

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Növényi eredetű bioaktív anyagok és a fizikai aktivitás szerepe a cardialis dysfunctio kezelésében

Dr. Szekeres Réka Mária

Témavezető: Prof. Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM
Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**NÖVÉNYI EREDETŰ BIOAKTÍV ANYAGOK ÉS A FIZIKAI AKTIVITÁS
SZEREPE A CARDIALIS DYSFUNCTIONIO KEZELÉSÉBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Szekeres Réka Mária okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola
(Táplálkozástudományi programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Juhász Béla

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pallag Annamária, PhD
Dr. Deák Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
tagok: Prof. Dr. Pallag Annamária, PhD
Dr. Deák Ádám, PhD
Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma Eszter, PhD
Dr. Dér Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. december 9. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	1
2. Anyagok és módszerek	3
2.1. Etikai irányelvek	3
2.2. Kísérleti elrendezés.....	3
2.2.1. Meggykivonat-kezelés hatásának vizsgálata HC nyúl modellen	3
2.2.2. Fizikai aktivitás hatásának vizsgálata idős patkány modellen	4
2.3. Anthocyaninok.....	5
2.4. Echocardiographia	5
2.5. Szérum paraméterek meghatározása	6
2.6. Endothel-függő vasorelaxáció vizsgálata.....	6
2.7. Szövettan	7
2.8. Fehérje izolálás	8
2.9. Western blot	8
2.10. ATPS aktivitás mérés	9
2.11. Statisztikai analízis	9
3. Eredmények	11
3.1. Atherosclerotikus nyúl modell.....	11
3.1.1. Szérum paraméterek	11
3.1.2. Echocardiographia.....	11
3.1.3. Endothel-függő vasorelaxáció	12
3.1.4. Szövetteni festés	12
3.1.5. Western blot.....	13
3.2. „Aging” patkány modell	13
3.2.1. Testsúlyváltozás.....	13
3.2.2. Szérum paraméterek	13
3.2.3. Echocardiographia.....	14
3.2.4. Szövettan	15
3.2.5. Western blot.....	15
3.2.6. ATPS aktivitás	15
4. Megbeszélés.....	17

5. Összegzés	26
6. Az értekezés új megállapításai	27
7. Saját közlemények jegyzéke	28
8. Köszönetnyilvánítás	31

1. Bevezetés és célkitűzések

Az orvostudomány dinamikus fejlődése ellenére még mindig a szív- és érrendszeri megbetegedések a vezető halálokok nemzetközi szinten. Ami ezen kórállapotok etiológiáját illeti, a genetikailag öröklődő, ezáltal nem befolyásolható tényezőkön túl számos olyan secunder rizikófaktort ismerünk, amelyek jelentős mértékben visszaszoríthatók lennének. A mozgásszegény életmód, magasvérnyomás betegség, emelkedett vérzsírszint, cukorbetegség, dohányzás, valamint a túlzott mértékű alkoholfogyasztás az individuuum szintjén mérsékelhető kockázati tényezők. Korai felismerés esetén az életmódváltás, a káros szenvedélyek elhagyása, a rendszeres testmozgás bevezetése elegendőnek bizonyulhat, ám az előrehaladottabb állapotokban gyógyszeres kezelésre is szükség van. Az utóbbi években a cardiovascularis kutatások fókuszába került a természetes eredetű vegyületek, különösen a sötét színű bogyós gyümölcsökben nagy mennyiségben előforduló anthocyaninok hatásmechanizmusának vizsgálata, miután az eredmények rámutattak azok jelentős antioxidáns és gyulladáscsökkentő potenciáljára, mely alapján feltételezhető preventív és terápiás szerepük.

A gyógyszerkutatások fejlesztése nagymértékben hozzájárult a várható élettartam növekedéséhez, amely 2000-ben 66,2 év volt, ám 2024-re 73,3 évre nőtt. A napjainkban tapasztalható demográfiai öregedés hátterében nemcsak a halandóság csökkenése és az életésélyek javulása áll, hanem egyidejűleg a termékenység és ezáltal a születések számának mérséklődése is. Az emberek hosszabb élettartama és a halálozási arányok javulása csak egészségesen megélt időskor esetén tekinthető előrelépésnek. Az „egészséges öregedés” többdimenziós jelenség, amely nem csupán a klinikai betegségek hiányát jelenti, hanem magába foglalja a megmaradt kognitív, affektív és szociális funkciókat is. Számos bizonyíték utal arra, hogy a rendszeres testmozgás idősebb korban a jó egészség megőrzésének legfontosabb életmódbeli tényezői közé tartozik, hiszen kifejezett pozitív hatással van az erőnlétre, rugalmasságra, aerob kapacitásra, járóképességre, egyensúlyérzékre, valamint a mentális és kognitív hanyatlás lassítására.

A cardiovascularis vonatkozások tekintetében mind az egészségtelen életmód, mind az öregedés cardialis dysfunctiohoz, később pedig szívelégtelenséghez vezethetnek. Napjainkban a kutatások során az egyik legnagyobb kihívást az jelenti, hogy olyan természetes eredetű gyógymódokat azonosítsunk, amelyek szignifikáns preventív, illetve terápiás hatással rendelkeznek, így javítva az életminőséget és stabilizálva az egészségi állapotot. A fentiek alapján vizsgálataink során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Nyúl modellen a hypercholesterinaemia talaján kialakuló cardiovascularis eltérések detektálása, majd azok hosszú távú per os anthocyaninokkal való kezelése, valamint az alkalmazott terápia atherosclerosisra, vascularis statusra, illetve szívfunkciós paraméterekre és myocardialis HO-1 és eNOS-PKG-SERCA2a útvonalra kifejtett hatásának értékelése.
2. Idős patkány modellt alkalmazva echocardiographiás módszerrel a rekreációs és a forszírozott testmozgás öregedéssel összefüggő cardialis dysfunctiora gyakorolt hatásának összehasonlítása, valamint molekuláris szinten a mitokondriális fúziót elősegítő PKG–STAT3–Opa1 útvonalbeli fehérjék expressziójának és az ATP-synthase aktivitásának elemzése a különböző mozgásformák esetében.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Etikai irányelvek

Az állatok megérkezését követően 2 hetes adaptációs periódust biztosítottunk számukra. Kísérleteinket az Európai Parlament és a Tanács a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelvvel összhangban hajtottuk végre. A laboratóriumi állatok humánus bánásmódban részesültek, valamint az összes metodika elvégzését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság regisztrálta (4/2022/DEMÁB; 3/2022/DEMÁB) és a Hajdú-Bihar Vármegyei Kormányhivatal Agrárügyi Főosztály Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztálya hagyta jóvá.

2.2. Kísérleti elrendezés

2.2.1. Meggykivonat-kezelés hatásának vizsgálata HC nyúl modellen

A kísérlet kezdetén, 2 hetes adaptációs időszakot követően a 3 éves hím nyulakat (Juráskó Kft, Debrecen, Magyarország) véletlenszerűen két csoportra osztottuk: (1) normál nyúltápon tartott egészséges Kontroll csoport; (2) a hypercholesterinaemiás (HC) csoport állatainál az atherosclerost és a következményes cardialis dysfunctiót a következő módon értük el: időszakosan adtuk az 1% koleszterinnel és 1% trigliceriddel dúsított „atherogen” tápot (Pro Drug Bt, Debrecen, Magyarország) 3 héten át, majd a normál eledelt 1 hétig, ezt nyolcszor ismételve. A beteg állatmodell létrehozása így 32 hetet vett igénybe.

Ezt követően a meglévő 2 csoportot kettéosztottuk, így alakult ki a végleges kísérleti elrendezés, amely 4 kezelési csoportot foglalt magába (n=7/csoport): (1) Kontroll: az ebbe a csoportba tartozó állatok a kísérlet teljes ideje alatt normál tápot kaptak; (2) K+PCE: a normál eledel mellett 9 g/ttkg meggykivonat-kezelésben részesülő nyulak; (3) HC: „atherogen” étrenden tartott kísérleti állatok; (4) HC+PCE: koleszterindús tápot és mellette 9 g/ttkg meggykivonat-kezelést kapó nyulak. A *Prunus cerasus* extraktum (PCE, meggykivonat) kezelés 12 héten át tartott, a következő módon: a kívánt 200 ml csapvízben feloldva, majd az itatóba töltve adtuk az állatoknak az esti órákban. Másnap, miután a teljes mennyiséget megitták, friss vízzel töltöttük fel az itatókat.

A kísérlet végpontjában vért vettünk a nyulak marginális fülvénájából, majd ketamin/xylazin (35/3 mg/ttkg i.m.) anaesthesia alatt echocardiographiás méréseket végeztünk. Ezt követően mély altatásban végzett thoracotomia során az aorta thoracica distalis részét kimetszettük és *ex vivo* vascularis vizsgálatnak vetettük alá. Az aorta thoracica fennmaradó részét 10 %-os formalinba tettük a későbbi szövettani vizsgálatok előkészítésére, illetve a bal

kamra mintákat először folyékony nitrogénben, majd - 80 °C-on tároltuk, Western blot technika kivitelezése céljából.

2.2.2. Fizikai aktivitás hatásának vizsgálata idős patkány modellen

Második kísérletünkben 9 fiatal (12 hetes) és 36 idősödő (18 hónapos) hím Wistar patkányt használtunk fel. Az állatok megérkezését követő 2 hetes akklimatizációs periódus után 4 csoportot hoztunk létre: (1) fiatal kontroll csoport (n = 9); (2) idősödő (18 hónapos) kezeletlen kontroll csoport (n = 12): a kísérlet teljes ideje alatt inaktívak, fizikai aktivitást nem végeznek; (3) rekreációs tevékenységet végző idősödő (18 hónapos) patkányok (n = 12): a ketrecükbe beépített futókereket (Lafayette Instrument Company, North Lafayette, IN, USA) tetszés szerint használhatták a nap 24 órájában, 6 hónapon át; (4) forszírozott testmozgásnak alávetett 18 hónapos patkányok (n = 12): az ebbe a kezelési csoportba tartozó állatokat meghatározott sebességgel, meghatározott ideig futtattuk egy elektronikusan vezérelt készülék, a Walking Wheel System for Rats (Lafayette Instrument Company, North Lafayette, IN, USA) segítségével, 6 hónapon át napi rendszerességgel, a vasárnapi pihenőnap kivételével. A tanulmány kivitelezése során az állatház egyik helyiségében a 12-12 órás világos-sötét ciklust megfordítottuk, ezzel lehetővé téve, hogy az éjszakai életmódot folytató patkányok az erőltetett testmozgást az ébrenléti fázisukban végezzék.

