-AAG-AAA-AGA-GAG-CCA-GGCAAG-AT-3'). Két pozitív klónt azonosítottak és a restriktációs térképezés szerint mindkét klón tartalmazta ugyanazt az inzertet. Az 52 kb hosszúságú rész megegyezett a HO-1 génnel és a hozzá tartozó szomszédos régiókkal. Ezt követően a natív HO-1 gént a promotérével együtt kivágták, β -agarázzal emésztették, ezt követően pedig mikroinjektálták. Az egerek genotipizálása PCR technikával történt a patkány HO-1 5-ös exonjára specifikus primerek segítségével.

A kísérletek második részében HO-1 knock out (KO) egereket is használtunk. A KO egerek létrehozása irányított HMOX1 génmutációval történt. Az általunk felhasznált KO egereket heterozigóta (+/-) egyedek keresztezésével kaptuk, a HO-1 KO homozigóta (-/-) egereket pedig szintén genotipizálással igazoltuk.

Kezelési protokoll meggy-mag-kivonattal patkányokban

A kísérletek kezdetén a 220-300 g tömegű hím Sprague Dawley patkányokat két csoportba osztottuk. Az első csoport állatait 8 héten keresztül orálisan kezeltük 30 mg/ttkg/nap SCSE szuszpenzióval naponta egyszer, míg a második csoport állatai vivőanyagot kaptak ugyanennyi ideig. A szuszpenzió vivőanyagaként 2 %-os (m/m %) hidroxietil-cellulóz oldatot használtunk.

Kezelési protokoll egerekben

A transzgén állatokat szintén két csoportba osztottuk, melyek közül az egyik csoportot 24 órával az izolált dolgozó szív kísérletek előtt 50 $\mu\text{mol/kg}$ dózisú ón-protoporfirin-IX-el (SnPPIX), a HO-1 specifikus gátlószerével oltottunk intraperitoneálisan.

Izolált dolgozó szív preparátum

Testsúlymérést követően a patkányokat intraperitoneálisan adott ketamin/xylazine (50/10 mg/ttkg) injekcióval, míg az egereket intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitál (60 mg/ttkg) injekcióval altattuk el. Véralvadásgátlóként intravénás vagy intraperitoneális heparint alkalmaztunk 1000 IU/ttkg dózisban. A heparin injekció után torakotómiát végeztünk és a szíveket jéghideg módosított Krebs-Henseleit (KH) pufferbe helyeztük, melynek összetétele 118 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, és 5 mM glükóz volt. Ezt követően az aortán keresztül kanüláltuk a szíveket és 10 percig perfundáltuk 100 vízcentiméteres nyomás mellett módosított KH pufferrel nem dolgozó „Langendorff”-módban, hogy a vaszkulaturából kimossuk a vért. A 10 perc „mosási” periódus alatt a pulmonáris vénát kanüláltuk és a készüléket átkapcsoltuk „dolgozó” módba. A dolgozó módba történő kapcsoláskor elzártuk az aortás beáramlást és a pulmonáris véna felől perfundáltuk a szíveket 17 vízcentiméteres nyomással (előterhelés). A puffert minden esetben előzetesen telítettük és a kísérletek teljes időtartamán át 37 °C-on buborékoltattuk karbogén gázzal (95 % O₂, 5 % CO₂, pH=7,4).

Az iszkémia kiváltása

Az aerob perfúziót követően patkányszívek esetén 30, míg egérszíveknél 20 perc globál iszkémiát váltottunk ki a pulmonáris véna és az aorta felőli kanülok elzárásával. Annak érdekében, hogy a szívmot megvédjük a kiszáradástól az üvegedényt a kísérlet teljes ideje alatt befedtük, így tartva kb. 90-100 %-os páratartalmat. Az iszkémia után a reperfúzió első 10 percét Langendorff perfúzióval indítottuk azért, hogy elkerüljük a fatális kimenetelű kamrai

fibrillációkat. Amennyiben iszkémia után nem tért vissza spontán szinusz ritmus, a szíveket elektromosan defibrilláltuk egy 1 másodperces 15 V-os négyszög impulzus segítségével.

A patkányszív pumpafunkciójának mérése

Kísérleteink során az alapértékeket 10 perc dolgozó módban történt perfúzió végén mértük, majd a reperfúzió 30., 60. és 120. percében is regisztráltuk a szívfunkciós paramétereket. A kísérletek teljes időtartama alatt regisztráltuk az aortanyomást (AOP) egy számítógépes szoftverhez kapcsolt nyomásmérő segítségével (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia). A szívfrekvenciát (HR) és az aortanyomás idő szerinti első deriváltját (AOdP/dt) a folyamatosan rögzített AOP-ből kalkulálta a szoftver. A koronária átáramlást (CF) a koronáriákból kiáramló folyadék egy percig történő összegyűjtésével mértük, míg az aorta kiáramlást (AF) az utóterhelés után mért visszacsepegő puffer egy időegység (1perc) alatt összegyűjtött mennyiségeként adtuk meg. A perctérfogatot (COUT) az AF és a CF összegeként fejeztük ki, míg a verőtérfogat (SV) a COUT és a HR hányadosaként számszerűsítettük. A verőtérfogat változást úgy kaptuk meg, hogy a reperfúzió utáni SV értékét elosztottuk a hozzá tartozó alapértékkel, ezután pedig szoroztuk 100-zal.

Kamrafibrilláció követése és az egérszív pumpafunkcióinak mérése

A kísérletek ideje alatt epikardiális elektrokardiogram (EKG) segítségével figyeltük a kamrafibrillációk megjelenését az egérszíveken. A készülék két ezüstelektrodon keresztül érintkezett a szívszövettel, az elektromos jelet pedig egy adatgyűjtő rendszeren keresztül szoftveresen értékeltük (ADInstruments, Powerlab, Castle Hill, Australia). Kamrafibrilláción átesettnek (VF) értékeltük azon szíveket, amelyek esetében az EKG alapvonalán több mint 2 percig tartó irreguláris hullámszakasz volt látható. Amennyiben iszkémia után VF-et figyeltünk meg és nem tért vissza a spontán szinusz ritmus, a szíveket elektromosan defibrilláltuk egy 1 másodperces 15 V-os négyszög impulzussal. Ahogyan a patkányszívek esetén, iszkémia előtt és a reperfúzió teljes időtartama alatt regisztráltuk az AF-t és a CF-t, továbbá a HR, AOP és AOdP/dt értékeit szoftveresen dolgoztuk fel (ADInstruments).

