

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kertész Attila Béla

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2014**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Hiperkoleszterinémia adverz hatása a kardiális
homeosztázisra New Zealand nyúl modellen**

Dr. Kertész Attila Béla

Témavezető: Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

*Szüleimnek,
Gerginek és Csonginak,
Zsömének és Zuzukának.*

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
BEVEZETÉS	7
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
<i>Hiperkoleszterinémia</i>	<i>10</i>
<i>COX.....</i>	<i>11</i>
<i>VEGF.....</i>	<i>12</i>
<i>HO-1.....</i>	<i>13</i>
<i>A meggy-mag-kivonat és hatásai.....</i>	<i>13</i>
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
<i>Kísérleti állatok és a hiperkoleszterinémias állapot elérése</i>	<i>16</i>
<i>Szérum koleszterinszint mérés</i>	<i>17</i>
<i>Echokardiográfia</i>	<i>17</i>
<i>Szívizom izolálás és az izolált dolgozó szívizom rendszer leírása.....</i>	<i>18</i>
<i>Globális iszkémia kiváltása, majd reperfúzió végzése.....</i>	<i>20</i>
<i>Funkcionális mérések.....</i>	<i>21</i>
<i>Az infarktusz terület méretének meghatározása</i>	<i>21</i>
<i>Az ateroszklerotikus léziók analízise</i>	<i>23</i>
<i>Citokróm c oxidáz (COX) aktivitás mérése</i>	<i>23</i>
<i>Western blot analízis</i>	<i>23</i>
<i>Statisztika</i>	<i>24</i>
EREDMÉNYEK.....	25
<i>Szérum koleszterinszint változásai</i>	<i>25</i>
<i>A torakális aortában észlehető ateroszklerotikus plakkok kiterjedtsége</i>	<i>26</i>
<i>Echokardiográfia</i>	<i>28</i>
<i>Hemodinamikai mérések</i>	<i>32</i>
<i>Az infarktusz területek mérete</i>	<i>34</i>
<i>A citokróm c oxidáz (COX) aktivitás.....</i>	<i>35</i>
<i>A szívizomban mérhető COX III, HO-1 és VEGF fehérjék mennyisége</i>	<i>37</i>
MEGBESZÉLÉS.....	43
<i>Szérum koleszterinszint.....</i>	<i>43</i>
<i>Az emelkedett szérum koleszterin szint kardiovaszkuláris hatásai</i>	<i>44</i>
<i>A meggy-mag-kivonat addíció kardiovaszkuláris hatásai</i>	<i>47</i>
<i>A hiperkoleszterinémia molekuláris hatásai.....</i>	<i>49</i>
<i>A meggy-mag-kivonat hatásai a COX és HO-1 szintekre</i>	<i>51</i>
<i>VEGF változások.....</i>	<i>52</i>
ÖSSZEFOGLALÁS	53

HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	55
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	60
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	64
FÜGGELÉK.....	65

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A': a szívizom szöveti sebessége késő-diasztolében
A: bal kamrai beáramlás késő-diasztolés csúcssebessége
ACE-I: Angiotenzin konvertáz gátló
ARB: Angiotenzin receptor blokkoló
ADP: Adenozin-difoszfát
ATP: Adenozin-trifoszfát
cGMP: ciklikus guanozin monofoszfát
CO: szénmonoxid
COX: citokróom c oxidáz
DT: a bal kamrai beáramlás koradiasztolés sebesség-idő görbéjének decelerációs felezési ideje
E': a szívizom szöveti sebessége kora-diasztolében
E: bal kamrai beáramlás koradiasztolés csúcssebessége
EF: a bal kamrai ejekciós frakció
FS: (Fractional shortening = FS) Frakcionális rövidülés
GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
HC 12: 2% koleszterint tartalmazó táppal 12 hétig etetett nyúl
HC 40: 2% koleszterint tartalmazó táppal 40 hétig etetett nyúl
HC: 2% koleszterint tartalmazó táppal 16 hétig etetett nyúl
HC+MMK: 2% koleszterint + 30 mg/kg megymagkivonatot tartalmazó táppal 16 hétig etetett nyúl
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HO-1: hem oxigenáz-1
IVSTD: (InterVentricular Septal Thickness in Diastole) az interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolében
IVSTS: (InterVentricular Septal Thickness in Systole) az interventrikuláris szeptum vastagsága szisztolében
I/R: iszkémia-reperfúzió
Kontroll 12: normál laboratóriumi nyúltáppal 12 hétig etetett nyúl
Kontroll 40: normál laboratóriumi nyúltáppal 40 hétig etetett nyúl
Kontroll: normál laboratóriumi nyúltáppal 16 hétig etetett nyúl
LVDP: (Left Ventricular Developed Pressure) bal kamra által létrehozott nyomás
LVEDD: (Left Ventricular End Diastolic Diameter) bal kamra end-diasztolés átmérője
LVESD: (Left Ventricular End Systolic Diameter) bal kamra end-szisztolés átmérője
LVMASS: (Left Ventricular Mass) bal kamrai izom tömege
NO: nitrogén monoxid
PWTD: (Posterior Wall Thickness in Diastole) poszterior fal vastagsága diasztolében
PWTS: (Posterior Wall Thickness in Systole) poszterior fal vastagsága szisztolében
ROS: (Reactive Oxygen Species) reaktív oxigén gyökök
S': a szívizom szöveti sebessége szisztolében
SDS: sodium dodecyl sulfate
TTC: trifenil-tetrazolium klorid
TFF: trifenil-formazán
VEGF: (Vascular Endothelial Growth Factor) vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri betegségek világszerte az összes halálozás egyharmadáért felelősek. Mivel a rizikófaktorként azonosított elhízás, nem megfelelő táplálkozás, diszlipidémia, cukorbetegség, magasvérnyomás, mozgáshiány és dohányzás előfordulása mind a fejlett, mind a fejlődő országokban – többségében – emelkedő tendenciát mutat, emiatt a kardiovaszkuláris mortalitás növekedésére számíthatunk [1].

A hiperkoleszterinémia és az ateroszklerózis összefüggése egyértelmű. A klinikumban makrovaszkuláris szövődményként miokardiális infarktus, stroke, veseelégtelenség és perifériás érbetegség jelentkezhetnek, melyek felelősek a morbiditásért és mortalitásért.

A kórállapot fontosságát mutatja, hogy a betegség népegészségügyi és gazdasági jelentősége hatalmas. A kialakult ateroszklerotikus plakkok gyógyszeres, eszközös, illetve műtéti kezelése, valamint a különböző szervekben kialakuló infarktusok akut ellátása és az ezt követő rehabilitáció az egészségügy minden szintjét érinti, és egyértelműen kijelenthető, hogy az egészségügyi szolgáltatóktól nagy anyagi ráfordítást igényel.

A hiperkoleszterinémia okozta kórállapotok diagnosztikájára, korai felismerésére, a fokozott rizikójú csoportok kiválasztására különböző score-ok [2, 3], továbbá nem invazív [4, 5] és invazív [6] vizsgálatok széles tárháza áll rendelkezésünkre.

A kórállapotok kezelése és szövődmények ellátása mellett azonban kiemelt fontosságú a megelőzés szerepe. A kezelés és megelőzés lehetőségeit szélesíti a patomechanizmus részletes feltárása, azonban ez hiperkoleszterinémia esetében még nem minden részletében ismert.

A hiperkoleszterinémia hatásait molekuláris [7], mitokondriális [8], celluláris, humorális, endoteliális [9] és szöveti-szervrendszeri szinten egyaránt tetten érhetjük.

A legújabb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a mitokondriumok különösen érzékenyek a hiperkoleszterinémiával összefüggő oxidatív stresszre [10], például hiperkoleszterinémiás nyúl aortájában emelkedett malonaldehid szint mérhető, amely a fokozott oxidatív stressz markere, és amelyet a reaktív szabadgyökök (ROS) magasabb szintjével magyaráznak [11-15]. A fokozott ROS képződés hatással van a mitokondriális elektron transzport fehérjéire, melynek következtében a légzési lánc működése károsodik, ami tovább fokozza a ROS képződést. Az oxidatív folyamatok térnyerése a citokróm c és citokróm c oxidáz elégtelen működéséhez, ezzel végző soron a doxorubicin indukálta kardiomiopátiára emlékeztető szívizom-károsodáshoz vezet [16].

A hiperkoleszterinemiában észlelt vaszkuláris eltérések háttérben gyulladáshoz vezető folyamatok, endotél diszfunkció, csökkent nitrogén-oxid válasz állhatnak [9, 17], melyek különböző mértékben érintik a nagy- és kis-ereket [18].

A magas szérumszint befolyásolja a szív elektromos tevékenységét is. Az akciós potenciál megnyújtásával növeli a QT intervallumot, melynek következtében nő a repolarizáció diszperziója, ami fokozza a kamrafibrillációra való hajlamot.