A forszírozott futás protokolljának első lépéseként az állatokat hozzászoktattuk a futókerékhez, ezzel megszürvé az erőltetett testmozgás kivitelezésére alkalmatlan patkányokat és egyben csökkentve az őket ért stresszt. Eleinte 5 percre az álló kerékkel ismerkedtek, majd 5 m/perc sebességgel elindítottuk a rendszert. Minden nap 0,5 m/perccel fokoztuk a sebességet, amíg el nem érjük a szakirodalom által javasolt 13 m/percet. Ezt követően az időt kezdtük el növelni: az volt a cél, hogy minden nap 1 perccel növeljük a futás idejét, amíg el nem értük a 20 perces időtartamot.

A 6 hónapos fizikai aktivitás végén az idős patkányok 2 évesek voltak, míg a fiatal állatok esetében 12 hetes korban történt az exterminálás. A kísérlet végpontjában felületes altatásban (ketamin/xylazin 50/5 mg/ ttkg, i.m.) echocardiographiás méréseket végeztünk. Ezután a kíméletes túlaltatásban végzett thoracotomiát cardialis punctioval történő vérvétel követte. Továbbá, a bal kamra szövetmintáit folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd - 80 °C-on tároltuk a Western blot módszer és az ATP-synthase aktivitás vizsgálata céljából, illetve 10 %-os neutrális formalinoldatban fixáltuk a későbbi szövettani vizsgálatok előkészítésére. Az összes, kísérletben résztvevő állat testsúlyát hetente regisztráltuk.

2.3. Anthocyaninok

A PCE előállítását a Debreceni Egyetem Élelmiszertechnológiai Intézetében történt. Az Érdi bőtermő magyar meggyfajtából készült, amelyet 2020 júniusa és júliusa között szüreteltek. A PCE fő anthocyanin-komponensei a cianidin-3-O-rutinozid, a cianidin-3-O-glükózid és a cianidin-3-O-glükózil-rutinozid voltak, emellett néhány fenolos vegyület elhanyagolható mennyiségben volt jelen.

2.4. Echocardiographia

Transthoracalis szívultrahang vizsgálatot mindkét kísérleti modell esetében végeztünk. Az állatokat előzetesen elbódítottuk i.m. ketamin/xylazin kombináció segítségével (nyúl: 35/3 mg/ttkg; patkány: 50/5 mg/ttkg), a mellkasukat borító szőrt leborotváltuk, majd háton, illetve csúcsi felvételek készítése esetén bal oldalt fekvő helyzetbe pozicionáltuk őket. A mérésekhez GE Vivid E9 (GE Healthcare, New York, NY, USA) készüléket használtunk. A felvételek készítése során a humán vizsgálatoknál alkalmazott protokollt követtük, az American Society of Echocardiography ajánlásának megfelelően. Először parasternalis hossz tengelyi metszetben (PLAX) 2D és M-módot alkalmazva az aortagyök és a bal pitvar anteroposterior átmérőjét, majd a papilláris izmok magasságában a bal kamra következő paramétereit állapítottuk meg: ejekciós frakció, frakcionált rövidülés, bal kamra belső átmérője systoleban és diastoleban, interventricularis septum és a bal kamra posterior falának vastagsága systoleban és diastoleban. A pontosabb eredmények érdekében ugyanezeket rövidtengelyi nézetből (SAX) is megmértük. Ezt követően csúcsi 4 üregű metszetből a mitrális beáramlási görbét, illetve annak korai (E) és késői, pitvari (A) komponenseit azonosítottuk pulzatis (pulsed wave, PW) Doppler segítségével. Szintén ebből a nézetből, szöveti Doppler (TDI) technikával a septális és laterális mitrális anulus mozgási sebességeit mértük meg: bal kamrai systoles csúcssebesség (s'), korai (e') és késői (a') diastoles csúcssebességek. M-módot alkalmazva meghatároztuk a mitrális és tricuspidális anulusok síkirányú systoles kitérését (MAPSE, TAPSE). Csúcsi 5 üregű nézetből Doppler technikával megmértük a bal kamrai kiáramlási traktus (LVOT) sebesség-, illetve nyomásgrádienseit.

Az echocardiographiás felvételeket külső merevlemezen táruztuk és egy későbbi időpontban elemeztük ki EchoPAC PC szoftver (ver. 112, GE Healthcare, New York, NY, USA) segítségével. Egy állatban minden paraméter esetében 5 egymás utáni szív ciklus során mért eredményeket átlagoltunk. Utólagos elemzés során egyéb paramétereket is származtattunk: a mitrális beáramlási görbe felhasználásával az E/A arányt és a decelerációs

időt (DecT), a TDI felvételekről az e'/a' arányt, az ejekciós időt, a mitrális billentyű záródásától a nyitódásig eltelt időt, valamint az izovolumetriás kontrakciós időt (IVCT) és az izovolumetriás relaxációs időt (IVRT). Továbbá, a bal kamrai töltőnyomás becslésére alkalmas E/e' arányt és a globális myocardialis teljesítményt meghatározó Tei-indexet is számoltunk. Első kísérletünk esetében apicalis nézetből globális longitudinális strain-t (GLS) határoztunk meg STE segítségével.

2.5. Szérum paraméterek meghatározása

Mindkét kísérleti protokoll végén, illetve a nyúl modell esetében a 12 hetes kezelést megelőzően vért vettünk az állatoktól BD Vacutainer SST II Advance csövekbe (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A nyulak esetében a marginális fülvénából, míg a patkánykísérlet során - a thoracotomiát követően - a szív bal kamrájából származó mintákat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézete vizsgálta, ahol az alábbi paraméterek kerültek meghatározásra: összkoleszterin, alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL), magas sűrűségű lipoprotein (HDL), triglicerid, aszpartát-aminotranszferáz (AST), alanin-aminotranszferáz (ALT), C-reaktív protein (CRP), glükóz, urea, kreatinin. A nyúl modell esetében az N-terminális pro-B natriuretikus peptid (NT-proBNP) és a kreatin-kináz-MB (CK-MB) szinteket is mérték. A szérum paraméterek meghatározása automata analizátorok segítségével történt (F. Hoffmann-La Roche AG, Bazel, Svájc).

2.6. Endothel-függő vasorelaxáció vizsgálata

A hypercholesterinaemiás nyulak esetében a thoracotomiát követően az aorta thoracica distalis részét kimetszettük és oxigenizált Krebs-oldatba helyeztük. Ezt követően az adventitiát eltávolítottuk és 2 mm széles gyűrűket (minden állatból négyet) preparáltunk. A preparátumokat vízszintesen, 10 mN nyugalmi feszüléssel vertikális szervkádakban (Experimetria TSZ-04, Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) rögzítettük, amelyek 10 ml, 95% O₂ és 5% CO₂ eleggyel átszellőztetett Krebs-oldatot (36°C; pH=7,4) tartalmaztak. Az érgyűrűk simaizomrétegének izometrikus kontraktilis erejét transzducer (SD-01; Experimetria Kft, Budapest, Magyarország), valamint SPEL Advanced IsoSys szoftver (SOFT 02, 2.9-es verzió; MDE Kft., Budapest, Magyarország) segítségével regisztráltuk.

60 perces inkubációs periódust követően noradrenalin koncentráció-hatás (E/c) görbét vettünk fel (1 nmol/l-től 10 μmol/l-ig), majd meghatároztuk a félhatásos koncentrációkat

(EC₅₀) minden érgyűrű esetében. Ezt egy 60 perces mosási periódus követte, amely után a kiszámolt EC₅₀ értéknek megfelelő koncentrációjú noradrenalin segítségével pre-kontrahált állapotba hoztuk az ereket. Protokoll szerint megvártuk, amíg a kontrakciós erők stabilizálódnak, majd acetyl-kolin hozzáadásával (1 nmol/l-től 1 mmol/l-ig) újabb E/c görbét vettünk fel.

Az ugyanabból az állatból származó aortagyűrűk válaszait átlagoltuk. A noradrenalin hatását a vascularis feszültség maximális növekedéseként határoztuk meg a korábban beállított 10 mN nyugalmi szinthez képest. Az acetyl-kolin hatását viszont a (noradrenalinnal előidézett) pre-kontrakció által kiváltott érrendszeri feszültség százalékos csökkenéseként határoztuk meg. (Amennyiben összehúzódás következett be, annak maximumát vettük figyelembe, negatív relaxációként.)

2.7. Szövettan

A szövetekben bekövetkező elváltozások detektálásához különböző szövettani festéseket alkalmaztunk. Az eltávolított szövetrészeket 10%-os formalinban (pH=7,4) fixáltuk 24 órán át. Ezt követően a mintákat folyó csapvíz alatt mostuk 1 óráig, majd 70%-os etanolban tároltuk a további lépésekig. Feldolgozáskor a mintákat felszálló alkoholsor segítségével dehidráltuk, majd az alkohol eltávolítására xilolt alkalmaztunk, mielőtt a mintákat a megolvasztott paraffinnal átítattuk. Végül, a formába öntött paraffin-blokkokból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, kézi üzemű rotációs mikrotómot (Leica Biosystems, Nussloch, Németország) használva.

A hypercholesterinaemiás nyúl modell esetében az aorta minták hematoxylin-eosinnal festett metszetein a tunica intima és media rétegvastagságát mértük, melyből később átlagos intima/media arányt számoltunk (n=5 minden csoportban).