Fehérje izolálás és Western blot

Az izolált szív kísérleteket követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a bal kamra és szeptum részeket, majd -70 °C-on tároltuk a további analízisek elvégzéséig. A fehérjék izolálásához mintánként 300 mg-ot elektromos diszpergáló eszköz segítségével (T 10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) az alábbi pufferben homogenizáltunk; Tris (25 mM), NaCl

(25 mM), Na-ortovanadát (1 mM), NaF (10 mM), Na-pirofoszfát (10 mM), okadánsav (10 nM), EDTA (0,5 mM), PMSF (1 mM), proteáz inhibitor koktél, desztillált víz. A homogenizáló puffer valamennyi összetevőjét a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől rendeltük. A fehérje izolálást követően azonos tömegű protein mintákat, valamint előfestett protein standardokat (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Németország) frakcionáltunk Tris-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével. A Western blot eljárás során a szétválasztott fehérjéket elektroforetikus transzferáltuk nitrocellulóz membránra (Whatman Protran Nitrocellulóz Membrán; Whatman, Egyesült Királyság) transzfer-készülék segítségével (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories Ltd.). A membránok blokkolása (1,5 óra) frissen készített 5 %-os (m/V %) zsírszegény tejpor szuszpenziójával történt. A primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on, loading kontrollként minden esetben GAPDH antitestet használtunk. A következő napon 3x5 perc mosás után a blotokat 1,5 órán át tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Végül, 3x10 perc mosást követően a membránokat enhanced chemiluminescence reagens (ECL) segítségével kék Röntgen-filmekre exponáltuk (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). A filmeket síkágys szkenner segítségével digitalizáltuk és a képfájlokat ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) szoftverrel elemeztük.

Egér szívek esetében a bal-, jobb kamrai és szeptális részéből vett mintákat β -merkaptotanol, glicerin (5,5 %) és SDS (0,44 %) tartalmú Tris-HCl (13,2 mM/l) oldatban homogenizáltuk. A fehérje izolálást követően azonos mennyiségű protein mintákat és protein standardot választottunk szét 12 %-os Tris-glicin-SDS-poliakrilamid gél elektroforézis segítségével, majd a blotolást Pellacani és munkatársai által leírt módon végeztük el rekombináns patkány HO-1 protein ellenes antitest használatával.

Infarktusos terület meghatározás

A 30 perc teljes iszkémia és a 120 perc reperfüzió után 40 ml 1 %-os trifeniltetrazólium klorid (TTC) oldatot injektáltunk a patkányszívekbe az aortakanül mellékágán keresztül, melyeket ezt követően fagyasztottunk és -70 °C-on tároltunk az analízis elvégzéséig. A mintákat merőlegesen az apiko-bazális tengelyre hozzávetőlegesen 1 mm vastag szeletekre vágunk. A metszést követően azonnal beszkenneztük a szívszeleteket, amelyeket ezután szűrőpapíron szárítottunk, majd súlyukat egyenként lemértük. A szeletek digitális képét szintén ImageJ szoftverrel elemeztük, mely során a szeletek tömegéhez

pixelszámot társítottunk, majd az infarktusz által érintett területeket is kijelölve arányosan kiszámoltuk az infarktuszos szívsvövet tömegét. Összesítve a szeletekből kapott eredményeket, az infarktuszos területet egy szív esetében a teljes szívtömeg és az infarktuszos szívtömeg hányadosaként kaptuk meg. Az egérszívek esetében ugyanezt a módszert alkalmaztuk annyi különbséggel, hogy a szövet méreténél fogva elegendő volt 10 ml 1 %-os TTC oldat használata.

Immunhisztokémia

A reperfüzió végén a patkányszívek apikális részét 4 %-os pufferolt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, majd 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezeken lévő metszeteket ezt követően xyloolban paraffin-mentesítettük, majd leszálló alkohol sorban, végül PBS-ben rehidráltuk. Az antigénekhez való hozzáférhetőséget 0,05 % Tween 20 tartalmú 10 mM-os nátrium-citrát (pH=6,0) pufferben történő feltárással biztosítottuk. A feltáráshoz a metszeteket 25 percig főztük egy erre a célra alkalmazott nagy nyomáson működő edényben. Ezután a szöveti peroxidázokat H₂O₂ tartalmú metanollal hatástalanítottuk, majd a metszeteket 5 % FBS tartalmú TBST oldattal blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Blokkolást és mosást követően a PBST-vel hígított (1/100) elsődleges antitesttel (Covalab, Franciaország) egész éjszakán át inkubáltuk a metszeteket 4 °C-on. A következő napon mosást követően a tormaperoxidázzal konjugált szekunder antitestet 1/300-as hígításban 1 óráig tartottuk a metszeteken szobahőmérsékleten. A reakció láthatóságát DAB oldattal (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle, UK) biztosítottuk, ezután a metszeteket mostuk, majd a fedőlemezeket rögzítő médiummal fixáltuk a tárgylemezre. A fénymikroszkópos képeket Zeiss Axioscope mikroszkóp segítségével készítettük.

RT-PCR

A bal kamrából, szeptumból és jobb kamrából mintánként hozzávetőlegesen 50 mg-ot használtunk RNS izolálásra, amelyet a guanidin izotiocianidsav/fenol módszerrel végeztünk. Az első cDNS átírásához 5 µg RNS-t használtunk (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR- Invitrogen, San Diego, CA, USA). A kapott cDNS-t specifikus patkány HO-1 exon 5 primerek segítségével sokszorozítottuk (CCC-TTC-CTG-TGT-CTT-CCT-TTG és ACA-GCC-GCC-TCT-ACC-GAC-CAC-A). Az RT-PCR végtermékét 1,5 %-os agaróz gélen választottuk szét és ethidium bromiddal festettük.

HO-1 aktivitásmérés

Ötven mg egér szívszövetet homogenizáltunk 10 ml 200 mM-os foszfát pufferben, majd 19000 g-vel 4 °C-on 10 percen keresztül centrifugáltunk. A felülúszót tovább centrifugáltuk 100000 g-vel 4 °C-on 1 órán át, majd az alsó frakciót 2 ml 100 mM koncentrációjú K-foszfát pufferben szuszpendáltuk. A biliverdin reduktázt tisztítottuk, majd ezt követően sor került a HO-1 aktivitásmérésre. A 2 ml végtérfogatú reakcióelegy összetétele 100 µM KH₂PO₄ (pH 7.4), 15 nM hem, 300 µM BSA, 1 mg biliverdin reduktáz és 1 mg mikroszómális frakció minden egyes szívszövetből. A reakcióelegyet 37 °C-os vízfürdőn rázattuk, majd 60 perc sötétben történő inkubáció után a reakciót a minták jégre helyezésével állítottuk le. A HO-1 aktivitást a bilirubin reakcióelegyben való képződésének spektrofotometriás mérése alapján számoltuk ki 464 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbségét alapul véve. A fehérjekoncentrációt Lowry módszer szerint határoztuk meg.