A hiperkoleszterinémia következtében a fent említett eltérések összegeként az évek során csökkent szívműködés, szívelégtelenség alakul ki. A szívelégtelenség a szívműködés betegség végstadiumát jelentő, igen rossz prognózisú kórállapot. Mivel a kórkép leggyakrabban krónikus folyamatok végeredménye, reverzibilitása leggyakrabban kérdéses. Kezelésében gyógyszeres és eszközös beavatkozások széles tárháza áll rendelkezésre. A szívelégtelenség farmakoterápiájának alapvető gyógyszerei a béta blokkolók, angiotenzin konvertáz gátlók (ACE-I) vagy angiotenzin receptor blokkolók (ARB), aldosteron antagonisták, diuretikumok, szivglikozidok (digoxin, digitoxin) és a sinus csomó spontán depolarizációját nyújtó ivabradin. Bizonyos esetekben, a farmakoterápiát eszközös kezeléssel egészíthetjük ki. Bal kamrai aszinkronia esetén a reszinkronizációs pacemaker implantáció reverz remodellinget, bal kamra funkció javulást ér el, aszinkronia hiányában a malignus ritmuszavarokat elektromos úton megszüntető implantálható kardioverter defibrillátor beültetésétől várhatunk mortalitás csökkenést. Terápia rezisztens szívelégtelenségben a szívtranszplantáció, illetve legújabbban az implantálható mechanikus keringéstámogató eszközök behelyezésére van lehetőség [19]. Mindezen lehetőségek ellenére a magas jövedelmű országokban a szívelégtelenség vezető halál oka tényező [20].

A hiperkoleszterinémia és szövődményei igen nagy társadalmi jelentőségűek, és ezek kezelése még korántsem tekinthető megoldottnak. Fontos a korai felismerés, hogy az időben megkezdett specifikus terápiával megelőzzük az egyes szervek végstadiumának kialakulását. A reverzibilitás a behatási időtől, és a kezelési módtól is függ.

Bizonyos örökletes betegségekben, például a familiáris hiperkoleszterinemiában, a rendelkezésre álló gyógyszerek maximális dózisa és kombinációja mellett a hiperkoleszterinémia szövődményei progresszívan alakulnak, az ilyen betegek fiatalon a hiperkoleszterinémia szövődményeiben halnak meg. De ismert genetikai eltérés nélkül is gyakran látjuk, hogy a legmegfelelőbb gyógyszeres kezelés és életmódváltás ellenére az ateroszklerózis progresszívan alakul, egyre több szervrendszert érint, és nem látunk megfelelő terápiás lehetőséget a progresszió megállítására. Kénytelenek vagyunk elfogadni a szemünk láttára romló állapotot, és végignézni a beteg hanyatlását, majd valamely szövődmény következtében

történő exitusát, mely igen nagy pszichés teher a hozzátartozók, de a kezelő egészségügyi személyzet számára is, ezért fontos az alternatív útvonalak, kezelési stratégiák keresése.

A modern molekuláris gyógyszertervezés korában is figyelemre méltó az a tény, hogy a természetben, különösen a növényvilágban található anyagok tanulmányozása a gyógyszerkutatás történetében több alkalommal vezetett sikerre. A Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszékén több gyógynövénykivonat, különböző hatásait tanulmányozták. Egy ilyen kutatás eredménye a meggymag-kivonat kedvező hatása retina, illetve egészséges patkány szívizom iszkémia reperfúziója kapcsán [21, 22]. Munkám során a hiperkoleszterinémia kapcsán észlelt változások idő függését és ebben az állapotban a meggymag-kivonat kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait vizsgáltam. Az idő-hatás vizsgálatot addig folytattuk, amíg a szívizom szisztolés funkciójának romlása is kimutathatóvá vált, és nem csak a diasztolés funkciózavar jelei voltak észlelhetők.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Hiperkoleszterinémia

A koleszterin a szterol vegyületcsoport tagja [23], széles körben előfordul gerincesekben és számos egyéb élőlényben. Életfontosságú molekula, mely a szteroid hormonok előanyaga és a sejtmembránok fontos építőeleme, jelentős szerepe van a sejtmembrán fluiditás és permeabilitás meghatározásában. Szintézise a májban, a mellékvesében, a petefészekben és herében, valamint a bélhámsejtekben zajlik. A szintézis sebességének meghatározó lépése a HMG-CoA reduktáz enzim által végzett reakció.

Az endogén koleszterin szintézis mellett, a táplálékból exogén koleszterin felvétel is zajlik. A koleszterin transzportját a vérben fehérjéket és lipideket tartalmazó lipoproteinek végzik.

Lipoproteinek: A lipoproteinek hidrofób, apoláris lipideket tartalmazó központi magból, és egy poláris alkotórészeket, foszfolipideket, szabad koleszterint és az ezekhez kapcsolódó apolipoproteineket tartalmazó külső burokból állnak. Az apolipoproteinek egyrészt biztosítják a lipoproteinek stabilitását, másrészt a lipoprotein-receptorok ligandumai és metabolizmusukban szerepet játszó enzimek kofaktorai lehetnek. A központi magban található lipidek relatív arányától, és az apoproteinek típusától függően a lipoproteineket több csoportba sorolhatjuk [24].

Kilomikron: A kis sűrűségű kilomikronokat amelyek apoB-48, apoA, apoE és apoC apoproteineket és a táplálékból származó triglicerideket és koleszterint tartalmaznak, a bél epithelsejtjei képzik és szekretálják a nyirokkeringésbe. A kilomikronból az endotél sejtek felszínén található lipoprotein-lipáz szabad zsírsavakat szabadít fel a szövetek számára. A kilomikron maradékok a májba kerülnek, ahol a bennük lévő koleszterin tárolódhat, epesavakká alakulhat vagy bekerülhet a nagyobb sűrűségű lipoproteinekbe.

VLDL (very low density lipoprotein): a májban képződik, apoB-100, apoE és apoC apoproteineket, koleszterinésztereket és újonnan szintetizált triglicerideket tartalmaz. A keringésben a lipoprotein-lipáz a VLDL-ből szabad zsírsavakat szabadít fel a szövetek számára.

IDL (intermediate density lipoprotein): közepes sűrűségű lipoprotein, mely a lipoprotein-lipáz hatására VLDL-ből keletkezik.

LDL (low density lipoprotein): IDL-ből keletkezik, alacsony sűrűségű, magas koleszterin tartalommal rendelkezik. A májsejtek és a perifériás szövetek veszik fel endocitózissal

specifikus LDL-receptoraik segítségével. Fő funkciója a szövetek koleszterin igényének kielégítése.

HDL (high density lipoprotein): a májban képződik, foszfolipideket és koleszterinésztereket, apoA, apoC, apoE, és apoM apoproteineket tartalmaz. Fő funkciója a szöveti koleszterin megkötése és a koleszterin szállítása a VLDL és az LDL partikulumokhoz. A HDL részecskéknél - melyek a legkisebb (5-15nm) lipoprotein osztályba tartoznak - van a legmagasabb relatív fehérje tartalma. A koleszterin extrakciójával képesek az artériás plakk képződést gátolni.

Mivel a nyúl növényevő állat, az exogén úton bevitt koleszterindús diéta hatására szervezetében a HDL/LDL arány hamar leromlik, ezért a hiperkoleszterinémiás nyúl kiváló modell a kardiovaszkuláris történések és az ateroszklerózis tanulmányozására.

COX

A mitokondrium kettős membránnal rendelkező organelum, mely a sejt aerob energiatermeléséért felelős. Működése során a két membrán közötti térbe H^+ -t halmoz fel, mellyel ATP termelésre felhasználható membránpotenciált hoz létre.

A citokróm c és a COX a mitokondriális elektrontranszportban résztvevő fehérjék. A COX felelős az oxigén vízmolekulává történő redukálásáért, valamint a H^+ transzportjáért a mitokondrium két membránja közötti térbe [25]. A folyamat a sejt energiatermelése szempontjából alapvető jelentőséggel bír. A két membrán közötti térben felhalmozott protonok a mitokondrium mátrixba az ATP szintetázon keresztül jutnak vissza, mely során ATP képződik.

A citochrome c az elektrontranszport mellett erős ROS (reaktív oxigén gyökök) gátló (scavenger) hatással bír, viszont a cardiolipin peroxidálását követően a citoplazmába jutva apoptózist indukál [26].

A COX a mitokondriális membránpotenciál kialakításának kulcsfontosságú enzime, melynek aktivitása több ponton szabályozott. Kóros körülmények között a mitokondriális membránpotenciál a normális értéktől jellemző módon eltérhet. Iszkémia-reperfúzió során a szöveti oxigén ellátás függvényében három fázis alakul ki.

1. Iszkémiás (éhezési) fázis: Ebben a fázisban az energiahiány miatt a COX aktivitás fokozódik, az intramitokondriális kalcium tartalom nő, a mitokondriális membránpotenciál a lehetőségekhez képest megtartott marad.

2. Reperfúziós fázis: A kalcium hatására az 1. fázisban hiperaktívvá vált COX molekulák a megérkező oxigént hasznosítva hiperpolarizálják a mitokondriális membránpotenciált (fokozódik a két membrán közötti tér H^+ tartalma), ami ROS képződéshez vezet. A hiperpolarizált állapot egér agyban végzett mérések alapján mintegy 8 percig tart [27].

3. Mitokondriális diszfunkció (az energiatermelés elégtelenségének) fázisa: Ebben a fázisban a légzési lánc fehérjéi a szabadgyökök oxidatív károsítása miatt részben tönkremennek, ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenésével és az energiatermelés hanyatlásával jár. Ha a károsodás elér egy fokot, apoptózis indukálódik [28].

A fentiek alapján a COX mennyisége és aktivitása jelentősen befolyásolja a sejt nyugalmi körülmények közötti energiatermelését, valamint fontos szerepet játszik az iszkémia-reperfúzió kapcsán észlelt szöveti károsodás patomechanizmusában.