A patkányok bal kamrájának fibrotikus elváltozásainak szövettani vizsgálatához Masson's trichrome festést alkalmaztunk. Minden patkányban 5, 50 µm-nél nagyobb lumenátmérőjű coronaria esetében a következőképpen határoztuk meg a perivascularis fibrosis arányt (PFR): az érfalat körülvevő fibrotikus terület osztva az ér teljes területével (n=5 csoportonként).

A festett metszetek vizualizálása Nikon Eclipse 80i mikroszkóp (Nikon Corp., Tokió, Japán) és Nikon NIS-Elements BR (Ver5.41.00) szoftver (Nikon Corp., Tokió, Japán) segítségével történt.

2.8. Fehérje izolálás

Mindkét kísérlet esetében a vizsgálni kívánt fehérjék expresszióját, továbbá a patkány modellben az ATPS aktivitást bal kamrai myocardium mintákból határoztuk meg. A fehérjék izolálásához 300 mg mélyfagyasztott mintát késes homogenizátor segítségével a következőket tartalmazó pufferben homogenizáltuk: 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 1 mM Na-orthovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pyrophosphate, 10 nM okadánsav, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, proteáz inhibitor koktél, valamint desztillált víz. Ezt követően a homogenizátumokat 2000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. Az így kapott felülúszó a cytosolikus és a mitokondriális proteineket, míg az alulúszó a nukleáris frakciót tartalmazta. Minden mintát 1 órán át jégen inkubáltunk 0,1% Triton-X-100-at (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tartalmazó homogenizáló oldatban. Egy második centrifugálást követően 14000 rpm-en 10 percig 4 °C-on (és a cito+mito mintákat előtte 10000 rpm-en 20 percig 4 °C-on) a kapott felülúszókat 3 felé osztottuk: (1) a minták 10 µL-éből spektrofotométer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével összfehérje-koncentrációt mértünk BCA módszerrel (QuantiPro BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich-Merk KGaA, Darmstadt, Németország); (2) ezután a maradék térfogatból 50 µL-t 1:1 arányban Laemmli pufferrel (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország) hígítottunk; (3) végül a maradék mintákat - 80 °C-on tároltuk.

2.9. Western blot

A Laemmli-vel hígított minták előzetesen kiszámolt loadolási mennyiségeit 12%-os SDS-poliakrilamid géltre vittük fel, majd a fehérjéket molekulatömegük alapján elektroforézis segítségével szétválasztottuk. Ezt követően a fehérjéket a gélről nitrocellulóz (nyúl kísérlet), illetve PVDF (patkány kísérlet) membránokra transzferáltuk (90 perc, 25 V). A membránok szabad kötőhelyeit 5% BSA-t tartalmazó TBS-T oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten, 60 percig. Következő lépésként a membránokat az alábbi primer antitestekkel overnight inkubáltuk 4°C-on: anti-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH, housekeeping fehérje; Cat.No: G8795); anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS, Cat.No: ab5589); anti-protein kinase G (PKG, Cat.No: ab97339); anti-sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a, Cat.No: ab2817); and anti-heme oxygenase-1 (HO-1, Cat.No: SAB2108676); anti-histone H3 (housekeeping fehérje; Cat.No: ab176842); anti-protein kinase G (PKG, Cat.No: ab110124); anti-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3, Cat.No: ab109085); anti-optic atrophy 1 (Opa1, Cat.No: ab42364); anti-ATP-synthase (ATPS, Cat.No:

ab181243). Az antitesteket az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) vagy a Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Németország) cégektől rendeltük. Másnap reggel a membránokat 3x10 percig TBS-T-oldattal mostuk, majd 45 percig szobahőmérsékleten a megfelelő HRP-konjugált anti-rabbit/anti-mouse secunder antitestekkel inkubáltuk. Ismét 3x10 perc mosás után a fehérjék előhívása ECL-szubsztrát (WesternBright™, ECL, Advansta Inc., San Jose, CA, USA) és LiCor C-Digit® blot scanner (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) segítségével történt. A blotok pixel-denzitásának kiértékelésére Image Studio Digits szoftvert (ver.5.2.; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) használtunk, majd az azonos mintában detektált housekeeping fehérje (GAPDH/Histone H3) pixel-sűrűségére normalizáltunk. Minden fehérje esetében 3 független kísérlet eredményeit átlagoltuk, csoportonként 3 állatból származó mintákon.

2.10. ATPS aktivitás mérés

A patkány kísérlet esetében bal kamrai ATPS (más néven Complex V) aktivitást határoztunk meg ATP Synthase Activity Assay Kit segítségével (ab109716; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). Először a gyártó által biztosított 96-lyukú microplate-re felvittük a myocardium mintákat a gyártó által javasolt hígításban, majd a 3 órás inkubációs periódus során az ATPS bekötődött a plate mélyedéseibe. Az enzim működése kapcsán $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ oxidáció figyelhető meg, amely folyamat spektrofotométer (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával a 340 nm-en mért abszorbancia csökkenéssel detektálható. A mérési görbék lineáris szakaszát kijelölő abszorbanciák különbsége és a két pont között eltelt idő hányadosa adja meg a mintában lévő ATPS aktivitását. Minden csoport esetében 5 állat myocardialis enzim aktivitását határoztuk meg, minden mintát háromszor analizálva és a végén az eredményeket átlagolva.

2.11. Statisztikai analízis

Az eredmények kiértékeléséhez GraphPad Prism programot (ver. 10; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) alkalmaztunk. Először a normál eloszlás vizsgálatát D'Agostino–Pearson (nyúl kísérlet), illetve Shapiro-Wilk (patkány kísérlet) normalitás teszttel vizsgáltuk. A nyúl modell esetében a kísérleti csoportok adatait egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey's post hoc teszttel, vagy (normális eloszlás hiányában) Kruskal-Wallis, majd Dunn's post hoc analízissel vizsgáltuk. A patkányokon végzett tanulmány eredményeinek elemzése során a fiatal kontroll és az idős inaktív csoportokat páratlan t-próbával hasonlítottuk

össze, majd a 3 öreg csoport (inaktív, rekreációs, erőltetett futó) különbségeit egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), ezt követően Tukey's post hoc teszttel azonosítottuk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, amennyiben $p < 0,05$. Az adatok átlag \pm SEM-ben (standard error of the mean) vannak feltüntetve.

3. Eredmények

3.1. Atherosclerotikus nyúl modell

3.1.1. Szérum paraméterek

Az összkoleszterin és az alacsony sűrűségű lipoprotein-koleszterin (LDL-C) szintje szignifikánsan magasabb volt a hypercholesterinaemiás csoportban a Kontroll csoporthoz képest (mindkét esetben $p < 0,0001$). A nagy sűrűségű lipoprotein-koleszterin (HDL-C) szintjében hasonló tendenciát tapasztaltunk (Kontroll vs. HC: $p = 0,0022$). A plazma atherogen index (AIP) esetében a HC csoport nyulaiban szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, mint az egészséges Kontroll állatoknál ($p < 0,0001$).

A PCE-vel kezelt HC nyulak (HC+PCE) esetében szignifikáns javulást figyeltünk meg a lipidprofilban a kezeletlen HC csoporthoz képest. Megállapítottuk, hogy a PCE szignifikánsan csökkentette mind az összkoleszterin ($p = 0,0013$), mind az LDL-C szintjét ($p < 0,0001$). Továbbá megfigyeltük, hogy az anthocyaninokkal kezelt HC nyulaknál az AIP értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a kezeletlen HC állatoknál ($p = 0,0028$).

Nem találtunk markáns különbségeket a kísérleti csoportok szérum triglicerid szintje között. A gyulladási marker C-reaktív protein (CRP) koncentrációja négyszer magasabb volt a hypercholesterinaemiás nyulak szérumban az egészséges csoportokhoz képest, míg a kezelt csoportban négyszer alacsonyabb volt, mint a kezeletlen HC csoportban. Mindemellett, nem észleltünk jelentős változásokat a cardialis necroenzim CK-MB szintjében. A vércukorszintek és a májenzimek (AST és ALT) kapcsán sem azonosítottunk eltéréseket. Vizsgálatunk egyik limitációjaként megjegyezzük, hogy az NT-pro-BNP szintek minden kezelési csoportban a kimutatási határ alatt maradtak.

3.1.2. Echocardiographia

A szívultrahangos adatok kiértékelése során megállapítottuk, hogy a hypercholesterinaemiás (HC) nyulak diastoles dysfunctiót reprezentáló jeleket mutattak a Kontroll csoporthoz képest. A HC csoportban a bal pitvar/aortagyök átmérő aránya (LA/Ao) megnőtt ($p < 0,0001$), a decelerációs idő (DecT) és az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) megnyúlt (DecT: $p < 0,0001$; IVRT: $p = 0,0148$), miközben az E/A arány és az e'/a' arány csökkent (E/A: $p = 0,0234$; e'/a': $p = 0,0002$) az egészséges nyulakhoz viszonyítva. A HC állatok esetében tapasztalt magasabb E/e' arány ($p < 0,0001$) a bal kamrai töltőnyomás fokozódására enged következtetni.

A diastoles funkciót leíró echocardiographiás paraméterekben szignifikáns javulást figyeltünk meg a PCE-vel kezelt csoportban (HC+PCE) a kezeletlen HC nyulakhoz képest: a bal pitvari tágulat mérséklődött (LA/Ao arány: $p < 0,0001$), a DecT megnyúlása csökkent ($p < 0,0001$), valamint a szöveti Dopplerrel szignifikánsan magasabb e'/a' arányt ($p = 0,0002$) detektáltunk. Továbbá, a PCE-vel kezelt állatokban az E/e' arány szignifikánsan csökkent a kezeletlen, atherogen diétán tartott nyulakhoz képest ($p < 0,0001$).