Szöveti CO szint meghatározása

A szöveti szénmonoxid (CO) tartalom mérését egy előzőleg már kipróbált protokoll szerint végeztük gázkromatográfiás (GC) módszerrel. Az egérszív mintákat 0,1 M-os foszfát-pufferben (pH=7,4) homogenizáltuk (Ingenieurburo CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Németország). Ezt követően a szövetszuspenziót 4 °C-on 15 percen keresztül centrifugáltuk 12800 g-vel, majd a felülúszót használtuk a szöveti CO mennyiség mérésére. A reakcióelegy a következőket tartalmazta; 150 µl felülúszó, 60 µl NADPH (4,5 mM) és 50 µl 3.5/0.35 mM-os methemalbumin. A méréshez használt „vak” reakcióelegy NADPH helyett 60 µl foszfát-puffert tartalmazott. A reakcióelegyeket ezt követően 5 percig tartottuk 37 °C –on. A gőztér átöblítését követően folytatódott az inkubáció 37 °C –on 60 percig fénytől elzárt helyen, majd a reakciót leállítottuk a minták jégre helyezésével. Ezután a gőztérből 1000 µl mintát gáztömör fecskendővel (Hamilton Co., Reno, NV, USA) injektáltunk a gázkromatográfba 30 ml/perc áramlási sebességű hidrogén vivőgáz mellett. A készülékben a méréshez 200 cm hosszú 0,3 mm belső átmérőjű, Molselect 5 Å bevonatú kolonnát használtunk, amelyet 30 °C-on termosztáltuk. Az injektor és a detektor hőmérsékletét pedig kontrolláltan 50 °C-on tartottuk.

Intracelluláris Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ tartalom-mérés

A sejtekben jelenlévő kationokat egy korábban már leírt módszer szerint mértük. Ehhez az egérszíveket hirtelen 0-5 °C-ra hűtöttük le és 5 percen keresztül jéghideg, ionmentes 100 mM trishidroxi-metil-amino-metán, valamint 220 mM szukróz pufferrel perfundáltuk, hogy az ionokat eltávolítsuk az extracelluláris térből, hogy az enzimek működését gátoljuk. Öt percig tartó átmosás a hideg oldattal elegendő ahhoz, hogy az ionok 90 %-át kimossuk az extracelluláris térből. A kimosást követően a bal kamrát 48 órán keresztül szárítottuk 100 °C-on, majd 20 óra alatt 550 °C-on elhamvasztottuk. A hamut 5 ml 3 M-os salétromsavban felvettük, majd 10-szeresére hígítottuk ionmentesített vízzel. Ezután a szöveti Na⁺ tartalmat 330,3 nm-en, K⁺-ot 404,4 nm-en és a Ca²⁺-ot 422,7 nm-en mértük levegő-acetilén lángban atomabszorpciós spektrofotométer segítségével (Perkin-Elmer 1100-B, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Ezt a mérési technikát az intracelluláris iontartalom meghatározására korábban leírták a miokardium, és a központi idegrendszer esetén is.

Statisztikai elemzés

Az infarktusos terület, a HR, CF, AF, AOP, AOdp/dt, COUt, SV, intracelluláris Na⁺, K⁺, Ca²⁺ szint és az infarktusos terület értékeinél a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg, majd student t tesztet és variancia analízist végeztünk. A Western blot kiértékelése során szintén a számtani átlagot és a középérték standard hibáját adtuk meg, majd ANOVA tesztet és Tukey-féle poszttesztet végeztünk. A Ntg, HO-1 Tg és HO-1 KO^{-/-} csoportokat ezután többszörös t-teszttel, majd Bonferroni féle posztteszttel elemeztük tovább. Nem parametrikus eloszlás esetén a kamrafiibrilláción átesett, ill. nem-átesett csoportokban az individuális eredmények közötti különbségeket χ^2 teszttel vizsgáltuk meg. A változásokat minden esetben akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai analízishez GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

Az értekezés új tudományos eredményei

A meggymagbél-kivonat hatása iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben

A meggymagbél-kivonat hatása a balkamra funkciókra

A 120 perces reperfúziós fázis végén mért COUT érték a meggymagbél-kivonattal kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, szám szerint $59,9 \pm 3,4$ ml, mint a vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban, ahol ez az érték $44,2 \pm 6,0$ ml volt. Hasonlóan magasabb értékeket regisztráltunk, illetve számoltunk az AF, AOP, AOdP/dt és az SV változás értékeinek esetén is a meggymagbél-kivonattal kezelt csoportban, továbbá az SV is egy kevésbé romló tendenciát mutat a kontroll csoporthoz képest, igaz a különbség nem szignifikáns. A CF és a HR értékeiben szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

A meggymagbél- kivonat hatása az infarktus által érintett terület nagyságára

A meggymagbél-kivonat kardioprotektív hatásainak igazolására TTC módszerrel elemeztük az infarktusos területek arányát. A meggymagbél- kivonattal kezelt állatok szívében az infarktus következtében elhalt szívszövet aránya $11,8 \pm 3,6$ % volt, ami szignifikánsan alacsonyabb érték a vivőanyaggal kezelt kontroll csoportban mért $27,7 \pm 4,1$ %-nál.