VEGF

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor szignál protein, mely tirozin kináz receptorokhoz kötve fejti ki angiogenetikus hatását. Elégtelen oxigén ellátás esetén a sejtek hipoxia indukált transzkripciós faktor termelését kezdik meg, mely VEGF felszabadulást eredményez [29]. Normál körülmények között alapvető szerepe van a magzati szervezetben az érrendszer kialakulásában, a későbbiekben a növekedésben, valamint sérüléseket követő regenerációban. Több közlemény számolt be az intravénás [30] illetve plazmával génterápiás módon [31] bejuttatott VEGF remodelling gátló hatásáról. Patkányoknál infarktust követően a szöveti VEGF és a VEGF receptorok fokozott expresszióját figyelték meg [32].

A fiziológias szerepén túl bizonyos kórállapotokban is jelentős szereppel bír. Daganatos betegségekben történő felszabadulása segíti a tumorok növekedését, növeli az áttétképző hajlamot [33]. A diabéteszes retinopátia kialakulása során a diabéteszes angiopátia okozta elégtelen vérellátás következtében megnövekedik a VEGF produkció, mely hatására túlzott érképződés indul. A túlzott neovaszkularizáció a retina funkciójával interferál, mely végső soron a látás elvesztését okozhatja [34]. Hasonló patomechanizmussal alakul ki az idős korban észlelhető makula degeneráció [35]. Az anti-VEGF terápiák eredményességét széles körben vizsgálják a fent említett kórállapotokban.

HO-1

A 70-es években fedezték fel a számtalan sejtszintű és szöveti szabályozó hatással rendelkező endoteliális relaxáló faktort. A 80-as években derült fény arra, hogy az endoteliális relaxáló faktor valójában a gáz halmazállapotú nitrogén-monoxid (NO). Ezen felfedezés nyitott utat egy másik, fiziológias körülmények között a szövetekben termelődő gáz, a szénmonoxid szabályozó szerepének vizsgálatára.

A szénmonoxid képződéséért a hem oxigenáz felelős. A mikroszómális hem oxigenáz [36] végzi a hem oxidatív lebontását, mely során biliverdin, szénmonoxid és Fe^{2+} keletkezik. Emlősökben a hem oxigenáznak három, különböző gén által kódolt izoformja, HO-1, HO-2 és HO-3 található. A HO-3, mely struktúráisan a HO-2-vel mutat nagy hasonlóságot, kis jelentőséggel bír. A HO-nak antioxidáns mechanizmusa révén védő szerepet tulajdonítanak, melyet a stressznek kitett szövetekben mérhető emelkedett szintje is magyaráz (emiat sorolják a hősök proteinek csoportjába).

A HO aktivitás következtében létrejövő CO vizsgálata kapcsán igazolódott endogén transzmitter szerepe. Biológiai hatását a ciklikus guanil-monofoszfát (cGMP) képződésért felelős guanil cikláz enzimre hatva fejt ki [37]. Az érfalakban képződő CO a vaszkuláris tónus és trombocita funkció szabályozásának fontos eleme [38]. A genetikai modifikációval elért fokozott hem oxigenáz-1 expresszió igazoltan neuroprotektív hatással bír iszkémiás cerebrális inzultus esetén [39].

Iszkémia-reperfúzió hatására a szöveti HO-1 szint csökkenés figyelhető meg.

A meggy-mag-kivonat és hatásai

A meggy-mag-kivonat elkészítése során a meggy-magok csonthéját kiszáradásukat követően eltávolítják. Belső részüket őrlék és Soxhlet-extraktor segítségével, n-hexánnal kivonatot készítenek. A kivonat vízmentesítését követően olajos és szilárd fázisra válik ketté. Az olajos fázis (a kivonat 32-36%-a) eltávolítását követően a szárított szilárd fázist (a kivonat 64-68%-a) használják klinikai vizsgálatokban. A kivonat elemzése kapcsán (UV, infravörös, gáz kromatográfia és tömeg spektroszkópia) kimutatták, hogy az olajos fázis triglicerideket, olajsavat, α -tokoferolt, toko-trienolokat és tokoferol szerű anyagokat tartalmaz. A szilárd fázisban számtalan biológiailag aktív vegyületet található, mely 2-4%-a cianid, 1-3%-a polifenol, 1-4%-a flavonoid, 1-3%-a növényi sav, 1-2%-a pro- és antocianidin, 1%-a transz-reszveratrol, 1%-a stilbene és 1%-a katekin [40]. Korábbi vizsgálatok igazolták a meggy-mag-kivonat erős antioxidáns [41, 42] és hem oxigenáz-1 induktor hatását (patkány retinában [21],

diabéteszes egyénektől vett vér leukocita tenyészetében [43]). Feltehetően mindkét mechanizmus szerepet játszik az iszkémia-reperfúzió kapcsán megfigyelhető igen kedvező hatásaiban. 2 hetes kezelést követően, dózis függő protektív hatását bizonyították (10 és 30 mg/tskg kivonatot tartalmazó táppal etetett állatok) egészséges patkány retina [21], illetve egészséges patkány, izolált szívizom preparátum [22] iszkémia-reperfúziója kapcsán, az állatokra kifejtett bármilyen káros mellékhatás észlelése nélkül.

Patkány retinában iszkémia-reperfúziót követően 24 órával alacsony HO-1 szint és csökkent CO képződés figyelhető meg, magas szöveti Na^+ és Ca^{2+} koncentrációval és csökkent K^+ tartalommal. Meggyماغ-kivonatot tartalmazó táppal történő etetés hatására 10 és 30 mg/tápkg dózisoknál, az iszkémia-reperfúziót követő 24. órában, az állatok retinájában a dózis függvényében szignifikánsan nagyobb HO-1 mRNS expresszió, magasabb HO-1 protein szint, és CO képződés, szignifikánsan alacsonyabb szöveti Na^+ és Ca^{2+} tartalom, szignifikánsan magasabb szöveti K^+ tartalom mérhető a nem kezelt állatokéhoz képest. 5 mg/tápkg mennyiségű meggymag-kivonat hatására szignifikáns különbség nem alakult ki [21].

Izolált patkány szívizmon a meggymag-kivonat hatására 30 mg/tskg dózisonál a reperfúziót követő kamrafibrilláció és kamrai tachycardia gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nem kezelt és a 1, 5, 10 mg/tskg meggymag-kivonattal kezelt csoportban. 10 és 30 mg/kg dózis mellett az iszkémia-reperfúziót követően 60 és 120 perccel szignifikánsan magasabb aorta kiáramlás, koronária átáramlás és magasabb bal kamra által generált nyomás volt mérhető, mint a nem kezelt csoportban, valamint ezen dózisoknál az iszkémia-reperfúzió hatására kialakuló infarktusz terület nagysága is kisebbnek adódott a kontroll állatokéhoz képest.

A fenti kísérletek igazolták a meggymag-kivonat (30 mg/tskg dózisu) protektív hatásait különböző szerveken, iszkémia-reperfúzió kapcsán, egészséges állatmodellben.

CÉLKITŰZÉSEK

Nyúl állatmodell alkalmazásával, két kísérleti elrendezésben kerestük a választ arra, hogy milyen hatással van a fokozott alimentáris koleszterin bevitellel indukált hiperkoleszterinémia a kardiovaszkuláris paraméterekre és a szöveti markerekre, valamint, hogy az így létrehozott hiperkoleszterinémiás állatmodellben megfigyelhető-e kedvező hatása a hem oxigenáz-1 induktor meggymag-kivonatnak [44].

Kíváncsiak voltunk, hogy a 2%-os koleszterinnel dúsított táppal végzett etetés milyen mértékű szérum koleszterinszint emelkedést okoz nyúl állatmodellben, valamint, hogy a behatási idő (12 és 40 hét) mennyire befolyásolja a hiperkoleszterinémia kardiovaszkuláris és molekuláris hatásait.

Vizsgálatuk, hogy az így előidézett hiperkoleszterinémia milyen hatással van a torakális ateroszklerózisra; az *in vivo*, szívultrahanggal mérhető funkcionális paraméterekre; az *ex vivo*, izolált szívizom preparátumon mérhető funkcionális paraméterekre; a szívizomban kialakult infarktus mértékére; a szívizomban található citokróm c oxidáz (COX) protein mennyiségére és aktivitására; a szívizomban található hem oxigenáz-1 (HO-1) és vaszkuláris endoteliális növekedési hormon (VEGF) proteinek mennyiségére.

Előző kísérleteink alapján kíváncsian vártuk, hogy a meggymag-kivonat addíció 16 hetes behatási idő esetén milyen hatással van a fent említett paramétereket.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és a hiperkoleszterinémias állapot elérése

Vizsgálatainkban 2-2.5 kg testsúlyú, felnőtt, hím, New Zealand típusú nyulakat használtunk. Kísérleteink során az állatvédelmi törvénynek és ennek végrehajtása tárgyában megjelent országos (243/1998.(XII. 31.) számú, az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet) és nemzetközi (a National Society of Medical Research által kiadott „Principles of Laboratory Animal Care” [45]) szabályzatoknak megfelelően jártunk el. A kísérletek elvégzését a Debreceni Orvostudományi Egyetem Állatkísérleti Tudományetikai Bizottsága jóváhagyta.