Nem találtunk szignifikáns különbségeket a kísérleti csoportok Tei-index értékeiben. A Speckle-tracking echocardiographia (STE) segítségével csökkent globális longitudinális strain (GLS) mértünk a HC csoportban a Kontrollhoz képest, míg a GLS értékek javultak a HC+PCE csoportban. Ennek ellenére a szívfrekvencia (HR), az ejekciós frakció (EF) és a frakcionált rövidülés (FS) minden esetben a normál tartományban maradt. A myocardialis systoles sebességet (s') és a mitrális anulus síkirányú systoles kitérését (MAPSE) sem az atherogen diéta, sem az anthocyanin kezelés nem befolyásolta. Végül, de nem utolsósorban nem találtunk jelentős különbségeket a bal kamrai kiáramlási traktus (LVOT) paramétereiben, beleértve az átlagos és maximális kiáramlási sebességeket (V_{max} , V_{mean}) és a nyomásgrádienseket ($maxPG$, $meanPG$).

3.1.3. Endothel-függő vasorelaxáció

A noradrenalin (NA) által kiváltott érgyűrű-összehúzódások szignifikánsan gyengébbek voltak a HC nyulakban a Kontroll csoporthoz képest $1 \mu\text{mol/l}$ NA koncentrációnál. Minden kísérleti csoportban az acetilkolin (Ach) $1 \mu\text{mol/l}$ -ig történő adagolása relaxációt idézett elő, míg magasabb Ach koncentrációk összehúzódást váltottak ki a preparátumokon. Az atherogen diéta szignifikánsan csökkentette az Ach által kiváltott relaxációt az aortagyűrűkben, miközben az Ach által kiváltott kontrakció megtartott maradt. Fontos kiemelni, hogy az alkalmazott PCE-kezelés nem befolyásolta az Ach-ra adott vascularis válaszokat. Az *ex vivo* vascularis mérés eredményei alapján megállapítottuk, hogy a nyulakban a koleszterindús étrend következtében jelentős endothel dysfunctio alakult ki, amelyet az orális PCE-kezelés nem tudott mérsékelni.

3.1.4. Szövettani festés

A Kontroll és a K+PCE csoportok esetében sem a tunica intimában, sem a tunica mediában nem azonosítottunk eltéréseket. Ezzel szemben az atherogen diétán tartott állatok intima rétegének vastagsága jelentősen megnőtt a habos sejteket tartalmazó atherosclerotikus plaque-ok következtében. Az intima/media arányok szignifikánsan magasabbak voltak a HC és a HC+PCE csoportban az egészséges Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,0001$). Nem találtunk

szignifikáns különbséget a kezeletlen és a PCE-vel kezelt HC állatokból származó aorta minták között ($p > 0,05$).

3.1.5. Western blot

A HC nyulakban a myocardialis eNOS szint szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges Kontroll csoporthoz képest ($p = 0,0190$). Hasonlóképpen, a PKG és a SERCA2a szintek esetében is szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a Kontroll és a kezeletlen HC csoport között (PKG: $p = 0,0005$; SERCA2a: $p < 0,0001$). A HC+PCE nyulakban az eNOS, PKG és SERCA2a fehérjék expressziója szignifikánsan megnőtt a kizárólag koleszterindús diétán tartott csoporthoz képest (HC vs. HC+PCE: mindhárom fehérje esetében $p < 0,0001$).

A Western blot analízis kimutatta, hogy a HO-1 szint jelentősen magasabb volt az atherogen diétán tartott nyulak myocardiumában, mint az egészséges Kontroll csoportban ($p < 0,0001$). Ezen magas cardialis HO-1 expresszió a PCE-kezelés hatására szignifikánsan mérséklődött ($p < 0,0001$).

Végezetül, egyik vizsgált fehérje esetében sem figyeltünk meg markáns különbséget a két egészséges csoport (Kontroll vs. K+PCE) között.

3.2. „Aging” patkány modell

3.2.1. Testsúlyváltozás

A statisztikai elemzés során azt tapasztaltuk, hogy a forszírozott testmozgást végző állatok testsúlygyarapodása kisebb volt, mint a mozgásszegény életmódot folytató és a rekreációs aktivitást végző csoportok esetében (Idős inaktív vs Idős forszírozott: $p = 0,0038$; Idős rekreációs vs Idős forszírozott: $p = 0,018$).

3.2.2. Szérum paraméterek

Az összkoleszterin, LDL-C és HDL-C szintek szignifikánsan megemelkedtek az idős, inaktív csoportban a fiatal kontroll csoporthoz képest (minden esetben $p < 0,0001$). Sem a rekreációs, sem a forszírozott testmozgás nem csökkentette a fent említett paraméterek szintjét. A trigliceridszint és a számított AIP értékek között sem voltak jelentős különbségek a kísérleti csoportokban. A májenzimek tekintetében az AST és ALT szintek szignifikáns emelkedést mutattak az idős, mozgásszegény életmódot reprezentáló csoportban a fiatal patkányokhoz

képest (AST: $p < 0,0001$; ALT: $p = 0,0042$). A glükózsívek hasonló tendenciát mutattak ($p = 0,0005$). Nem volt változás az állatok CRP, karbamid és kreatinin szintjében.

3.2.3. Echocardiographia

Az idős, fizikai aktivitást nem végző patkányoknál az életkorral összefüggő diastoles dysfunctio kifejezett jelei voltak megfigyelhetőek, úgymint megnövekedett LA/Ao és csökkent E/A arány (LA/Ao arány: $p = 0,0089$; E/A arány: $p < 0,0001$, a fiatal kontroll állatokhoz viszonyítva). Az e'/a' arány csökkenése, valamint a DecT és az IVRT megnyúlása szintén kimutatható volt az idős, inaktív csoportban (e'/a' arány: $p < 0,0001$; DecT: $p = 0,0003$; IVRT: $p = 0,0006$ a fiatal csoporthoz képest). Továbbá, ezekben az állatokban szignifikánsan megemelkedett Tei-indexet és E/ e' arányt detektáltunk (Tei-index: $p = 0,0003$; E/ e' arány: $p = 0,0004$). A systoles funkciókat illetően az EF és FS értékek jelentős csökkenését figyeltük meg az idős, fizikailag inaktív patkányoknál a fiatal csoporthoz viszonyítva (EF: $p = 0,001$; FS: $p = 0,0008$).

A bal kamra diastoles tevékenysége mindkét testmozgást végző csoportban javulást mutatott, azonban a változások markánsabbnak bizonyultak a forszírozott futást végző állatok esetében. A bal pitvar megnagyobbodása mérséklődött mindkét aktív csoportban az idős, inaktív életmódot szemléltető állatokhoz képest (mindkét esetben $p = 0,0037$). Továbbá, a fizikai aktivitás szignifikánsan csökkentette az E/ e' arány átlagát az inaktív idős patkányok eredményeihez viszonyítva (rekreációs: $p = 0,0083$; forszírozott: $p = 0,0006$). A forszírozott testmozgást végző patkányokban a DecT és az IVRT megnyúlása csökkent (DecT: $p = 0,0032$; IVRT: $p = 0,0002$), valamint a szöveti Doppler vizsgálat jelentős e'/a' arány növekedést mutatott ($p < 0,0001$) az öreg, mozgást nem végző állatokhoz képest. Ez a mozgásforma csökkentette a Tei-indexet ($p = 0,0013$) is, ami a globális kamrafunkció javulását jelezte.

Érdemes megjegyezni, hogy a két fizikai aktivitást végző csoport között is jelentős különbségek voltak három echocardiographiás paraméter tekintetében: a forszírozott mozgást végző patkányoknál magasabb e'/a' arányt, valamint kisebb Tei-indexet és IVRT-t állapítottunk meg, a rekreációs csoporthoz viszonyítva (e'/a' arány: $p = 0,0084$; Tei-index: $p = 0,0018$; IVRT: $p = 0,0028$).

A három idős csoport esetében a szívfrekvencia, az ejekciós frakció és a frakcionált rövidülés értékei nem különböztek szignifikánsan. Végül, de nem utolsósorban, nem volt jelentős eltérés a kísérleti csoportok bal kamra kiáramlási traktusának (LVOT) paramétereiben sem.

3.2.4. Szövettan

Az öregedés perivascularis fibrosist idézett elő a patkányok myocardiumában, amelyet a szignifikánsan magasabb perivascularis fibrosis arány (PFR) segítségével detektáltunk az idős, testmozgást nem végző csoportban a fiatal kontrollokhoz képest ($p < 0,0001$). Tanulmányunk egyik fontos eredménye, hogy mind az önkéntes, mind a forszírozott testmozgás szignifikánsan mérsékelte az erek körüli kötőszövetes lerakódást (rekreációs: $p = 0,0294$; forszírozott: $p = 0,0005$ az inaktív állatokhoz képest). A PFR esetében nem volt különbség a két testmozgást végző csoport állatai között.

3.2.5. Western blot

A Western blot analízis kimutatta a PKG-STAT3-Opa1 tengely életkorral összefüggő downregulációját. Ezeknek a fehérjéknek a szívizomban mért expressziója csökkent a testmozgást nem végző idős csoportban a fiatal kontroll patkányokhoz képest (PKG: $p = 0,0092$; STAT3: $p < 0,0001$; Opa1: $p = 0,0005$). A jelátviteli útvonal károsodása fizikai aktivitás esetén reverzibilisnek bizonyult, hiszen az expressziós szintek mindhárom fehérje esetében szignifikánsan magasabbak voltak a forszírozott és rekreációs mozgást végző csoportokban, mint a nem sportoló idős állatokban (PKG: mozgásszegény vs rekreációs: $p = 0,0060$, mozgásszegény vs forszírozott: $p = 0,0007$; STAT3: mozgásszegény vs rekreációs: $p = 0,0002$, mozgásszegény vs forszírozott: $p < 0,0001$; Opa1: mindkét esetben $p < 0,0001$).

Továbbá, az ATP-synthase expressziójának különbségeit is vizsgáltuk. Érdekes módon a fiatal, egészséges és az inaktív idős csoportok között nem figyeltünk meg jelentős különbséget ($p = 0,3686$). A rekreációs és a rendszeres, forszírozott futás viszont szignifikánsan növelte az ATPS szintjét (mozgásszegény vs rekreációs: $p = 0,0285$; mozgásszegény vs forszírozott: $p = 0,0002$).