A meggymagbél-kivonat kezelés hatása túlélési útvonalak aktiválására

A szívszövetben aktiválódó túlélési útvonalak vizsgálatához az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szintjét, valamint a foszforilált kontra nem foszforilált Akt (p-Akt/Akt) fehérjék arányát vizsgáltuk. Ezekkel a kísérletekkel egy ezt megelőző vizsgálatban feltételezett hatását támasztottuk alá a meggymagbél- kivonatnak, miszerint a kezelés módosíthatja az itt említett és az ezekhez a jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódó folyamatokat. Jelen kísérletben bizonyítást nyert az a tény, hogy a meggymagbél-kivonattal történő kezelés képes a Bcl-2 fehérje expresszióját növelni, így csökkenteni az apoptózist és egyúttal a szívszövet túlélését segíteni I/R-t követően. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására emelkedő tendenciát mutatott a p-(473) Akt/Akt aránya is a kezelt szívszövetekben, bár ez az eltérés nem volt szignifikáns mértékű. Az I/R okozta károsodások miatt bekövetkező sejtelhalás nekrotikus és apoptotikus folyamatok megindulása miatt is létrejöhet. Korábbi kísérletek bizonyítják, hogy

az apoptózis és az infarktusz terület csökkentésében nagyon kedvező tulajdonsággal bírnak a növényi eredetű polifenolok. Vizsgálataink mellett ez a tény is arra enged következtetni, hogy a meggy-magbél-kivonatnak kardioprotektív hatásai vannak.

HO-1 fehérje expressziójának változása meggy-magbél-kivonat hatására

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a meggy-magbél-kivonat hatását a szem iszkémia/reperfúziós károsodásaira is, mely során azt az eredményt kaptuk, hogy a HO-1 fehérje lényeges hatásokkal bír a retina károsodásainak kivédésében. Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a meggy-magbél-kivonattal kezelt patkány szívszövetben jelentősen megemelkedett a HO-1 protein expresszió iszkémiát nem szenvedett és I/R-n átesett miokardiumban egyaránt. Ezzel összhangban immunhisztokémiai módszer segítségével szintén magasabb HO-1 expressziót detektáltunk a kezelt csoportban a vivőanyaggal kezelt kontroll állatokhoz képest.

A HO-1 enzim szerepe az I/R károsodások kivédésében transzgén egereken

Patkány HO-1 expresszió igazolása Tg egerekben

A Tg és NTg bal kamra (LV), jobb kamra (RV) és szeptum (S) mintákból RT-PCR segítségével igazoltuk a patkány HO-1 expressziót mRNA szinten. A Tg egér-mintákból kapott PCR termék patkány HO-1 specifikus volt RT-PCR- és Western blot alapján is. A Tg egér különböző RNS mintáiból a specifikus sávok láthatóak voltak, míg a NTg mintákból ez a sáv hiányzott. Ezt támasztja alá, hogy Western blot alapján a transzgén állatok LV, RV, S mintáiban a patkány HO-1 fehérje láthatóan kifejeződött, míg NTg egerek miokardiumában a patkány hemoxigenáz-1 nem expresszálódott. Hemoxigenáz enzimaktivitást is mértünk a Tg és NTg egerek mindkét kamrai és szeptális mintáiból egyaránt. Az eredmények alapján a HO enzimaktivitás szignifikánsan magasabb volt a transzgén egerek mintáiban a NTg mintákban mért értékeknél, ezzel is bizonyítva azt, hogy a Tg1- és Tg2-gén működőképes volt. Fontos megjegyezni, hogy bár a HO-1 mRNA és fehérje nem volt detektálható a NTg egerek szívszövetében PCR és Western blot segítségével, ennek ellenére HO enzimaktivitás mérhető volt ezen mintákban is. Eszerint a hemoxigenáz aktivitás mérés az összes enzim izoforma aktivitásából tevődik össze, úgymint a HO-1, HO-2, HO-3. Ebből arra lehet következtetni, hogy a NTg és Tg szövetmintákban mérhető HO

enzimaktivitásbeli különbségek tisztán a patkány transzgenikus HO-1 kifejeződésének tulajdonítható az egér miokardiumban.

A HO-1 expresszió hatása az egér bal kamra-funkciókra

Iszkémia kiváltása előtt a NTg és HO-1 Tg csoportokban a HR, AF, CF, AOP és AODP/dt értékeiben nem, míg a reperfüzió alatt a CF, AF, AOP, és AODP/dt esetén is szignifikáns különbség volt mérhető. A szívfrekvencia a reperfüzió alatt sem tért el számottevően a két csoportban. Például a reperfüzió 30. percében mért aortakiáramlás a NTg csoportban $0,9 \pm 0,1$ ml/perc volt, amely a 120. percre $0,8 \pm 0,1$ ml/perc lett. Ehhez képest a Tg csoportban ez az érték szignifikánsan magasabb $2,3 \pm 0,2$ ml/perc ($p < 0,05$) és $2,2 \pm 0,2$ ml/perc ($p < 0,05$). Ugyanez a tendencia volt megfigyelhető a CF, AOP és AODP/dt esetén is. Elmondható továbbá, hogy az $50 \mu\text{mol/kg}$ SnPPIX HO-1 inhibitor hatására a Tg csoportban tapasztalt protektív hatás megszűnt. A HO-1 Tg + SnPPIX csoport és NTg csoport értékei között eközben nem találtunk szignifikáns különbséget.

Szöveti CO tartalom változása

A gázkromatográfiás mérések alapján megfigyelhető, hogy 20 perc iszkémián, majd 120 perc reperfüzió után átesett HO-1 Tg szívekben lényegesen nagyobb volt a CO tartalom a NTg csoporthoz viszonyítva. Mindemellett a SnPPIX-el kezelt HO-1 Tg miokardiumban az endogén CO tartalom relatíve kevés volt.

A HO-1 expresszióváltozás hatása a miokardium intracelluláris ionösszetételére

Az egerek bal kamrájában az intracellulárisan mért Na^+ , K^+ és Ca^{2+} tartalom nem tért el számottevően a NTg, Tg és HO-1 Tg + SnPPIX csoportokban az iszkémiát megelőzően. Azonban a Na^+ és Ca^{2+} tartalom szignifikánsan alacsonyabb volt I/R-t követően a Tg csoportban a NTg és HO-1 Tg+SnPPIX csoportokhoz viszonyítva. Továbbá, a bal kamrai munkaizomzat K^+ tartalma szignifikánsan magasabb ($261 \pm 8 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,05$) volt a HO-1 transzgen csoportban ahhoz a K^+ veszteséhez képest, ami a kontroll csoportban volt tapasztalható ($229 \pm 5 \mu\text{mol/g}$). Az SnPPIX-el kezelt szívekben mérhető intracelluláris ionkoncentráció I/R-t követően a NTg csoport értékeihez hasonlóan változott. Másképpen fogalmazva az SnPPIX teljes mértékben eltüntette azt a protektív hatást az ionösszetétel tekintetében, ami a HO-1 Tg szívszövetben látható.