A nyulakat laboratóriumi nyúltáppal etettük (ad libitum):

- a kontroll csoport (Kontroll) normál laboratóriumi nyúltápot,
- a hiperkoleszterinémias csoport (HC) 2%-os koleszterinnel dúsított tápot (Gödöllő LTD, Budapest, Magyarország),
- a meggy-mag-kivonattal végzett kísérletben a kezelt csoport (HC+MMK) 2%-os koleszterinnel, plusz 30 mg/kg meggy-mag-kivonattal (MMK) dúsított tápot kapott.

Az állatokat két kísérleti protokoll alapján 7 csoportba osztottuk. A hiperkoleszterinémia hatásainak idő-függését vizsgálva 4 csoportot alakítottunk ki.

12 és 40 héten keresztül normál nyúltáppal etetett állatok:

- Kontroll 12 (n=4) csoport és
- Kontroll 40 (n=4) csoport

12 és 40 héten át 2% koleszterint tartalmazó táppal etetett állatok:

- HC 12 (n=4) csoport és
- HC 40 (n=4) csoport.

A meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben 3 csoportot vizsgáltunk.

- 16 hétig normál nyúltáppal etetett állatok: Kontroll csoport (n=6)
- 16 hétig 2% koleszterint tartalmazó táppal etetett állatok: HC csoport (n=6)
- 16 hétig 2% koleszterint + 30 mg/kg meggy-mag-kivonatot tartalmazó táppal etetett állatok: HC+MMK csoport (n=6).

Szérum koleszterinszint mérés

Rendszeres időközönként szérum koleszterinszint meghatározás történt. A szérum koleszterinszintet vénás vérből határoztuk meg Cardio Check készülékkel (Point of Care Diagnostic Ltd, Artarmon, New South Wales, Australia). A szérum koleszterinszint követésére minden állatnál, az előre meghatározott protokollnak megfelelően, adott időpontokban végeztünk méréseket. Az idő-függés vizsgálata során a 0., 4., 8., 12., 32. és 40. héten mértük a koleszterinszintet, a meggyomag-kivonattal végzett vizsgálatban pedig a 0., 2., 4., 8. és 16. héten.

Echokardiográfia

Szívultrahangos vizsgálatok felületes anesztéziában (15 mg/kg ketamin + 3 mg/kg xylazin i.m.) történtek. A mellkas szőrét leborotváltuk, az állatokat hátukra, a csúcsi metszetek elkészítése során bal oldalukra fektettük. A szívultrahangot az idő-függési vizsgálatban VEVO 770 nagyfelbontású, dedikált kisállat szívultrahangos készülékkel (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, ON, Canada), a meggyomagkivonat hatását vizsgáló kísérletben Sequioa 512 (Siemens /Acuson, Tarrytown, New York, USA) készülékkel, 7 MHz-es transzducerrel, hagyományos 2D képalkotás móddal (fundamental imaging) végeztük. A vizsgálatokat digitális formában (CD, illetve magneto-optikai lemez) rögzítettük, a kiértékelés későbbi időpontban történt. A szívultrahangos vizsgálat kapcsán a human vizsgálatoknak megfelelő standard metszeteket, véráram- és szöveti Doppler görbéket rögzítettünk [46] [47]. A szívultrahangos vizsgálatokat a következő protokoll szerint végeztük:

2D paraszternális hossztenyelyi metszet,

2D paraszternális rövidtenyelyi metszet a papilláris izmok magasságában,

150 mm/sec futási sebességgel készített, 2D alapján pozícionált M-mód kép a papilláris izmok magasságában (paraszternális hossz- és rövidtenyelyi metszetből is elkészítve),

csúcsi 4 üregi metszet,

csúcsi 2 üregi metszet,

bal kamrai beáramlási spektrális pulzatis Doppler görbe,

bal kamrai kiáramlási pálya spektrális pulzatis Doppler görbe,

mitrális laterális és szeptális, valamint trikuszipidális anulus spektrális szöveti Doppler görbe.

A mérések kapcsán 0.1 mm-es pontosságot, leading-edge to leading-edge módszert alkalmaztunk, a 3-5 egymást követő szív ciklus során mért értéket átlagoltuk.

M-mód képből mértük az interventrikuláris szeptum (IVSTD) és a bal kamra hátsó fal (PWTD) diasztolés vastagságát, a bal kamrai vég-szisztolés (LVESD) és vég-diasztolés (LVEDD) átmérőket, paraszternális hossztenyelyi képből az aorta gyök és bal pitvar anteroposterior átmérőjét. A fenti adatokból kiszámoltuk a frakcionális rövidülést (Fractional shortening = FS), a bal kamrai ejekciós frakciót (EF) és a bal kamrai izomtömeget (LVMASS) az alábbi képletek segítségével:

$$FS=(LVEDD-LVESD)/LVEDD*100$$

$$EF=(LVEDD^2-LVESD^2)/LVEDD^2*100 [46]$$

$$LVMASS= 1.05*([LVEDD+PWTD+IVSTD]^3-LVEDD^3) [48]$$

Mértük a vér bal kamrai kiáramlás sebesség-idő integrálját, az aorta áramlás csúcssebességét, a bal kamrai beáramlás korai (E) és pitvari komponens (A) csúcssebességét, az E hullám decelerációs idejét (DT), a mitralis lateralis és septalis anulus, valamint a tricuspidalis latetralis anulus systoles (S'), korai (E') és késői (A') diasztolés szöveti sebességét [47].

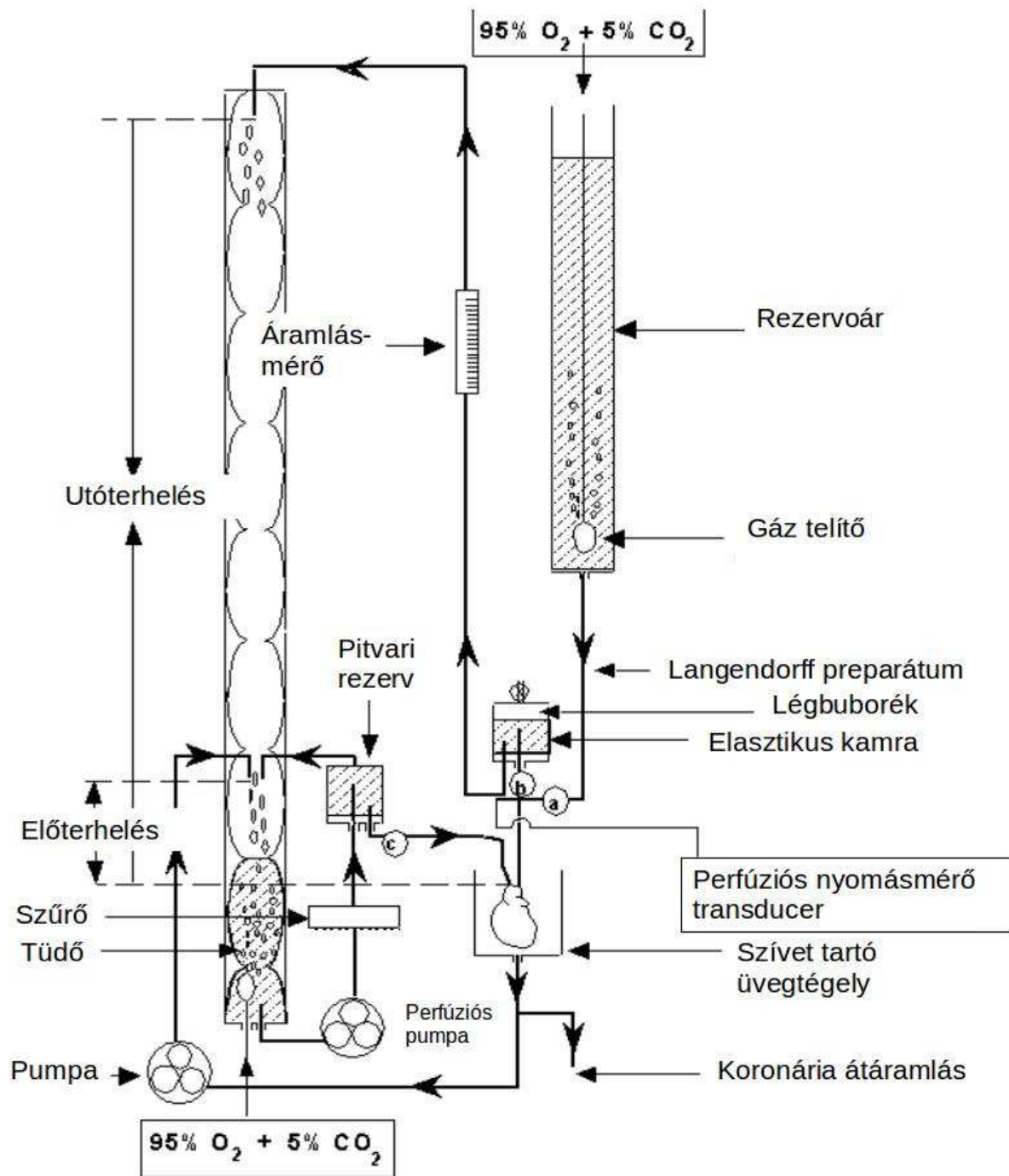
Szívizom izolálás és az izolált dolgozó szívizom rendszer leírása

A nyulakat a kísérleti időszak végén (az idő-függés vizsgálatában 12 és 40 hét után, a meggyomag-kivonattal végzett kísérletben 16 hét után) áldoztuk fel. 1000 E Na-heparin intravénás (tromboembólia kivédésére) és ketamin/xylazin (40/5 mg/kg) kombináció (analgézia) intramuszkuláris adását követően az állatok szívét torakotómia során eltávolítottuk és jéghideg pufferbe helyeztük. Az aortát kanüláltuk, majd a szívet 5 percig Langendorff módban (retrográd) perfundáltuk átmosás céljából 100 vízcentiméter folyamatos nyomással (10 kPa). A perfundáló oldat módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer volt, melynek összetétele: 118 mM, NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével telítettük (pH: 7,4, 37 °C).