Megjegyzendő, hogy egyik vizsgált fehérje esetében sem mutatkozott szignifikáns különbség a két fizikai aktivitást végző csoport között.

3.2.6. ATPS aktivitás

Szignifikáns csökkenést figyeltünk meg az inaktív életformát reprezentáló idős patkányok ATPS aktivitásában, a fiatal csoporthoz képest ($p = 0,0026$). Az adatok összehasonlításából származó legszembetűnőbb eredmény az volt, hogy az idősebb korban

elkezdett forszírozott fizikai aktivitás jelentősen növelte az ATPS aktivitását az idős, testmozgást nem végző állatokhoz képest ($p = 0,0086$). Ugyanakkor, a rekreációs tevékenység nem gyakorolt szignifikáns hatást az ATPS aktivitására az öregedés során.

4. Megbeszélés

A cardialis (különösen a diastoles) dysfunctio és az annak következményeként kialakuló szívelégtelenség terápiája mai napig megoldásra váró klinikai probléma. A globálisan előforduló helytelen táplálkozási szokások, valamint a társadalom elöregedése következtében a fentebb említett kórállapotok előfordulása folyamatosan növekedni fog, jelentős terhet róva a világ gazdaságára és egészségügyi ellátórendszerére. Kutatócsoportunk elsődleges célja az volt, hogy kísérletes állatmodellek segítségével tanulmányozzuk e két társadalmi kihívás cardiovascularis hatásait, valamint olyan természetes módszerek, mint a testmozgás és az anthocyaninok alkalmazásával kísérletet tegyünk a pathofiziológiai folyamatok mérséklésére. Hangsúlyozandó, hogy a fizikai aktivitást és az anthocyaninokat nem megelőző, hanem terápiás céllal, a már kialakult szív- és érrendszeri eltérések kezeléseként vizsgáltuk. Mindkét tanulmány során először funkcionális méréseket végeztünk, majd a kapott eredményeket molekuláris és szövettani módszerekkel támasztottuk alá. Kísérleteinkben olyan molekuláris útvonalakat vizsgáltunk, amelyek modulációja terápiás potenciállal bírhat az atherosclerosis és az öregedéssel összefüggő cardialis dysfunctio kezelésében.

Első kísérletünkben a hosszútávú per os anthocyanin kezelés hatását vizsgáltuk hypercholesterinaemia és következményes atherosclerosis talaján kialakuló cardialis dysfunctioban, nyúl modell segítségével. A nyulak rendkívül érzékenyek az atherogen étrendre, hiszen természetesen magas koleszterin-észter-transzfer protein (CETP) aktivitással, valamint - a főemlősökhöz hasonlóan - magas LDL-C és alacsony HDL-C profillal rendelkeznek. Továbbá, ezen állatok myocardiumának elektrofiziológiai, mechanikai és szerkezeti jellemzői, az ionszatórnák szerkezete, a coronariák felépítése, az ischaemiára és különféle gyógyszerekre adott válasza nagyobb mértékben hasonlít a humánban tapasztaltakhoz, mint más rágcsálók esetében. Végül pedig a nyulaknál és az embereknél is a miozin nehéz lánc β izoformája a domináns.

A nyúl modell echocardiographiás mérései során azt tapasztaltuk, hogy a hypercholesterinaemiás csoport esetében diastoles dysfunctio alakult ki. Szignifikánsan csökkent E/A és e'/a' arányokat, valamint megnyúlt decelerációs időt (DecT) és izovolumetriás relaxációs időt (IVRT) detektáltunk, amelyek a bal kamra elégtelen relaxációjára és ennek következtében korlátozott kamrai telődésre utalnak. A bal kamrai töltőnyomás emelkedését jelezte a HC állatok szignifikánsan nagyobb E/e' aránya, amely egyértelműen megerősítette a diastoles dysfunctio diagnózisát. A magas töltőnyomásra válaszul a LA/Ao arány növekedésével reprezentált bal pitvari tágulatot is megfigyeltük, hiszen ezekben az esetekben a

bal pitvarban megnő a nyomás a megfelelő kamrai telődés fenntartása érdekében, ami a pitvar falának feszüléséhez és így az üreg tágulásához vezet. Ennek következményeképpen megnő a pitvarfibrilláció és a thromboemboliás események kockázata, valamint a nyomásfokozódás visszaterjed a pulmonalis vénákba és légszomjhoz, csökkent fizikai teljesítőképességhez vezethet. Bár az ejekciós frakció (EF), a fracionált rövidülés (FS) és a csúcssystemes myocardialis sebesség (s') értékei a normál tartományban maradtak, a systoles kamrafunkció jellemzésére szolgáló global longitudinal strain (GLS) változása - érzékenyebb paraméter révén - előre vetíti a feltételezhetően később kialakuló, pumpafunkcióban bekövetkező hanyatlást.

A 12 hetes anthocyanin-kezelés a cardialis funkció javulásához vezetett, amit az emelkedett e'/a' arány, a LA/Ao és E/ e' arányok csökkenése, valamint a decelerációs idő és a GLS normalizálódása jellemzett, utalva arra, hogy az alkalmazott meggykivonat (Prunus cerasus extraktum, PCE) jelentős pozitív hatást gyakorolt a myocardium működésére. Érdekes, hogy vizsgálatunkban a globális myocardialis teljesítményt jellemző Tei-index értékében nem mutatkozott számottevő eltérés a csoportok között. Ugyanakkor, Bruch és munkatársai beszámoltak arról, hogy a Tei-index diagnosztikai értéke korlátozott koszorúér-betegségben (CAD) szenvedő, elsődlegesen diastoles dysfunctioval rendelkező egyének esetében. Echocardiographiás eredményeink összegzése alapján megállapíthatjuk, hogy az anthocyaninokban gazdag Prunus cerasus kivonat hatékonyan mérsékelte az atherogen diéta által kiváltott cardialis funkciózavart.

A szérum paraméterek elemzését a cardiovascularis betegségek súlyosságának becslésére alkalmas indikátorok értékelése céljából végeztük el. A lipidstatusban markáns eltérések alakultak ki az atherogen táp hatására, mivel a HC csoportban az atherogen index, valamint az összkoleszterin-, LDL-C- és HDL-C-szintek szignifikáns emelkedést mutattak az egészséges Kontrollokhoz képest. Ezek az eredmények összhangban állnak korábbi szakirodalmi adatokkal, valamint a vizsgálat alapjául szolgáló pathofiziológiai folyamat kiindulópontját is jelentik, hiszen a hypercholesterinaemia alapvető szerepet játszik az endothel károsodás és az atherosclerosis kialakulásában. Ugyanakkor, a Prunus cerasus extraktummal (PCE) kezelt csoportban a lipidprofil normalizálódását figyeltük meg, különösen az összkoleszterin, az LDL-C és az atherogen index tekintetében, ami a már fennálló lipidanyagcsere-zavar farmakológiai modulációjára utal. Több korábbi tanulmány is hasonló következtetésre jutott, megerősítve a per os anthocyanin bevitel hypercholesterinaemiára kifejtett előnyös hatását. Bár további vizsgálatok szükségesek a hatásmechanizmus feltárására, feltételezzük, hogy az alkalmazott meggykivonat gátló hatást fejtett ki a CETP aktivitására. A CK-MB szintek nem mutattak szignifikáns eltérést az egyes kísérleti csoportok között, ami arra

enged következtetni, hogy a vizsgált folyamat nem progrediált olyan mértékben, hogy szívizomkárosodás és ennek következtében necroenzim felszabadulás legyen megfigyelhető.

A magas koleszterinbevitel következtében kialakuló vascularis eltéréseket mellkasi aorta mintákon ex vivo funkcionális vizsgálat és szövettani festés segítségével azonosítottuk. A HC nyulakban az Ach által kiváltott endothel-dependens vasorelaxáció jelentősen károsodott, ami endothel dysfunctionra és egyben a nitrogén-monoxid szintézis zavarára utal. Ez az eredmény összhangban van Ludmer és munkatársai klasszikus megfigyelésével, miszerint érlemeszesedés esetén az artériák válaszkészsége az Ach-stimulációra jelentősen csökken. Az aorta thoracica szövettani vizsgálata a funkcionális eltérésnek megfelelő kiszélesedett tunica intimát és kiterjedt atheromatosis plaque-okat igazolt. Mindezek tükrében megállapítható, hogy a hypercholesterinaemia és az annak nyomán kialakuló endothel dysfunctio szorosan összefüggő folyamatokat alkotnak, amelyek együttesen hozzájárulnak a vascularis homeostasis felborulásához. Fontosnak tartom megemlíteni tanulmányunk egyik limitációjaként, hogy bár az érlemeszesedés meglétét jelen modellben a mellkasi aortában igazoltuk, szakirodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a kórfolyamat a koszorúerekre is kiterjedt, melynek fényében feltételezhető, hogy a coronáriákban is endothel dysfunctio alakult ki. Habár a PCE kezelés a lipidprofilra és a cardialis funkciózavarra kedvezően hatott, a vascularis struktúrák szintjén eredménytelennek bizonyult. A tény, hogy az anthocyanin kezelés nem csökkentette az atherosclerosis mértékét és így nem javította a vascularis statust, a szerkezetileg már súlyosan károsodott érfali integritás reverzibilitásának hiányára utal. E megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a PCE által közvetített hatások szövetspecifikusak lehetnek és elsősorban a myocardium szintjén érvényesülnek, míg a már előrehaladott atheromás elváltozásokkal jellemezhető érfalak esetében terápiás hatékonysága korlátozott.