A HO-1 expresszióváltozás hatása az infarktus által érintett terület nagyságára és a kamrafibrilláció gyakoriságára

Az infarktusos terület a NTg csoport $37 \pm 4\%$ -ához képest szignifikánsan kisebb, $20 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) volt a HO-1 Tg csoportban, míg a HO-1 KO csoportban pedig szignifikánsan magasabb, $47 \pm 5\%$ -nak ($p < 0,05$) adódott. Vizsgáltuk a reperfúzió indukálta összes kamrai fibrillációk %-os előfordulási arányát azon fibrillációk mellett, amelyek legalább 2 percig tartottak. A HO-1 Tg csoportban szignifikánsan kisebb volt ($p < 0,05$) az összes fibrillációs epizódok száma (25 %) és a tényleges kamrafibrilláción átesett (8 %) szívek aránya a NTg csoport hasonló értékeihez képest (92 % és 83 %). A KO csoportban a reperfúzió indukálta totál és tényleges fibrillációk aránya 100 % és 100 % volt, ami a HO-1 arritmogenezisben betöltött szerepét hangsúlyozza.

Megbeszélés

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte milliókat érintenek. Habár az orvostudomány fejlődésével a betegségek patogenezisééről és a lehetséges rizikótényezőkről ismeretanyagunk egyre csak bővül, a halálozási statisztikai adatok az elmúlt évtizedekben csak rendkívül kismértékben mutatnak pozitív irányú változást. Az elmúlt időszakban egy kimondatlan, de jelentős igény merült fel a szintetikus gyógyszerek mellett a természetes eredetű gyógyhatású készítményekkel történő terápiára, illetve ún. funkcionális élelmiszerekkel, vagy étrendkiegészítők révén történő betegség megelőzésre, különös tekintettel a kardiovaszkuláris megbetegedésekre. Kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy a meggy-mag-kivonat kezelés hatására a kísérleti állatok recehártyája ellenállóbb volt az iszkémia/reperfúziós károsodásokkal szemben, s a retinakárosodás jelentősen kisebb mértékű volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az eredmények arra utalnak, hogy ez a protektív hatás részben legalábbis a hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje indukciójának volt köszönhető. Ez a fehérje fontos szerepet tölt be a sejtek stressz válaszában, segíti a sejtek túlélését például oxidatív stressz során a szabadgyökök károsító hatásaival szemben. Az oxidatív stressz egy olyan biokémiai folyamat, amelyben az oxidatív sajátosságú anyagok és az antioxidánsok közötti egyensúly felborul. Ez a folyamat szinte megszámlálhatatlan megbetegedéssel függ össze, melyek között előkelő helyen állnak a szív- és érrendszer megbetegedései. Fiziológias körülmények között a különböző szövetek sejtjei a ROS-ek előállításával és eliminálásával tartják fent a redukív és oxidatív folyamatok közötti kényes egyensúlyt. A ROS-ek alacsony koncentrációban jelátviteli útvonalak modulálásában vesznek részt, viszont, ha a ROS-ek termelődése nagyobb mértékű, mint amivel az antioxidáns arzenál meg tud birkózni, az sejtkárosodással jár, végső soron pedig patológiás elváltozásokhoz vezet. Az oxidatív stresszel szembeni védekezésben az endogén antioxidánsok mellett nagy szerep jut a szervezetbe külső forrásból bejuttatott antioxidánsoknak, amelyek számos biokémiai útvonalon keresztül csökkenthetik többek között az iszkémia/reperfúzió okozta kardiovaszkuláris károsodásokat is. A kardiovaszkuláris betegségek, mint például a hipertenzió, szívelégtelenség és aritmiák ugyanakkor génszinten is szabályozhatóak.

A természetes eredetű antioxidáns molekulák között egyes vitaminokat, polifenol-származékokat, pro- és antocianidineket fedezhetünk fel, melyek kimutatható mennyiségben

fordulnak elő a hazánkban ipari melléktermékként kezelt meggyماغ csonthéját feltárva nyert meggyماغbélben is. Kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta a meggyماغbél-kivonat hatását a szív iszkémia/reperfúziós károsodásaival szemben is. Tapasztalataink alapján a meggyماغbél-kivonat dóziszfüggő módon csökkenti a kamrafibrillációk kialakulásának a valószínűségét, valamint az infarktusz terület nagyságát és javítja a posztisztkémias szívfunkciókat. Ezek mellett csökkentette a kaszpáz-3 expressziót. Kutatócsoportunk nyulakon is végzett korábban vizsgálatokat a meggyماغbél-kivonattal, mely alapján elmondható, hogy a meggyماغbél-kezelés szignifikánsan csökkentette a koleszterindús diétán tartott állatok infarktusz területét I/R-t követően, valamint csökkent plakkképződést, emelkedett HO-1 és citokróm c oxidáz III fehérje expressziót detektáltunk.

A pontosabb molekuláris mechanizmusok tisztázására jelen kísérleteinkben a meggyماغbél szilárd őrleményét felhasználva szuszpenzióval kezeltünk Sprague Dawley patkányokat 8 héten keresztül, míg a kontroll csoport állatai az őrlemény-szuszpenzió elkészítéséhez használt vivőanyagot kapták gyomorszondán keresztül naponta egyszer 30 mg/ttkg dózisban. A kezelést követően a hím Sprague Dawley patkányok mellkasát elaltatást követően feltártuk, szívüket izoláltuk és 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfúziónak vetettük alá. Az izolált dolgozó szív kísérletek alatt a szívfunkciókat, úgymint az aorta kiáramlást, koronária átáramlást, aortanyomást és szívfrekvenciát, folyamatosan monitoroztuk. A vizsgálatokat követően meghatároztuk a perctérfogatot, a verőtérfogatot és annak változását az iszkémia előtti állapotokhoz képest (4. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a meggyماغbéllel kezelt állatok szívein az izolált dolgozó szív készüléken jobb posztisztkémias bal kamrai funkciókat regisztráltunk, mint a kontroll csoportban. Az aorta kiáramlás (AF) és a koronária átáramlás (CF) értékei már az iszkémiát követő első, 30 perces értékeiktől egészen a reperfúzió végéig javuló paramétereket mutattak a meggyماغbél-kivonattal kezelt állatok szívei esetén, mint a kontroll állatoknál. Az AF és CF eredményeit összeadva kiszámoltuk a perctérfogatot (COUT), amely esetében a különbség az előzőekkel korrelált. A COUT és a szívfrekvencia értékeinek ismeretében kifejeztük a verőtérfogatot és annak változását, amely a reperfúzió végén szignifikánsan magasabb értékeket mutatott a meggyماغbél-kivonattal kezelt állatoknál, mint a kontroll csoportban. Az izolált dolgozó szív készülékre jellemző, hogy a szívre nehezedő elő- és utóterhelés konstans a kísérlet folyamán, így a mért paraméterek szinte kizárólag a miokardium kontrakciós erejétől függenek, azaz a kezelt állatok szívében a kontrakciós erő I/R-t követően jobban megtartott, mint a kontroll csoportban. Tehát, a kezelt állatok szívei ellenállóbbak voltak a kontroll állatokéhoz képest, amely azt támasztja alá, hogy az ilyen és ehhez hasonló növényi kivonatoknak komoly szerep