A bal pitvar kanülálását követően a szívet dolgozó módba kapcsoltuk, mely során a puffer anterográd irányba áramlik, a korábban patkányszívre leírt [49], majd nyúlszívre átdolgozott módszert követve [50]. Ebben az esetben a bal pitvarba bevezetett perfúziós puffer oldat a bal kamrán keresztül az aortába jutott. Innen az oldat egy része egy az áramlás mérésére alkalmas csőrendszerbe, másik része a koronáriákon keresztül a sinus coronariusba, majd a jobb pitvarból a jobb kamrába, innen a felvágott pulmonális artérián keresztül a szív alatt elhelyezett üvegtégelybe került – koronária átáramlás.

A fent leírt rendszerben a bal pitvari nyomást (bal kamrai előterhelés) 17 cm puffer oldat nyomására (1.7 kPa), az aorta nyomást (bal kamrai utóterhelés) 90 cm puffer oldat nyomásra (9 kPa) állítottuk be (1. ábra).

Az izolált szívbe szúrt ezüst elektróda segítségével folyamatos EKG monitorozást végeztünk. Az aorta kiáramlás mérésére kalibrált áramlásmérőt (Gilmont Instruments, Barrington, Illionis, USA) használtunk. A koronária átáramlást az időegység alatt a szívből kicsepegő puffer mennyiségének mérésével határoztuk meg. A bal kamra által generált nyomást (Left Ventricular Developed Pressure) a kiáramlási szár oldalára csatlakoztatott nyomásmérővel mértük.



1. ábra. Az izolált dolgozó szívizmon végzett hemodinamikai mérésekre alkalmas rendszer vázlata

Globális iszkémia kiváltása, majd reperfúzió végzése

10 perces aerob perfúziót követően rögzítettük a kiindulási paramétereiket. Ezután 30 percig globális szívizom iszkémiát hoztunk létre a perfúziós oldat keringetését végző perisztaltikus pumpa (MASTERFLEX, Vernon Hills, Illionis, USA) leállításával, valamint a pitvari

beáramlási és aorta kiáramlási kanülök lezárásával. Ebben a fázisban az izolált szív kiszáradását a felfüggesztett preparátumot tartalmazó fűtött üvegtégely lefedésével és a benne lévő páratartalom egyenletesen magas szinten tartásával előztük meg.

A globális iszkémia megszüntetését követően az aritmia előfordulásának csökkentése érdekében (a kiinduláshoz hasonló módon) 10 perces Langendorff szerinti perfúziót végeztünk, majd ismét dolgozó módba kapcsoltuk a szívet és 120 percig ebben az állapotban tartottuk (reperfúziós fázis).

Kizárási kritériumok

Az izolált dolgozó-szív preparátumon – az előre meghatározott kritériumok alapján – nem végeztünk mérést, amennyiben a globális iszkémia előtt (azaz baseline – kiindulási fázisban):

- I. kamrai aritmia volt észlelhető,
- II. az aorta kiáramlás 50 ml/perc-nél, a koronária átáramlás 40 ml/perc-nél kisebbnek adódott.

Funkcionális mérések

Mivel a koleszterindús táppal 40 hétig etetett csoportban az izolált szívek nyugalmi paraméterei drasztikusan leromlottak, az idő-függési vizsgálatban a szíveket egyik csoportban sem tettük ki iszkémia-reperfúzióknak, vagyis a funkcionális paramétereknek csak a nyugalmi értékeit határoztuk meg. Ezzel szemben a meggyomag-kivonat hatásának vizsgálata során az izolált szíveket a nyugalmi mérések követően iszkémia-reperfúziós provokációnak tettük ki, ezután két időpontban (a reperfúzió 60. és 120. percében is) lemértük a funkcionális paramétereket.

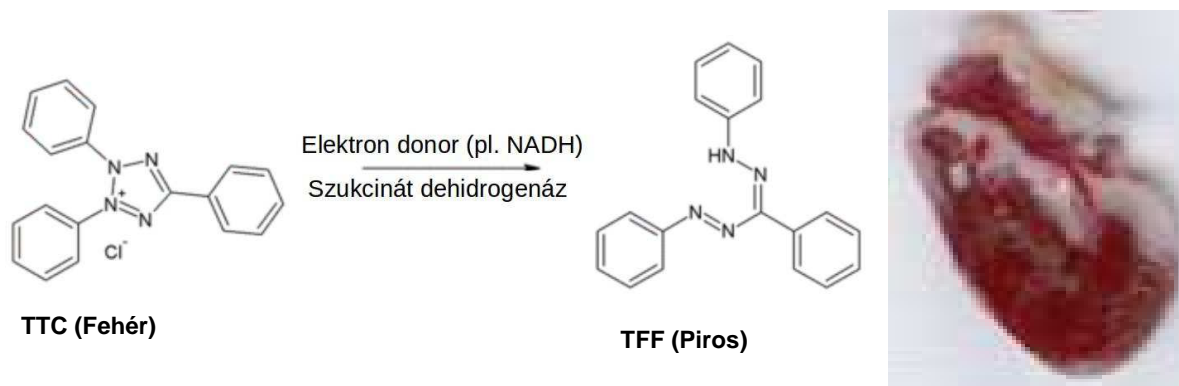
Az izolált szívmokon végzett kísérlet teljes ideje alatt rögzítettük a szívfrekvenciát és a bal kamrai nyomást (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia), valamint a globális iszkémia előtt és a reperfúzió 60. illetve 120. percénél megmértük az aorta ki- és a koronária átáramlást.

Az infarktusos terület méretének meghatározása

Az idő-függés vizsgálatakor – a 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) szívének igen rossz nyugalmi funkcionális paraméterei miatt – a szíveket nem tettük ki globális iszkémiának és reperfúzióknak, hanem a nyugalmi hemodinamikai mérés után egyből

feldolgoztuk az infarktusz terület meghatározása érdekében. A meggy-mag-kivonat hatásának vizsgálatakor viszont a nyugalmi funkcionális paraméterek lemerése után 30 perc globális iszkémia és 120 perc reperfüzió következett, és ezután határoztuk meg az infarktusz terület nagyságát.

Az izolált szívizmon végzett méréseket követően 100 ml, foszfát pufferben (Na_2HPO_4 88mM, NaH_2PO_4 1.8 mM) oldott 1%-os trifenil-tetrazolium klorid oldatot (TTC) juttattunk az aorta kanülbe. A fehér színű TTC élő szövetben, az ott található dehidrogenáz enzimek révén redukálódik és sötétpiros színű trifenil-formazánná (TFF) alakul. Az elhalt területeken a TTC nem alakul át, ezért a terület fehérre festődik (2. ábra). A módszert kiterjedten alkalmazzák szívizom infarktus post-mortem kimutatására [51-53]. A TTC beadását követően a szíveket -70 °C-ra fagyasztottuk a későbbi feldolgozás céljából.



2. ábra A trifenil-tetrazolium klorid teszt során lejárvó molekuláris változás és egy kiterjedt infarktusz területet tartalmazó szívizomszelet képe.

A fagyasztott szívizommintákat a transzverzális síkban, az apiko-bazális tengellyel párhuzamosan, 2-3 mm-es szeletekre vágjuk [54]. A szeleteket lemértük, szárítottuk, majd két üveglap közé helyezve Hewlett-Packard Scanjet 5p lapszkennelvel (Hewlett-Packard, Palo-Alto, California, USA) szkenneltük. NIH 1.61 képfeldolgozó szoftver (Hewlett-Packard, Palo-Alto, California, USA) segítségével minden szeletnél azonos mértékű háttér-kivonást, fény- és kontraszt erősítést végeztünk az infarktusz terület jobb elkülöníthetősége érdekében. Számítógépes planimetriás szoftver segítségével a metszeteken az infarktusz területeket körberajzoltuk és (pixel denzitás elven) az infarktusz területek méretét meghatároztuk [55]. Az adott szív egyes szeletei tömegének és területének, valamint az infarktusz szívizom területek ismeretében kiszámoltuk a szívizom teljes tömegét (rizikó zóna) és az infarktusz szívizom tömegét (infarktusz zóna). Az infarktusz terület nagyságát az infarktusz zóna rizikó zónára vonatkoztatott százalékában fejeztük ki.

Az ateroszklerotikus léziók analízise

Az aortában látható zsíros csíkok kvantifikációját Sudan III festékkel végeztük. A torakális aortát kipreparáltuk, a környező kötőszövetet és zsírszövetet leválasztottuk. Az így nyert mintákat módosított Krebs-Henseleit pufferben mostuk, majd 10 v/v %-os formalin pufferben fixáltuk. Az ereket hosszában felvágtuk, majd 37 °C fokos vízfürdőben 5 mg/ml töménységű Sudan III-at tartalmazó, 70 v/v %-os izopropanolollal 15 percig inkubáltuk. Ezt követően 70%-os izopropanolollal többszöri öblítést végeztünk a felesleges festék eltávolítása céljából. Az így előkészített artériákat üveglemezek közé helyezve, számítógépes technikával meghatároztuk az ateroszklerotikus plakkok kiterjedtségét (azok teljes érfelszínre vonatkoztatott százalékát) [55].