A NO–cGMP–PKG jelátviteli útvonal károsodása a diastoles dysfunctio egyik központi pathofiziológiai mechanizmusaként ismert, ezért tanulmányunk során Western blot technikával elemeztük e cardioprotektív molekuláris tengely legfontosabb komponenseinek expresszióját. Az útvonal egyik fő downstream targetjeként számon tartott SERCA2a alapvető szerepet tölt be a diastole során, hiszen eltávolítja a Ca^{2+} -okat a cytoplasmából, ezáltal biztosítva az optimális relaxációt. Huang és munkatársai kimutatták, hogy a hypercholesterinaemia által kiváltott szívfunkciós eltérések a myocardialis SERCA2a szint és aktivitás csökkenésével is összefüggésbe hozhatók. Eredményeink szerint a HC állatok bal kamrai mintáiban az eNOS, a PKG, valamint a SERCA2a kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges Kontroll csoportban, amely a NO–cGMP–PKG útvonal atherosclerosisral összefüggő,

myocardialis downregulációjára utal. Ezen molekuláris szintű eltérések alátámasztják az echocardiographiával megállapított diastoles dysfunciót.

A PCE szívizomra kifejtett molekuláris hatásainak tanulmányozásakor azt tapasztaltuk, hogy az anthocyaninokkal kezelt HC csoport bal kamráiban az eNOS, PKG és SERCA2a fehérjék expressziója szignifikánsan emelkedett a kezeletlen HC csoporthoz viszonyítva, amely molekuláris szinten is megerősíti a diastoles funkcióban bekövetkező javulást. Az anthocyaninok eNOS-indukáló hatását korábbi tanulmányok is megerősítették. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a PCE eNOS expressziót fokozó hatása révén serkenti a NO–cGMP–PKG útvonal aktivitását, ezáltal hozzájárul a cardioprotektív hatás kialakulásához. Ezt a hipotézist támasztják alá Quintieri és munkatársainak eredményei is, akik megállapították, hogy az anthocyaninok a NO–cGMP–PKG útvonal közvetítésével védnek az ischaemia/reperfúziós károsodás ellen. Különös figyelmet érdemel, hogy a PCE által kiváltott diastoles funkciójavulás a SERCA2a expresszió emelkedésével is együtt járt, amely új aspektust nyit az anthocyaninok myocardialis hatásmechanizmusainak értelmezésében. Összességében elmondható, hogy a vizsgálat eredményei egyértelműen alátámasztják kutatócsoportunk felvetését, miszerint az alkalmazott meggyhús-kivonat kedvező hatást gyakorol az atherosclerosis társult cardialis dysfunció esetén, elsősorban a myocardialis NO–cGMP–PKG jelátviteli útvonal upregulációja és a SERCA2a downstream target expressziójának fokozása révén.

A HO-1 myocardialis kifejeződésének változását is vizsgáltuk Western blot segítségével, hiszen a stresszfehérje kiemelkedő szerepet tölt be a sejtek homeostasisának helyreállításáért felelős védekező mechanizmusok között, elsősorban oxidatív stressz és gyulladási folyamatok elleni cytoprotektív hatásai révén. Szakirodalmi adatok alapján a hypercholesterinaemia szoros kapcsolatban áll a myocardiumban kialakuló fokozott oxidatív stresszrel, amely több tanulmány szerint a HO-1 expressziójának indukciójához vezet. Ennek megfelelően vizsgálatunk során emelkedett HO-1 expressziós mintázatot figyeltünk meg a koleszterinben gazdag tápon tartott nyulak bal kamrájában. Tanulmányunk egyik meglepő eredménye, hogy a PCE-vel kezelt hypercholesterinaemiás állatok myocardiumában a HO-1 expressziója csökkenést mutatott. Ez egyfelől ellentmond azon korábbi kísérletes tapasztalásoknak, amelyek szerint a flavonoidokban gazdag növények HO-1 induktorként eredményeznek kedvező cardiovascularis hatásokat. Ugyanakkor, megfigyeléseink összhangban állnak azzal az újabb tudományos szemlélettel, amely szerint a HO-1 enzim korábban egyértelműen protektívnek tartott szerepét újraértékelni szükséges, mivel az expresszió mértéke és körülményei egyaránt meghatározó szereppel bírnak. Kimutatták például, hogy a HO-1 túlzott myocardialis expressziója – különösen öregedés vagy fokozott

nyomásterhelés mellett – a szívelégtelenség súlyosbodásához vezethet. A kísérletben detektált HO-1 expresszió csökkenésének pontos mechanizmusa egyelőre nem tisztázott, azonban feltételezzük, hogy az anthocyaninok és a koleszterin-anyagcsere közötti komplex kölcsönhatásokkal magyarázható. Valószínűsíthető, hogy az anthocyanin kezelés következtében mérséklődő myocardialis oxidatív stressz – amely a lipidprofil javulásának és az LDL-koleszterin szintjének szignifikáns csökkenésének tulajdonítható – okán „szükségtelemmé” vált a HO-1 túlzott indukciója. Tekintettel arra, hogy a HO-1 expresszió szorosan összefügg a hypercholesterinaemia fennállásának időtartamával és súlyosságával, a lipidprofil kedvező irányú befolyásolása önmagában is expressziócsökkenést eredményezhet. Alternatív magyarázatként felvethető az is, hogy a PCE a szívizomban olyan másodlagos jelátviteli útvonalakat modulált, amelyek szintén befolyásolják a HO-1 expressziót, ezért a pontos hatásmechanizmus feltárása további célzott vizsgálatokat igényel.

Ezen kísérletünk eredményeinek összegzéseként megállapítható, hogy a 12 héten át alkalmazott, anthocyaninokban gazdag *Prunus cerasus* extraktum (PCE) kezelést követően a myocardium szövetében bekövetkező NO–PKG jelátviteli útvonal aktivációja, valamint a SERCA2a fehérje expressziójának fokozódása szignifikánsan mérsékelte az atherogen diéta által indukált, már fennálló cardialis dysfunctiot. Az a tény, hogy a vascularis statusban érdemi javulás nem volt kimutatható, arra enged következtetni, hogy a PCE hatása szervspecifikusan, elsősorban a cardialis szövetállományra koncentrálódik. E protektív hatások alapján feltételezhető, hogy az étrendi anthocyaninok célzott terápiás lehetőséget kínálhatnak az atherosclerosishoz társuló szívfunkciós zavarok modulálására. Továbbá, eredményeink alátámasztják azt az egyre inkább előtérbe kerülő szemléletet, amely szerint a HO-1 túlzott expressziója – noha alapvető szerepet játszik a sejtes homeostasis fenntartásában – potenciálisan „kétélű kard” lehet és bizonyos patológiás körülmények között káros következményekkel is járhat.

Második kísérletünkben öregedő („aging”) patkány modell segítségével hasonlítottuk össze az időskorban elkezdett, hosszú távon végzett rekreációs és erőltetett testmozgás cardialis hatásait. Az utóbbi évtized kutatásai jelentős összefüggést találtak a mitokondriális dysfunctio, az öregedés és a szívelégtelenség kialakulása között. Ebből kiindulva olyan molekuláris útvonal tanulmányozását tűztük ki célul, melynek fehérjei révén mind a cardialis dysfunctio, mind a mitokondriális zavar tanulmányozása megvalósulhat az öregedés kontextusában.

Ebben a tanulmányban a szérumparáméterek analízise jelentős mértékű lipidprofil-romlást tárt fel az időskorú csoportokban, amelyet az összkoleszterin, LDL-C és HDL-C szintek emelkedése jellemezett. Ezen megfigyelések összhangban állnak korábbi szakirodalmi

adatokkal, amelyek az öregedéshez társuló, multifaktoriális eredetű hypercholesterinaemia jelenlétét dokumentálják. Meglepő módon sem a rekreációs, sem a forszírozott fizikai aktivitás nem bizonyult elegendőnek az életkorhoz társuló magas koleszterinszint mérséklésére. Ennek hátterében vélhetően az öregedési folyamat által indukált lipidanyagcsere-változások állhatnak, amelyek következtében az idős szervezet csökkent mértékben reagál az életmódbeli intervenciókra. E ponton fontosnak tartom kiemelni kísérletünk egyik limitációját, miszerint a patkány, mint laboratóriumi állatmodell nem tekinthető teljes mértékben relevánsnak a dyslipidaemia élettani és kórélettani aspektusainak vizsgálatára. A morfológiai adatok értékelése szintén megerősítette a korábbi kutatások eredményeit: a forszírozott edzésprogramban résztvevő állatok testsúlygyarapodása szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az inaktív idős és a rekreációs aktivitást végző állatokhoz viszonyítva. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a rendszeres, kontrollált fizikai terhelés időskorban hatékonyabb lehet a testtömeg-reguláció szempontjából, mint a spontán jellegű mozgásformák.

A cardialis status elemzése során célul tűztük ki, hogy azonosítsuk azokat a funkcionális és strukturális myocardialis elváltozásokat, amelyek kizárólag az öregedési folyamat következtében, egyéb kockázati tényezők fennállása nélkül alakulnak ki. Ezen eltérések megállapítására először a 12 hetes fiatal és a 24 hónapos idős csoportokat hasonlítottuk össze. Az echocardiographiás vizsgálatok alapján a 2 éves patkányok esetében szignifikánsan csökkent E/A és e'/a' arányokat, valamint megnyúlt decelerációs időt (DecT) és izovolumetriás relaxációs időt (IVRT) regisztráltunk, melyek együttesen a bal kamra relaxációs zavarára utalnak. A szívizomszövet elégtelen relaxációja következtében megnő a bal kamrai töltőnyomás, amit az E/e' arány emelkedése jelez és a diastoles dysfunctio egyik legfontosabb haemodinamikai jellemzője. Végző soron ez a végdiastoles nyomás fokozódásához vezet, így a bal pitvar fokozott nyomásterhelésnek van kitéve, ami strukturális átalakulást, elsősorban pitvari dilatációt (magasabb LA/Ao arányt) eredményez. Az ezen paraméterekben mutatkozó eltérések meggyőző bizonyítékul szolgálnak arra, hogy a 24 hónapos, testmozgást nem végző idős állatokban diastoles dysfunctio alakult ki. Eredményeink összhangban állnak Rowe és munkatársai eredményeivel, akik a 3 és 24 hónapos patkányok összehasonlítása során az életkor előrehaladtával fokozódó diastoles funkcióromlást észleltek.