juthat az endotél-funkció megtartásában és a miokardium túlélésében. Ezt az eredményt támasztja alá a kisebb mértékű infarktusz terület, amely csekélyebb számú szívizomsejt elhalására utal a kezelt állatokban. Eredményeink összhangban állnak korábbi vizsgálatainkkal, ahol 3 hetes meggymagbél-kivonat kezelést követően vizsgáltuk az állatok szívét I/R okozta károsodásokkal szemben. Korábbi eredményeink alapján a meggymagbél dózisfüggő módon védi a szívszövetet I/R-indukálta károsodásokkal szemben, részben az apoptózis gátlásán keresztül.

Jelen disszertáció alapját érintő molekuláris biológiai kísérletek során kiderítettük azt, hogy az apoptózis gátlás molekuláris hátterében állhat a Bcl-2 fehérje expressziójának megemelkedése. A Bcl-2 fehérje gátolja a mitokondriumokból a citokróm-c felszabadulását, mely utóbbi egy kaszpázaktivátor, így védve a szívszövetet és segítve a szövet túlélését az I/R okozta károsodások során illetve azt követően. A szakirodalomban több növényi kivonat kardio- és citoprotektív hatásának hátterében azonosították a Bcl-2/Bax útvonal modulálását, így Gu és munkatársai a resveratrol szívhatásait kutatva azt találták, hogy e természetes sejtprotektív polifenol képes gátolni a doxorubicin indukálta apoptózist egerekben. A doxorubicin kezelés mellett adagolt resveratrol megemelte a Bcl-2 expresszióját, valamint csökkentette a Bax szintjét, azonban a HO-1 gátló ZnPPiX a protektív hatást eltörölte, ill. a fehérjék arányát megfordította. Ezen eredményekkel összhangban immunhisztokémiai- és Western blot vizsgálataink során arra derítettünk fényt, hogy a meggymagbél-kivonattal történő előkezelés szignifikánsan megemelte a szívszövetben a HO-1 fehérje és a Bcl-2 intracelluláris mennyiségét.

Egy másik növényi kivonat, a gyulladáscsökkentő genipin is képes a HO-1 expresszió megemelésére, ezzel együtt pedig protektív hatás közlésére, mely hátterében a foszfatidilinozitol-trifoszfát (PI3)-kináz-JNK1/2-Nrf2 kaszkád működése állhat. A PI3-nak fontos szerepe van az oleanolsav indukált HO-1 expresszió növelésének mediálásában is, amely így hozzájárul az oxidatív stresszel szemben fellépő sejtvédő folyamatokhoz patkány VSMC-kben. Ez utóbbi tanulmány az Akt aktivációját és az Nrf-2 nukleáris lokalizációját is kapcsolatba hozta a HO-1 indukációjával. Az Nrf-2 ugyanakkor a *Ginkgo-biloba* levél-kivonatának HO-1 indukáló hatásával is szoros összefüggésben áll, így téve a páfrányfenyő kivonatát potens ateroszklerózist gátló hatásúvá. Ezzel összhangban bár nem szignifikáns mértékben, de szembetűnő változást észleltünk a p-Akt/Akt arányában a meggymagbél-kivonattal kezelt patkányok szívszövetében, amely a kaszpáz-9 gátlásával hozzájárulhat a sejtek túléléséhez. A meggymagbél-kivonat hatásai között tehát nem zárhatjuk ki az Akt fehérje foszforilációt követően megvalósuló aktivációját sem.

A már említett korábbi vizsgálatainkban három hét kezelést követően nem tapasztaltunk semmilyen negatív hatást a meggymagbél-kivonattal kezelt állatokban. Jelen vizsgálatainkban nyolc hét kezelés után sem találtunk kóros elváltozást, vagy mellékhatást; a kezelt állatok napirendjében nem volt eltérés a kontroll állatokhoz képest.

Fontosnak tartjuk megemlíteni azonban azt, hogy elvégeztük a meggymagbél-kivonat hosszú távú (6 hónap) toxikológiai vizsgálatát is, amelyek alapján megállapíthatjuk, hogy a kezelés toxikológiai szempontból nem járt semmilyen külső tüneti elváltozással az állatok esetében (nem publikált eredmények). A szövettani toxikológiai vizsgálat leírta, hogy a máj lebonykés szerkezete megtartott, kötőszövet-, illetve lipidfelhalmozódás nem volt megfigyelhető. A szívizom rostos szerkezete megtartott, rostfragmentáció, kopási pigment, illetve kötőszövet felhalmozódás, vagy lobsejtes infiltráció egyik mintában sem volt látható. Az aorta fala szabályos elrendeződést mutatott, az érfalat infiltráló habos makrofágokat, intra-, vagy extracelluláris lipid lerakódást, ateroszklerotikus léziót, kalcifikációt egyik vizsgált metszeten sem találtunk. Szokványos volt a hasnyálmirigy exokrin és endokrin állománya. A tüdő felépítése szintén szabályos elrendeződést mutatott. A vesékben a kéreg- és a velőállomány jól elkülönült, a glomerulusok szabályos strukturális elrendeződést mutattak, sem intersticiális fibrózist, sem limfocitás beszűrődést, sem beszűkült lumenű ereket nem figyeltünk meg. A lép állományában gyulladásra utaló jelek szintén nem voltak detektálhatóak. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az általunk alkalmazott dózisban meggymagbél-kivonat hosszú távon semmilyen káros szervi elváltozást nem okoz.

Összeségében tehát megállapítható, hogy a meggymag-kivonat az alkalmazott dózisban biztonságos, és a Bcl-2/HO-1 útvonal modulálásán keresztül védi a szívszövetet az I/R-indukálta károsodásokkal szemben.