Citokróm c oxidáz (COX) aktivitás mérése

A nyúl miokardium citokróm c oxidáz aktivitásának mérésére kolorimetriás assay kit-et használtunk. MITOISO1 kittel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) frissen kivett szívizomból mitokondriumokat izoláltunk. A mitokondriumokat dithiothreitollal kezeltük a citokróm c redukálása végett, melyet COX mediálta reoxidáció követett. A COX aktivitás mérését szobahőmérsékleten végeztük. Az aktivitást a ferrocitokróm c abszorbancia csökkenésével jellemeztük, mely a redukált formából oxidáltba való alakulásakor következik be 550 nm-es fénytartományban (UV Helios Alpha S2 spectrophotometer; UNICAM, Budapest, Magyarország). A COX aktivitást $-\Delta A_{550}/\text{min}$ formában fejeztük ki.

Western blot analízis

A szívizom mintákat (100 μg) Clontech extrakciós pufferban homogenizáltuk, majd azonos mennyiségű sodium dodecyl sulfate (SDS) puffer hozzáadását követően 10 percig forraltuk. Ezt követően a fehérjéket 12% SDS polyacrylamide gélen (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 m/v % SDS, pH 8.3) 120 V-tal futtattuk. Molekula standardnak 6 μl Precision plus Protein Kaleidoscope standards (Bio-Rad Laboratories, California, USA) készítményt használtunk. A gél nitrocellulóz membránra helyeztük (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), a szétválasztott fehérjéket a 100 V feszültség alkalmazásával a membránra juttattuk és 1 órán át transzfer pufferban (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 v/v % methanol, pH 8.3) állni hagytuk. A membránt 1,5 órás TBS-T kezeléssel blokkoltuk (0.1 v/v %-os Tween-20 és 5 m/v %-os

zsírmentes tejporthoz tartalmazó Tris-puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5)), majd 4°C-on egy éjszakán át a kiválasztott primer antitestekkel (HO-1, VEGF, COX III), valamint „housekeeping” fehérjék elleni antitestekkel - COX IV (Citokróm C oxidáz IV) és GAPDH (Glyceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) - inkubáltuk. A membránokat 3 alkalommal történő TBS-T mosás után 2 órán át 1 m/v %-os zsírmentes tejporthoz tartalmazó TBS-T-ben lévő 1:2000 hígítású torma-peroxidázzal konjugált szekunder antitestekkel inkubáltuk. Sötétszobában HRP szubsztrátot pipetázva a membránokra, a fluoreszcenciát - különböző előhívási időket alkalmazva - fényérzékeny film (Medical X-Ray Film, Agfa-Gevaert N.V., Belgium) segítségével detektáltuk. A koncentrációmérés ellenőrzése céljából bemérési kontrollnak kétféle háztartási fehérjét, GAPDH-t (citoplazma) és a COX IV-t (mitokondrium) használtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Abcam Inc. Cambridge, UK). A szkennelt Western blot minták HO-1 VEGF, COX III, COX IV, és GAPDH fehérje tartalmának szemikvantitatív analízisét Scion for Windows Densitometry Image program Alpha 4.0.3.2 verziójával (Scion Corporation, Maryland, USA) végeztük el. Az egyes fehérjéknek megfelelő csíkok jelintenzitását megbecsültük és önkényes mértékegységben fejeztük ki. A fentebb említett programot a fehérjék mennyiségének mérésére a legkedvezőbb költség-hatékonysági mutató miatt választottuk. A szoftver az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete által rutinszerűen alkalmazott képalkotó program változata, mely mindenki számára letölthető a www.scioncorp.com oldalról.

Statisztika

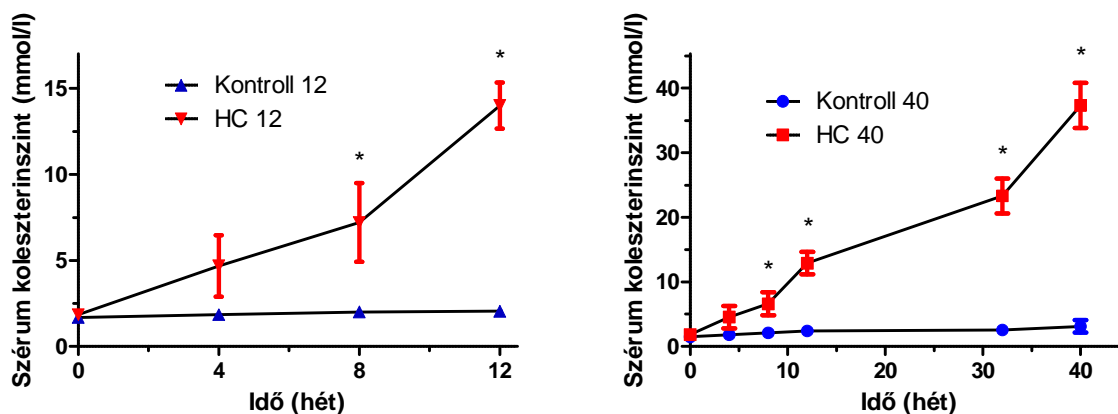
Az eredményeket számtani közép \pm SD vagy számtani közép \pm SEM formában adtuk meg. Először egyutas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk az egyes csoportok átlagértékeinek összehasonlítására. Ha a csoportok közötti különbség szignifikáns volt, az egyes csoportokat Tukey teszttel hasonlítottuk össze. A különbséget $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

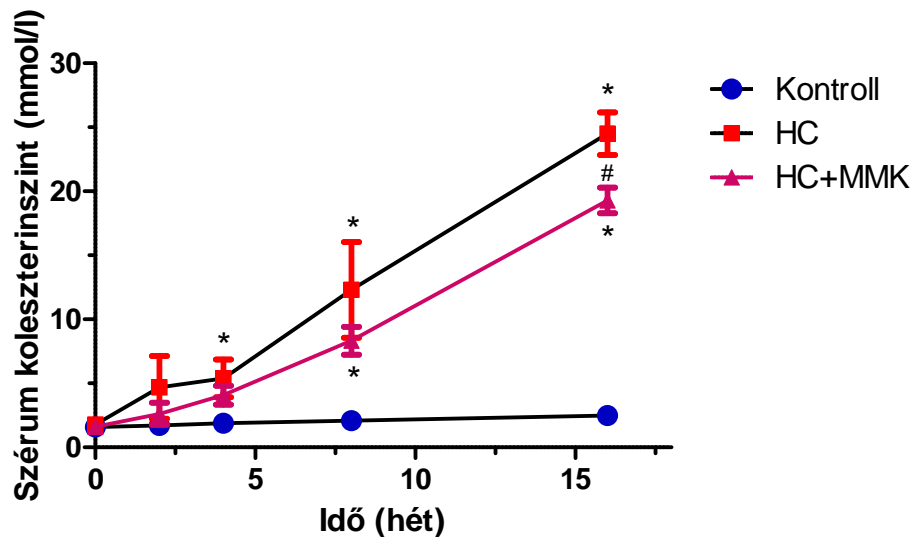
Mivel a disszertáció alapját képező két kísérlet elrendezése igen hasonló volt és a kapott eredmények – egymást erősítve – részben átfedtek, a két vizsgálat eredményeit párhuzamosan mutatom be.

Szérum koleszterinszint változásai

A táplálékkal bevitt koleszterin mindkét kísérleti elrendezésben folyamatosan növelte a szérum koleszterinszintet, míg a koleszterinmentes táppal etetett állatok koleszterinszintje nem változott (3. és 4. ábra). Az idő-függés vizsgálatban a 8. héttől, a meggyimag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben a 4. héttől kezdődően a koleszterindús táppal etetett nyulak koleszterinszintje szignifikánsan magasabb volt a normál táppal etetett nyulakénál. A meggyimag-kivonattal kezelt (HC+MMK) állatok koleszterinszintje a 8. héttől kezdődően szignifikánsan magasabb volt a normál táppal etetett nyulakénál, a 16. héten pedig szignifikánsabb alacsonyabbnak bizonyult a csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatokéhoz képest (4. ábra).