A fizikai aktivitás hatásainak értékelésekor mind a rekreációs, mind a forszírozott edzésprotokoll javulást eredményezett két diastoles paraméter tekintetében, a bal kamrai töltőnyomás (E/e' arány) és a bal pitvari tágulat (LA/Ao arány) csökkentése révén. Ugyanakkor kiemelendő, hogy az e'/a' arány emelkedése, valamint az IVRT és DecT normalizálódása kizárólag a strukturált, forszírozott testmozgás esetén volt kimutatható, jelezve, hogy a

myocardium relaxációs képességének javulása kizárólag ebben a csoportban volt detektálható. Egy korábbi tanulmány szintén markáns javulást írt le 24 hónapos patkányok diastoles szívműködésében 12 hetes futópados tréning után. Továbbá, a globális bal kamrai systoles és diastoles funkció integrált mutatójaként szolgáló Tei-index vonatkozásában a forszirozott mozgásra válaszul mért csökkenés összhangban áll Cho és társai megállapításaival, akik idős egérmodellen végzett erőltetett fizikai aktivitás során hasonló kedvező eltéréseket detektáltak. Echocardiographiás eredményeink alapján elmondható, hogy az öregedéssel összefüggő diastoles funkcióromlás jelentős mértékben javítható rendszeres testmozgással, különösen a forszirozott edzésprogramok révén.

Az „aging” patkány modellben a szövettani elemzés során megfigyelt jelentős myocardialis kollagén felszaporodás – különösen az erek perivascularis régiójában – tovább erősíti az életkorhoz társuló strukturális remodelláció megjelenését, amelyet az is alátámaszt, hogy ezen elváltozások teljes mértékben hiányoztak a fiatal kontroll csoportban. A fibrosis következményeként kialakuló bal kamrai rigiditást, valamint a relaxációs fázis prolongációját a fentebb részletezett echocardiographiás paraméterek is igazolják. Hisztológiai eredményeink összhangban vannak Reed és munkatársai megfigyeléseivel, akik idősödő egérmodellben igazolták a fokozott cardialis fibrosis és a diastoles zavar közötti összefüggést. Horn és Trafford tanulmányukban szintén rámutattak a perivascularis fibrosis és a szív öregedési folyamata közötti kapcsolatra, melynek hátterében feltételezhetően jelen esetben is az áll, hogy a perivascularis kötőszövet-felhalmozódás hozzájárulhat a coronaria mikrocirkuláció zavarához, amely tovább fokozhatja a cardiomyocyták öregedési folyamatát.

Szövettani eredményeink alapján mindkét mozgásforma csökkenti a perivascularis fibrosis mértékét, így feltételezhetően fokozzák a mikrocirkulációs perfúziót. Egy 2017-es vizsgálatban 20 hónapos patkányok esetében 10-12 hetes edzésprogram után jelentős javulást írtak le a diastoles és endothelialis funkciók tekintetében, alátámasztva, hogy a testmozgás elősegítheti a myocardium relaxációs kapacitásának és a coronariák megfelelő vérellátásának fokozódását az öregedő szívben.

A molekuláris mechanizmusok vizsgálata során kiemelt figyelmet fordítottunk a PKG–STAT3–Opa1 jelátviteli útvonal elemzésére, melyet Chang és munkatársai a mitokondriális fúzió induktoraként írtak le diabeteses cardiomyopathia egér modelljében. Tekintettel arra, hogy a mitokondriális fúzió és hasadás egyensúlyának felborulása a szívizom öregedési folyamatának egyik meghatározó tényezője, Western blot analízist végeztünk a szóban forgó útvonal fehérjéinek bal kamrai expressziójának vizsgálatára. Az idős, fizikailag inaktív állatok myocardiumában csökkent PKG expressziót detektáltunk, amely tovább erősíti a diastoles

dysfunctio fennállásának diagnózisát, összhangban korábbi, eltérő modellrendszerekben végzett vizsgálatok eredményeivel. A PKG szint csökkenése rontja a szívizom relaxációját a titin óriásmolekula merevségének fokozásán és a Ca^{2+} -háztartás zavarán keresztül, valamint elősegíti a fibrosis és a cardiomyocyt hypertrophia kialakulását. Ezen hatások együttesen hozzájárulnak a bal kamrai diastoles dysfunctiohoz és strukturális remodellinghez, különösen metabolikus és életkorral összefüggő kórállapotok esetén. A STAT3 transzkripciós faktor mérsékelt kifejeződése az öregedési folyamat következtében fellépő cardioprotektív mechanizmusok hanyatlását jelzi a fizikailag inaktív csoportban. Ezen eredményünket alátámasztja az megállapítás, miszerint a STAT3 expressziójának és aktivációjának csökkenése jelentős mértékben hozzájárul a szívelégtelenség progressziójához, mivel kulcsszerepet játszik a myocardium stresszadaptációjában és a szívműködés homeostasisának fenntartásában. Az Opa1 expresszió csökkenése az idős, ülő életmódot reprezentáló csoport esetében a mitokondriális fúzió zavarának fennállására utal, amely károsodott mitokondriális dinamikát eredményezhet, ezáltal közvetlenül hozzájárulva a szívelégtelenség pathomechanizmusához. Ezen eredmény összhangban van korábbi vizsgálatokkal, ahol heterozigóta Opa1+/- egerekben a mitokondriumok dysfunctióját, ATP-depléciót és fokozott ROS termelést detektáltak. Második kísérletünk molekuláris vizsgálata egyértelműen igazolta a PKG-STAT3-Opa1 jelátviteli útvonal életkorral összefüggő downregulációját.

A Western blot eredményeinket tovább analizálva megállapítottuk – tudomásunk szerint elsőként –, hogy a testmozgás a cardioprotektív PKG-STAT3-Opa1 tengelyt is aktiválja. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy a PKG különböző pathológiás állapotok során protektív jelátvitelt indukál a szívben. Jelen vizsgálatban a fizikai aktivitás hatására tapasztalt PKG expresszió-növekedés és annak feltételezett kedvező hatása összhangban áll Heerebeek és munkatársai eredményeivel, akik szerint a diastoles szívelégtelenség kezelése során a myocardialis PKG szint helyreállítása kulcsfontosságú. A fizikailag aktív állatokban kimutatott STAT3 szint emelkedést szintén alátámasztják a legújabb tanulmányok, melyek értelmében – az onkogenezissel ellentétben – a STAT3 aktivációja szükséges a cardioprotektív folyamatok közvetítéséhez. Emellett egyre több bizonyíték szól amellett, hogy az Opa1-mediálta mitokondriális fúzió helyreállítása a zavart mitokondriális dinamika esetén az egyik legígéretesebb stratégia a szöveti funkciók javítására. Diabeteses cardiomyopathia modellben például kimutatták, hogy a punicalagin és a paeonol fokozzák a mitokondriális fúziót a STAT3 és Opa1 molekulák szabályozása révén. Ezenfelül, a κ -opioid receptor aktivációja is elősegíti a mitokondriális fúziót, mely a STAT3-Opa1 útvonalon keresztül fokozza a myocardium ellenállóképességét az ischaemia/reperfúziós károsodással szemben.

Az „aging” patkány modellen végzett kísérletünkben a molekuláris mechanizmusok részletesebb feltérképezése érdekében az ATP-synthase (ATPS) expresszióját és aktivitását is vizsgáltuk. Eredményeink alapján az ATPS aktivitása jelentősen csökkent az idős, inaktív életmódot modellező állatokban. Ez az ATP-termelés zavarára, valamint fokozott ROS termelésre utal, amelyek oxidatív stresszt generálnak, s ez közvetve hozzájárulhat az öregedéssel összefüggő cardialis dysfunctiohoz. Ezt a hipotézist megerősítik azok az irodalmi adatok, amelyek szerint a mitokondriális dysfunctio energiaszegény állapotot eredményez a szívben és súlyosbítja a szívelégtelenség kialakulását. Az aktivitásmérés további eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a kizárólag a forszírozott testmozgás hatására detektálható ATPS aktivitás fokozódása az Opa1-függő mitokondriális fúziót követi. Ezt alátámasztják azok a vizsgálatok is, melyek szerint az Opa1-mediálta fúziós mechanizmus fokozza az oxidatív foszforilációt, növeli az ATP-termelést és csökkenti a ROS felhalmozódását. Végző soron eredményeink arra utalnak, hogy a forszírozott testmozgás a PKG–STAT3–Opa1 tengely aktiválása révén, feltételezhetően a mitokondriális fúzió elősegítése során fokozza az energiatermelést idős patkányok myocardiumában.

Ezen kísérlet esetében is fontosnak tartom megemlíteni a kutatás néhány limitációját. Bár a patkányok széles körben alkalmazott állatmodellként szolgálnak a humán öregedési és edzés-adaptációs folyamatok tanulmányozására, nem képesek teljes mértékben reprezentálni az emberi szervezetben lejátszódó komplex változásokat. Másodsorban, a vizsgálat kizárólag hímnemű állatokkal történt, azonban mindkét nem kísérletbe való bevonása transzlációs szempontból általánosíthatóbb eredményekkel szolgált volna.

Második kísérletünk összegzésekképpen megállapítható, hogy ez a tanulmány az első olyan kísérletes megközelítés, amely a myocardialis PKG–STAT3–Opa1 jelátviteli útvonal és az ATPS aktivitásán keresztül vizsgálja a rekreációs és a forszírozott fizikai aktivitás diastoles funkcióra gyakorolt hatását az öregedés kontextusában. Eredményeink alapján a forszírozott testmozgás szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult, továbbá elősegítette a mitokondriális működés javulását is. Bár a pontos molekuláris mechanizmusok tisztázásához további kutatások szükségesek, ez a kísérlet új perspektívát nyújt az edzés hatásmechanizmusainak megértéséhez az öregedő szív vonatkozásában és potenciálisan új terápiás célpontokat azonosít a cardialis dysfunctio kezelésében.