A HO enzimrendszer, különösen a HO-1 '60-as évekbeli felfedezését követően egy igen intenzíven és töretlenül fejlődő kutatási területet nyitott számos tudományos műhely számára. A HO-1 enzim fontos sejtvédő celluláris fehérje, mely az oxidatív stresszel és a gyulladással szembeni védekezés egyik központi molekulája. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a HO-1 rendszer milyen szerepet játszik a kardioprotektív hatásokban. Korábban több kutatócsoport leírta, hogy a HO-1 mRNS és fehérje szintje lecsökken fibrillált, I/R-n átesett patkány miokardiumban, valamint HO-1 KO egerekben csökkent balkamra funkciót regisztráltak. Úgy tűnik, a HO-1 nemcsak a károsodások elleni védekezésben betöltött központi szerepe miatt fontos az élő szervezetnek, hanem hiánya az étellel összeegyeztethetetlen folyamatok sorozatát indítja el. Humán HO-1 génhiányt először 1999-ben írtak le. A páciens egy kisfiú volt, a szakirodalom később egy kislányról is említést

tesz. Szervezetükben nagymértékű krónikus gyulladás, koagulopátia, nephritis és atheroszklerózis alakult ki, melyek miatt sajnos mindketten nagyon fiatalon elhunytak.

A fentebb leírtak alapján feltételeztük, hogy a HO-1 „overexpresszió” nagymértékben segíthet a működőképes szövetek túlélésében. Ennek modellezésére HO-1 transzgén egereken végeztünk izolált szív és molekuláris biológiai kísérleteket. A Tg egerekben a hozzávetőleg 50 %-al emelkedett az alap HO-1 expressziós szint, a megemelkedett enzimszintet PCR-ral, Western blottal, HO-1 aktivitásméréssel és a szöveti CO tartalom GC-vel történő mérésével is igazoltuk. Érdekes eredmény, hogy a NTg állatok mintáiban komoly endogén CO szint mérhető, amelyet a HO-1 overexpresszió markánsan képes megnövelni, ugyanakkor a SnPPiX-al, a HO-1 egyik gátlószerével való enzimgátlás a CO tartalom csökkenésében is megmutatkozik. A CO, mint hírvivő molekula, szintén hozzájárulhat az apoptózis folyamatának a mérsékléséhez, valamint gyulladásgátló hatással is bír. A CO hatásmechanizmusa továbbá szoros kapcsolatban állhat a cGMP szinttel, valamint a cAMP/cGMP aránnyal. Az alacsony koncentrációban adagolt exogén CO segítheti az I/R-n átesett izolált szív miokardiumának túlélését, amelyhez hozzásegít a cGMP intracelluláris koncentrációjának emelkedése. A magasabb cAMP szint arritmogén hatással bír az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növelése miatt, ez azonban úgy tűnik a cGMP szint emelésével ellensúlyozható, hiszen a cGMP csökkenti a reperfüzió indukálta kamrafibrillációk kialakulását. Ennél fogva e nukleotidok esetén az arány mértékére célszerű nagyobb hangsúlyt fektetni a CO által közvetített protektív folyamatok hátterének kutatása során, mint önállóan egy-egy nukleotid koncentráció meghatározását. A HO-1/CO rendszer továbbá elősegítheti a mitokondriális biogenezist az Akt aktivációjával, a GSK-3 β gátlás csökkentésével, valamint az Nrf-2 expresszió növelésével és nukleáris transzlokációjának serkentésével, aminek következtében megemelkedik a nukleáris légzési faktor-1 (NRF-1) transzkripciója. Manapság, amikor oly sok molekuláris biológiai technika áll a kutatók rendelkezésére, az intracelluláris ionkoncentrációbeli változások követése némileg háttérbe szorult. Azonban nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy az akut károsodásokban az ionegyensúly felborulása fontos szerepet játszik. Így a kísérleti állatok szívében a miokardiális funkció és a HO-1 expresszió mellett tanulmányoztuk az intracelluláris ionkoncentrációkat is. A Tg állatok szívében a K^+ koncentráció szignifikánsan alacsonyabb mértékben csökkent a NTg állatokhoz képest, és a Na^+ és Ca^{2+} terhelés is szignifikáns mértékben kisebb volt. Azonban az arány a NTg állatokéhoz hasonló az SnPPiX-el kezelt állatok szívében, azaz a HO-1 segíthet a normál ionhomeosztázis fenntartásában, amely elengedhetetlen a kardiomiociták túléléséhez valamint az egészséges szív működéséhez.

Szintén nagymértékben hozzájárult a HO-1 overexpresszió az infarktusos terület csökkentéséhez, mivel a Tg szívekben 20 % körüli volt a szívizomelhalás, míg a NTg kontroll csoportban majd 40 %, ezzel szemben a megvizsgált HO-1 KO állatok szívében drámai, 50 % körüli volt az infarktusos terület kiterjedtsége. Kardioprotektív hatásban továbbá komoly szerepet játszik a HO-1 által közvetített antiaritmiás és ateroszklerózist csökkentő hatás is.

Számos kutatás támasztotta alá a növényi kivonatok HO-1 emelő hatásának következtében kialakuló szövetvédő hatást, ezt vizsgálataink is alátámasztották. Eredményeink alapján elmondható, hogy a meggymagbél-kivonat kardioprotektív hatásaiban ez a fehérje fontos szerepet játszik. Jogosan merül fel az igény, miszerint ezt a fontos proteint terápiás célra is felhasználhatnánk, mivel számos betegség patológiai folyamatában érintett. A CO a kilélegzett levegőben mérhető, így koncentrációjának változása számos elváltozás markere lehet. A HO-1 működése során keletkező CO szintjének követése nyomán elképzelhető, hogy az enzimaktivitás is követhető lesz, ami egyes megbetegedések diagnosztizálásában nagy segítséget nyújtana. A kívülről adagolt CO elképzelhető, hogy hatékony lehet bizonyos kórállapotok javítására, hiszen alacsony koncentrációban adagolva a tüdő diffúziós kapacitásának meghatározására használják ezt a mérgező gázt, emellett pedig ígéretes kísérletek zajlanak a szén-monoxid felszabadító molekulákkal is.

Eredményeink alapján jól látszik, hogy a HO-1/CO rendszer modulálása fontos szerepet tölthet be a kardiovaszkuláris megbetegedések patogenezisének befolyásolásában, illetve a manifeszt megbetegedések kezelésében.