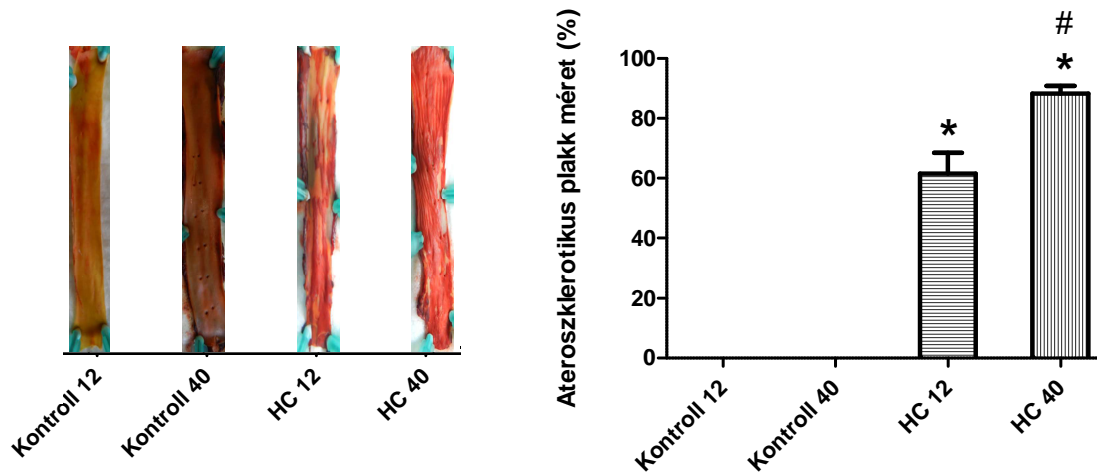
3. ábra. A koleszterindús táplálás hatása a szérum koleszterinszintre az idő-függés vizsgálata során nyúl modellen. A koleszterindús táppal etetett állatok (HC 12 és HC 40 csoportok, az értékek közötti nagy átfedés miatt 1 görbével ábrázolva) szérum koleszterinszintje a 8. héttől szignifikánsan meghaladta a kontroll állatokét (Kontroll 12 és Kontroll 40 csoportok, az értékek közötti nagy átfedés miatt 1 görbével ábrázolva) (*: $p < 0.05$).



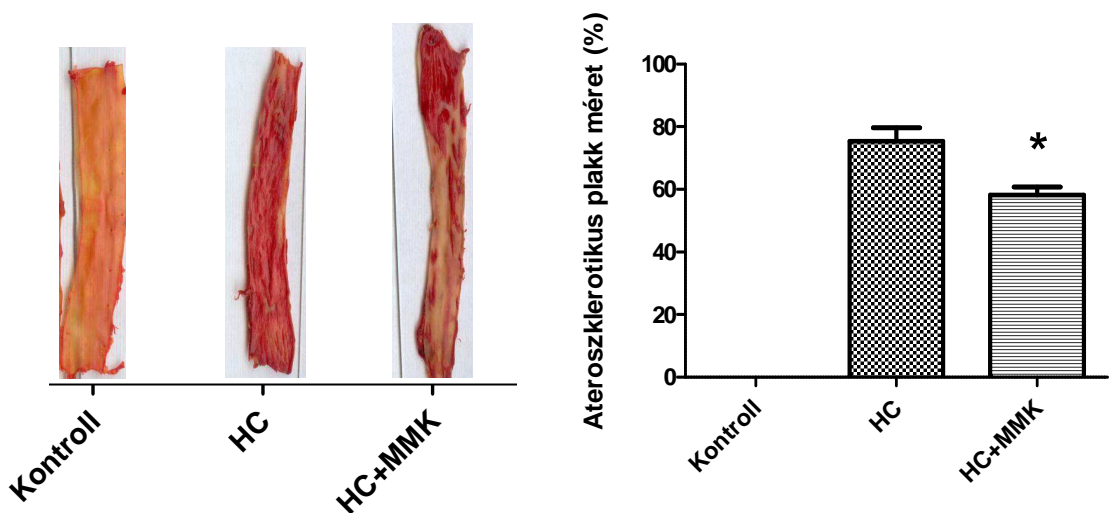
4. ábra. A meggy-mag-kivonat hatása a szérumban a koleszterinszintre koleszterindús táppal etetett nyulakon. A koleszterin dús táppal etetett állatok (HC) koleszterinszintje a 4. héttől, a meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok (HC+MMK) koleszterinszintje a 8. héttől szignifikánsan meghaladta a kontroll állatokét (*: $p < 0.05$). A meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok (HC+MMK) szérumban a koleszterinszintje a 16. hétre szignifikánsan alatta maradt a csak koleszterindús táppal etetett állatokénak (HC csoport) (#: $p < 0.05$).

A torakális aortában észlehető ateroszklerotikus plakkok kiterjedtsége

Mindkét vizsgálatban a koleszterindús táppal etetett állatok torakális aortájában erőteljes ateroszklerotikus plakk képződés volt megfigyelhető. Az idő-függési vizsgálat eredményei szerint a hosszabb ideig tartó koleszterindús táplálás szignifikánsan növelte a plakkok kiterjedtségét (5. ábra). A meggy-mag-kivonat hozzáadása a koleszterindús táphoz (HC+MMK csoport) ugyanakkor szignifikáns mértékben csökkentette az ateroszklerotikus plakkok kiterjedését a nyulak aortájában a csak koleszterindús tápot kapó állatokéhoz képest (HC csoport) (6. ábra). A normál táppal etetett nyulak torakális aortájában nem mutatkozott ateroszklerózis.



5. ábra. A torakális aorta ateroszklerotikus elváltozásainak előrehaladása. Az ábra bal oldalán a torakális aorta Sudan III festésű ateroszklerotikus plakkjainak kiterjedtsége látható egy-egy reprezentatív képen, míg a jobb oldalon a plakkok kiterjedtségének a teljes érfelszínre vonatkoztatott százalékát tüntettük fel az egyes csoportokban. A koleszterindús táppal etetett csoportok (HC 12 és HC 40) plakkjainak kiterjedése szignifikánsan meghaladta a nekik megfelelő kontroll értéket (Kontroll 12 és Kontroll 40) (*: $p < 0.05$). A koleszterindús táppal 40 hétig etetett állatok (HC 40) plakkjainak kiterjedése szignifikánsan nagyobb volt, mint a 12 hétig etetett állatoké (HC 12) (#: $p < 0.05$).



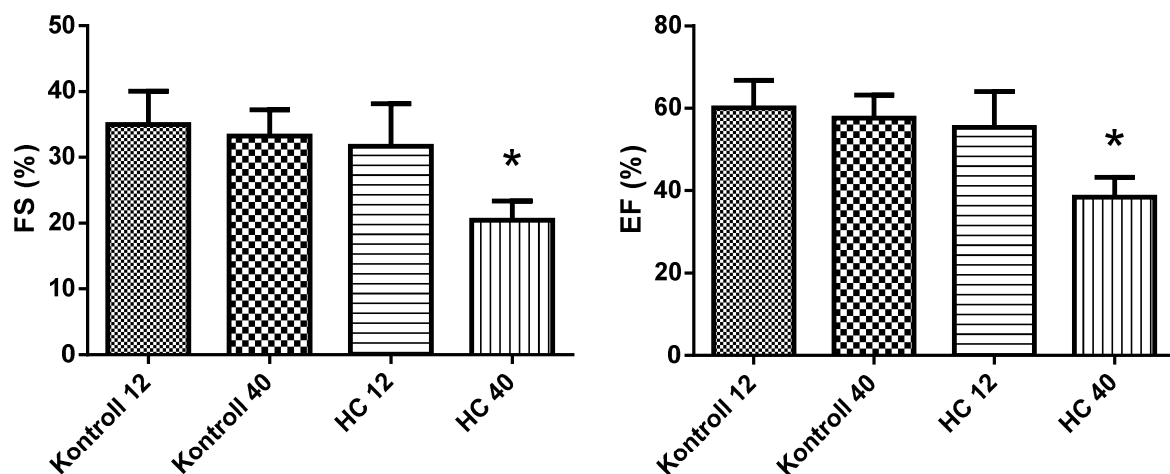
6. ábra. A torakális aorta ateroszklerotikus plakkjainak alakulása a különböző, táplálékkal felvett anyagok hatására. Az ábra bal oldalán a torakális aorta Sudan III festésű ateroszklerotikus plakkjainak kiterjedtsége látható egy-egy reprezentatív képen, míg a jobb oldalon a plakkok kiterjedtségének a teljes érfelszínre vonatkoztatott százalékát tüntettük fel az egyes csoportokban. A meggy-mag-kivonattal is kezelt állatok (HC+MMK)

ateroszklerotikus plakkjainak kiterjedése szignifikáns alatta maradt a csak koleszterindús táppal etetett állatokénak (HC) (*: $p < 0.05$).

Echokardiográfia

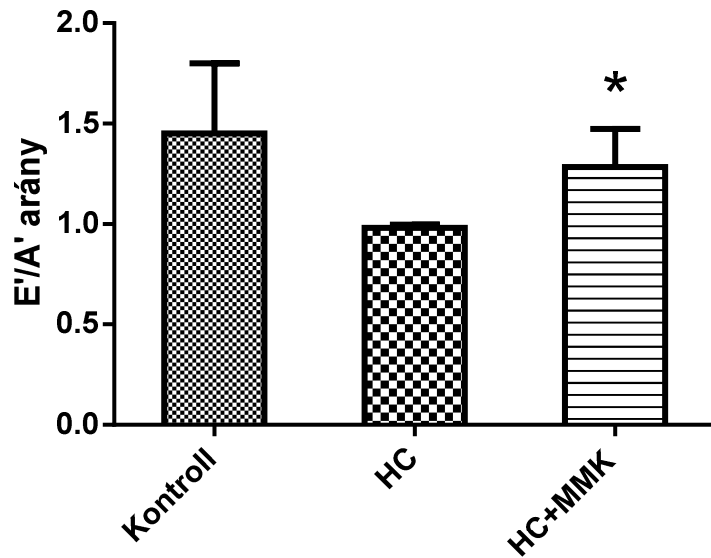
Az idő-függési vizsgálatban jelentős eltéréseket észleltünk a bal kamra funkcionális paramétereiben, melyek a bal kamra szisztolés ürülését jellemzik (frakcionális rövidülés, ejekciós frakció). A koleszterindús táppal hosszán etetett (HC 40) állatok frakcionális rövidülése és ejekciós frakciója szignifikánsan alacsonyabb volt, mind a normál táppal etetett (Kontroll 40), mind a koleszterindús táppal rövid ideig (HC 12) etetett állatok értékeihez képest (7. ábra), egyéb paraméterekben szignifikáns eltérést nem észleltünk (1. táblázat)