5. Összegzés

Kutatócsoportunk célja az volt, hogy a hypercholesterinaemia, illetve az időskor talaján kialakuló cardialis dysfunctio terápiás vonatkozásában rávilágítson a természetes intervenciók lehetséges pozitív hatásaira. Kiemelendő, hogy mindkét kísérletsorozat esetében a vizsgálatok a már kialakult patológiás állapotokra irányultak, így az alkalmazott beavatkozásokat terápiás céllal, és nem prevenciók kontextusban értékeltük. Első kísérletünkben atherogen étrend segítségével létrehoztuk az atherosclerosist és a cardialis dysfunctiot reprezentáló nyúl modellt, majd a 12 hetes anthocyaninokban gazdag meggyhús-kivonattal végzett kezelést követően a diastoles paraméterek jelentős javulását tapasztaltuk, amit a myocardialis eNOS, PKG és SERCA2a expresszió fokozódása kísért. Megfigyeléseink arra is rávilágítanak, hogy a HO-1 potenciálisan „kétélű kard”, így a mindenkori protektív szerepét újraértékelni szükséges. Második kísérletünkben Wistar patkányok segítségével összehasonlítottuk a rekreációs és a forszírozott fizikai aktivitás hatásait az időskor talaján kialakuló diastoles dysfunctio esetében. Eredményeink alapján a forszírozott testmozgás hatékonyabban javította a bal kamrai relaxációt, mely kedvező hatás feltehetően a PKG–STAT3–Opa1 jelátviteli útvonal aktivációjának, valamint az ennek nyomán fokozódó ATPS aktivitásnak volt tulajdonítható.

6. Az értekezés új megállapításai

- Atherosclerotikus nyúl modellben a hypercholesterinaemia és a következményes érlelmeszesedés talaján kialakuló cardialis dysfunctiot a per os, anthocyaninokban gazdag meggyhús-extraktum javítja, melynek háttérében feltételezhetően a myocardialis eNOS, a PKG és a SERCA2a fehérjék expressziójának fokozódása áll; miközben a kivonat a vascularis statusra nincs hatással.
- A PCE-kezelés paradox módon a HO-1 myocardialis expressziójának csökkenéséhez vezet hypercholesterinaemiás nyulakban, ami arra utal, hogy a HO-1 protektív szerepe nem univerzális, hanem a metabolikus környezettől és oxidatív státusztól függően módosulhat.
- „Aging” patkány modellben az időskor következményeként megjelenő diastoles dysfunctiot a forszírozott testmozgás hatékonyabban mérsékli, mint a rekreációs sporttevékenység.
- Idős patkányok myocardiumában mind a rekreációs, mind a forszírozott fizikai aktivitás csökkenti a perivascularis fibrosis mértékét és upregulálja a PKG-STAT3-Opa1 jelátviteli útvonalat, de csak a forszírozott tevékenység növeli az ATP-synthase aktivitását.

7. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/448/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szekeres Réka

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szekeres, R.**, Priksz, D., Bombicz, M., Pelles-Taskó, B., Szilágyi, A., Bernát, B., Pósa, A., Varga, B., Gesztelyi, R., Somodi, S., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Exercise Types: Physical Activity Mitigates Cardiac Aging and Enhances Mitochondrial Function via PKG-STAT3-Opa1 Axis.
Aging Dis. [Epub ahead of print], 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2024.0959>
IF: 6.9
2. **Szekeres, R.**, Priksz, D., Kiss, R., Romanescu, D. D., Bombicz, M., Varga, B., Gesztelyi, R., Szilágyi, A., Takács, B., Tarjányi, V., Pelles-Taskó, B., Forgács, I. N., Gálné Remenyik, J., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Therapeutic Aspects of Prunus cerasus Extract in a Rabbit Model of Atherosclerosis-Associated Diastolic Dysfunction.
Int. J. Mol. Sci. 24 (17), 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713253>
IF: 4.9

További közlemények

3. Piros, Z., Kispál, K., **Szekeres, R.**, Takács, B., Kiss, R., Szabó, A. M., Ujvárosy, D., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Alarming Signal from the Ear: Tinnitus, a Possible Epiphenomenon of Silent Hyperlipidaemia.
Biomedicines. 12 (12), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12122837>
IF: 3.9





4. Szilágyi, A., Takács, B., **Szekeres, R.**, Tarjányi, V., Nagy, D., Priksz, D., Bombicz, M., Kiss, R., Szabó, A. M., Lehoczki, A., Gesztelyi, R., Juhász, B., Szilvássy, Z., Varga, B.: Effects of voluntary and forced physical exercise on the retinal health of aging Wistar rats. *GeroScience*. 46 (5), 4707-4728, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-024-01208-x>
IF: 5.4
5. Pelles-Taskó, B., **Szekeres, R.**, Takács, B., Szilágyi, A., Ujvárosy, D., Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., Gesztelyi, R., Szabó, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: From Nature to Treatment: The Impact of Pterostilbene on Mitigating Retinal Ischemia-Reperfusion Damage by Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Life (Basel)*. 14 (9), 1-13, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life14091148>
IF: 3.4
6. Czine, P., Balogh, P., Blága, Z., Szabó, Z., **Szekeres, R.**, Hess, S., Juhász, B.: Is It Sufficient to Select the Optimal Class Number Based Only on Information Criteria in Fixed- and Random-Parameter Latent Class Discrete Choice Modeling Approaches? *Econometrics*. 12 (3), 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/econometrics12030022>
IF: 1.4
7. Bernát, B., Erdélyi, R., Fazekas, L., Garami, G., **Szekeres, R.**, Takács, B., Bombicz, M., Varga, B., Sárkány, F., Ráduly, A. P., Romanescu, D. D., Papp, Z., Tóth, A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Priksz, D.: Drug Candidate BGP-15 Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Alters Heart Rate Variability (HRV) in Telemetry-Implanted Rats. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (3), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16030359>
IF: 4.3
8. Blága, Z., Czine, P., Takács, B., Szilágyi, A., **Szekeres, R.**, Wachal, Z., Hegedűs, C., Buchholz, G., Varga, B., Priksz, D., Bombicz, M., Szabó, A. M., Kiss, R., Gesztelyi, R., Romanescu, D. D., Szabó, Z., Szűcs, M., Balogh, P., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Examination of Preferences for COVID-19 Vaccines in Hungary Based on Their Properties: Examining the Impact of Pandemic Awareness with a Hybrid Choice Approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 20 (2), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph20021270>
9. Kozma, M., Bombicz, M., Varga, B., Priksz, D., Gesztelyi, R., Tarjányi, V., Kiss, R., **Szekeres, R.**, Takács, B., Ménes, Á., Balla, J., Balla, G., Szilvássy, J., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Cardioprotective Role of BGP-15 in Ageing Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) Model: extended Mitochondrial Longevity. *Pharmaceutics*. 14 (2), 1-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14020226>
IF: 5.4





10. Priksz, D., Lampé, N., Kovács, Á., Herwig, M., Bombicz, M., Varga, B., Wilisicz, T., Szilvássy, J., Pósa, A., Kiss, R., Gesztelyi, R., Ráduly, A. P., **Szekeres, R.**, Sieme, M., Papp, Z., Tóth, A., Hamdani, N., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy.
Br. J. Pharmacol. 179 (10), 2240-2258, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15749>
IF: 7.3
11. Viczján, G., Szilágyi, A., Takács, B., Óvári, I., **Szekeres, R.**, Tarjányi, V., Erdei, T. D., Teleki, V., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Varga, B., Gesztelyi, R.: The effect of a long-term treatment with cannabidiol-rich hemp extract oil on the adenosinergic system of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat atrium.
Front. Pharmacol. 13, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.1043275>
IF: 5.6
12. Szilágyi, A., Takács, B., **Szekeres, R.**, Tarjányi, V., Bombicz, M., Priksz, D., Kovács, A. I., Juhász, B., Frecska, E., Szilvássy, Z., Varga, B.: Therapeutic Properties of Ayahuasca Components in Ischemia/Reperfusion Injury of the Eye.
Biomedicines. 10 (5), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10050997>
IF: 4.7
13. Viczján, G., Erdei, T. D., Óvári, I., Lampé, N., **Szekeres, R.**, Bombicz, M., Takács, B., Szilágyi, A., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: A Body of Circumstantial Evidence for the Irreversible Ectonucleotidase Inhibitory Action of FSCPX, an Agent Known as a Selective Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist So Far.
Int. J. Mol. Sci. 22 (18), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22189831>
IF: 6.208

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 59,408

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,8

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

Debrecen, 2025.07.15.



8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm Dr. Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben végezhettem PhD munkámat.

Hálával és köszönettel tartozom Témavezetőmnek, Prof. Dr. Juhász Bélának, hogy nemcsak szakmai tudásával és instrukcióival kísért végig a tudományos munkában, hanem az élet többi területén is mindig támogat.

Köszönöm Prof. Dr. Gesztelyi Rudolfnak, hogy a statisztikai elemzésekben nyújtott segítsége mellett sokszor felhívta a figyelmem arra, hogy más szemszögből is érdemes vizsgálni az összefüggéseket.

Dr. Priksz Dánielnek és Dr. Bombicz Mariannak köszönöm az echocardiographia és a molekuláris vizsgálatok során nyújtott segítségüket.

Hálás vagyok Pelles-Taskó Beátának és Dr. Szilágyi Annának, hogy bármikor számíthatok rájuk, a barátságukért és őszinte támogatásukért.

Nagyon köszönöm Dr. Kiss Ritának, Dr. Takács Barbarának, Oláh Krisztinának, Szegváriné Erdős Andreának és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi munkatársának, hogy végtelen kreativitásukkal segítettek az állatkísérletek során.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom egész Családom és Barátaim szeretetéért és kitartó támogatásukért.

A kutatásokat a következő azonosítószámú projektek támogatták: GINOP-2.3.4-15-2016-00002, GINOP-2.3.4-15-2020-00008, TKP2021-EGA-18, TKP2020-IKA-04, TKP2020-NKA-04.