Összefoglalás

A kardiovaszkuláris betegségeket a statisztikai adatok halvány javulásának ellenére még mindig a Világ vezető haláloki tényezőiként tartjuk számon. A magyarországi mortalitási mutatószámok sajnos az EU átlaga fölött járnak, ezért a betegségek megelőzésére és a lehető legkorábbi diagnosztizálásra szükséges az erőforrásokat koncentrálni.

A sejt túlélésében segítséget nyújtó antioxidáns hősokk protein, a HO-1 számos megbetegedés mellett a kardiovaszkuláris rendszer betegségeiben is központi szereppel bír. Transzgén egér kísérleteinkben kiderítettük, hogy HO-1 overexpresszió hatására I/R-t követően az állatok jobb balkamra funkcióval bírnak.

Az elmúlt időszakban egy kimondatlanul is jelentős igény merült fel a szintetikus gyógyszerek mellett a természetes eredetű anyagokkal való gyógyításra, illetve a funkcionális élelmiszerekkel, étrendkiegészítőkkel történő betegség megelőzésre, különös tekintettel a kardiovaszkuláris megbetegedésekre. Az általunk kipróbált meggyagból emelte a HO-1 szintjét a szívszövetben, ezáltal pedig kardioprotektív hatást közvetít.

Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/152/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Czompa Attila
Neptun kód: ZJFTHO
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10032869

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

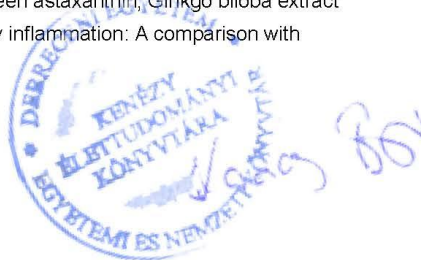
1. **Czompa, A.**, Gyöngyösi, A., Czeglédi, A., Csépanyi, E., Bak, I., Haines, D.D., Tósaki, Á., Lekli, I.:
Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: The role of heme oxygenase-1.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 64 (5), 412-419, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000132>
IF:2.135
2. Juhász, B., Varga, B., **Czompa, A.**, Bak, I., Lekli, I., Gesztelyi, R., Zsuga, J., Kemény-Beke, Á.,
Antal, M., Szendrei, L., Tósaki, Á.: Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1
transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium.
J. Cell. Mol. Med. 15 (9), 1973-1982, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01153.x>
IF:4.125





További Közlemények

3. , Csépanyi, E., **Czompa, A.**, Haines, D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., Tósaki, Á., Bak, I.:
Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model.
Pharmacol. Res. Article In Press, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.021>
IF:4.408 (2014)
4. Csiki, Z., Papp-Bata, Á., **Czompa, A.**, Nagy, A., Bak, I., Lekli, I., Jávor, A., Haines, D.D., Balla, G.,
Tósaki, Á.: Orally Delivered Sour Cherry Seed Extract (SCSE) Affects Cardiovascular and
Hematological Parameters in Humans.
Phytother. Res. 29 (3), 444-449, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5273>
IF:2.66 (2014)
5. Meyer, G., **Czompa, A.**, Reboul, C., Csépanyi, E., Czeglédi, A., Bak, I., Balla, G., Balla, J., Tósaki,
Á., Lekli, I.: The Cellular Autophagy Markers Beclin-1 and LC3B-II are Increased during
Reperfusion in Fibrillated Mouse Hearts.
Curr. Pharm. Des. 19 (39), 6912-6918, 2013.
IF:3.288
6. Bak, I., **Czompa, A.**, Csépanyi, E., Juhász, B., Kalantari, H., Najm, K., Aghel, N., Varga, B.,
Haines, D.D., Tósaki, Á.: Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal
photoprotection by sour cherry kernels.
Phytother. Res. 25 (11), 1714-1720, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3580>
IF:2.086
7. Haines, D.D., Varga, B., Bak, I., Juhász, B., Mahmoud, F.F., Kalantari, H., Gesztelyi, R., Lekli, I.,
Czompa, A., Tósaki, Á.: Summative interaction between astaxanthin, Ginkgo biloba extract
(EGb761) and vitamin C in Suppression of respiratory inflammation: A comparison with
ibuprofen.
Phytother. Res. 25 (1), 128-136, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3160>
IF:2.086





8. Bak, I., **Czompa, A.**, Juhász, B., Lekli, I., Tószaki, Á.: Reduction of reperfusion-induced ventricular fibrillation and infarct size via heme oxygenase-1 overexpression in isolated mouse hearts. *J. Cell. Mol. Med.* 14 (9), 2268-2272, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01142.x>
IF:4.608

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,396

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,26

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

Debrecen, 2015.08.11.



Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban Prof. Dr. Tósaki Árpádnak, hogy a doktori éveket az általa vezetett tudományos műhelyben, a Gyógyszerhatástani Tanszéken úgy tölthettem el, hogy közben Ő minden feltételt biztosított számomra a kísérletek elvégzéséhez és a disszertációm elkészítéséhez.

Köszönöm továbbá Dr. Lekli Istvánnak, hogy a kezdetektől mellettem állt, és szakmai kérdésekben mindvégig segítséget nyújtott. Megtiszteltetés, hogy ez idő alatt munkakapcsolatunk barátsággá fejlődött és mindig számíthattam rá.

Köszönettel tartozom Dr. Bak Istvánnak, hogy sokszor aprónak tűnő, de fontos részletben segítséget nyújtott és tapasztalatait megosztotta velem és dr. Csépanyi Evelinnek, hogy már az egyetemi évek kezdetétől egy hajóban evezve nyújtott nekem sok esetben segítséget. Gyöngyösi Alexandrának köszönöm a kitartását, valamint dr. Szőke Kittinek, Czeglédi Andrásnak, Irinyi-Barta Tündének, Berczi-Kun Enikőnek és Füzesi Tibornak, hogy az utóbbi években velük dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Juhász Bélának és a Gyógyszerhatástani Tanszék további munkatársainak és hallgatóinak, akik közül sokan segítettek kisebb- nagyobb ügyekben, beleértve a volt munkatársakat is.

Végül köszönöm legfontosabb támaszomnak, Mariettának a szeretetét és a sok-sok türelmet, amellyel irántam viseltetik, és köszönöm a Családom minden tagjának az odaadó gondoskodást, támogatást.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg, valamint a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány, OTKA K-104017, PD-11794, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0007, TÁMOP-4.2.6-15/1-2015-0001 támogatásával valósult meg.