A meggy-mag-kivonat hatásának vizsgálata során, ami csak 16 hétig követte az állatok sorsát, nem észleltünk szignifikáns eltérést a szisztolés paraméterekben és az anatómiai méretekben a három csoport között. A szöveti Dopplerrel mért E'/A' érték (a kora diasztolés és késő diasztolés sebességek hányadosa, ami a diasztolés funkciót jellemzi) a normál táppal etetett (Kontroll) és a meggy-mag-kivonatot is kapó (HC+MMK) állatoknál nagyobb volt, mint 1, míg a csak koleszterindús táppal etetett állatoknál (HC) 1-nél kisebb arányt mértünk (8. ábra). A kontroll állatok (Kontroll) és a meggy-mag-kivonatot tartalmazó koleszterindús táppal ellátott (HC+MMK) állatok értékei között szignifikáns különbséget nem észleltünk. A csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatok E'/A' értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a másik két csoporthoz (Kontroll, HC+MMK) képest.



7. ábra. A koleszterindús étrend idő-függő hatása a bal kamra funkcionális paramétereire. A frakcionális rövidülés (FS) és az ejekciós frakció (EF) szignifikánsan kisebb a hosszú

alimentáris koleszterin bevitelnek kitett állatok (HC 40) esetében a többi csoporthoz (Kontroll 12, Kontrol 40, HC 12) képest (*: $p < 0.05$).



8. ábra. Az E'/A' diasztolés paraméter alakulása a különböző csoportokban. A meggyógyított állatok (HC+MMK) E'/A' értékei szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a csak koleszterindús tápot kapó állatok (HC) értékei (*: $p < 0.05$).

A

Kontroll 12					
	Átlag±1SD	Minimum	Maximum	Referencia tartomány*	Variációs koefficiens (%)
FS (%)	34,97±5,09	25,77	44,44	17,63 to 40,16	14,54
EF (%)	60,08±6,71	47,13	71,76	42,42 to 75,65	11,17
IVSTD (mm)	2,81±1,06	1,92	4,99	2,11 to 2,82	37,81
IVSTS (mm)	4,31±0,70	3,23	5,63	2,98 to 5,92	16,27
LVEDD (mm)	17,07±1,57	14,84	19,38	13,59 to 17,89	9,22
LVESD (mm)	11,09±1,17	8,95	12,93	8,51 to 13,63	10,57
PWTD (mm)	3,10±1,00	0,81	4,61	1,89 to 3,63	32,33
PWTS (mm)	4,82±1,17	2,93	6,42	2,50 to 5,43	24,35
LV mass (mg)	7532±1707	3232	9911	na	22,67

Kontroll 40					
	Átlag±1SD	Minimum	Maximum	Referencia tartomány*	Variációs koefficiens (%)
FS (%)	33,21±4,04	28,07	40,61	17,63 to 40,16	12,15
EF (%)	57,63±5,64	50,03	68,15	42,42 to 75,65	9,78
IVSTD (mm)	2,47±0,51	1,86	3,89	2,11 to 2,82	20,55
IVSTS (mm)	4,08±0,74	3,05	5,47	2,98 to 5,92	18,17
LVEDD (mm)	19,09±3,85	12,83	25,95	13,59 to 17,89	20,18
LVESD (mm)	12,84±3,06	7,62	18,49	8,51 to 13,63	23,83
PWTD (mm)	3,18±1,03	0,6	4,96	1,89 to 3,63	32,3
PWTS (mm)	4,57±1,46	2,91	8,4	2,50 to 5,43	31,93
LV mass (mg)	8876±2658	4968	15539	na	29,95

HC 12

	Átlag±1SD	Minimum	Maximum	Referencia tartomány*	Variációs koefficiens (%)
FS (%)	31,67±6,46	24,2	45,35	na	20,4
EF (%)	55,38±8,71	44,75	73,35	na	15,72
IVSTD (mm)	2,39±0,58	1,39	3,45	na	24,16
IVSTS (mm)	3,72±1,01	1,91	5,92	na	27,19
LVEDD (mm)	17,58±2,11	14,11	20,5	na	11,99
LVESD (mm)	12,04±2,07	7,71	14,22	na	17,14
PWTD (mm)	3,2±1,18	1,56	5,57	na	36,9
PWTS (mm)	4,28±1,16	2,71	6,86	na	27,21
LV mass (mg)	7571±2545	3312	10738	na	33,62

HC 40

	Átlag±1SD	Minimum	Maximum	Referencia tartomány*	Variációs koefficiens (%)
FS (%)	20,44±2,95	17,58	24,55	na	14,41
EF (%)	38,45±4,80	33,6	45,22	na	12,48
IVSTD (mm)	2,99±0,70	2,17	4,3	na	23,49
IVSTS (mm)	3,84±0,89	2,32	5,24	na	23,15
LVEDD (mm)	18,27±1,94	15,62	21,61	na	10,6
LVESD (mm)	14,52±1,48	12,86	17,35	na	10,17
PWTD (mm)	3,39±1,24	0,86	5,18	na	36,46
PWTS (mm)	4,59±1,44	1,9	6,76	na	31,5
LV mass (mg)	9639±3313	2838	14147	na	34,37

B

	Kontroll 12	Kontroll 40	HC 12	HC 40
FS (%)	34,97 ± 5,09	33,21 ± 4,04	31,67 ± 6,46	20,44 ± 2,95
EF (%)	60,08 ± 6,71	57,63 ± 5,64	55,38 ± 8,71	38,45 ± 4,80
IVSTD (mm)	2,81 ± 1,06	2,47 ± 0,51	2,39 ± 0,58	2,99 ± 0,70
IVSTS (mm)	4,31 ± 0,70	4,08 ± 0,74	3,72 ± 1,01	3,84 ± 0,89
LVEDD (mm)	17,07 ± 1,57	19,09 ± 3,85	17,58 ± 2,11	18,27 ± 1,94
LVESD (mm)	11,09 ± 1,17	12,84 ± 3,06	12,04 ± 2,07	14,52 ± 1,48
PWTD (mm)	3,10 ± 1,00	3,18 ± 1,03	3,2 ± 1,18	3,39 ± 1,24
PWTS (mm)	4,82 ± 1,17	4,57 ± 1,46	4,28 ± 1,16	4,59 ± 1,44
LV mass (mg)	7532 ± 1707	8876 ± 2658	7571 ± 2545	9639 ± 3313

1. táblázat A: Az idő-függési vizsgálatban végzett szívultrahangos mérések eredményei.

* egészséges New Zealand nyulak referencia tartománya [56] Hiperkoleszterinémias állatok esetében referencia tartomány nem meghatározott. B: Az egyes csoportokban mért adatok egymás mellé rendezve.

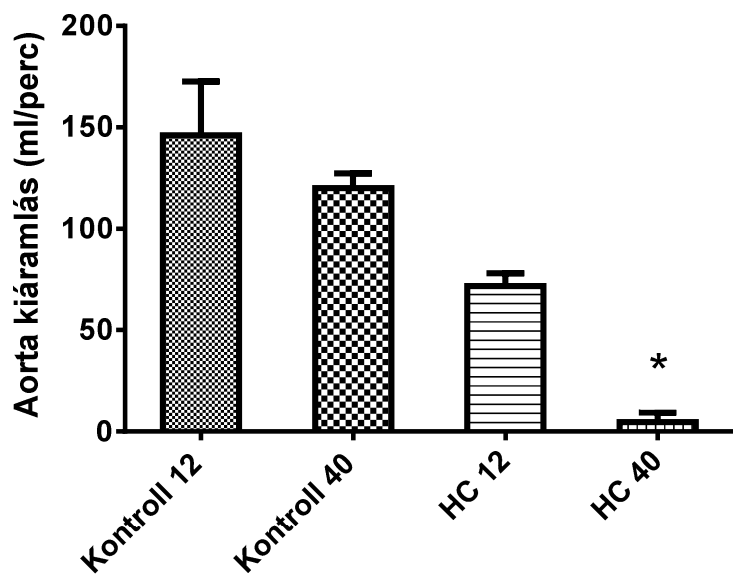
Hemodinamikai mérések

Az izolált szívizom preparátumokon a következő hemodinamikai paramétereket mértük: szívfrekvencia, aorta kiáramlás, koronária átáramlás, a bal kamra által generált nyomás (LVDP). Az idő-függési vizsgálatban, az echokardiográfiásan meghatározott bal kamrai szisztolés funkciós paraméterekkel összhangban, a koleszterindús táppal etetett állatoknál már a nyugalmi aorta kiáramlásban jelentős eltéréseket észleltünk. A hosszú hiperkoleszterinémias állapotot reprezentáló csoportba (HC 40) tartozó szívek az izolálást követően gyakran képtelenek voltak effektív munkát végezni (aorta illetve koronária flow: 0 ml/perc), ezért ebben a kísérletben globális iszkémia provokációt nem végeztünk.

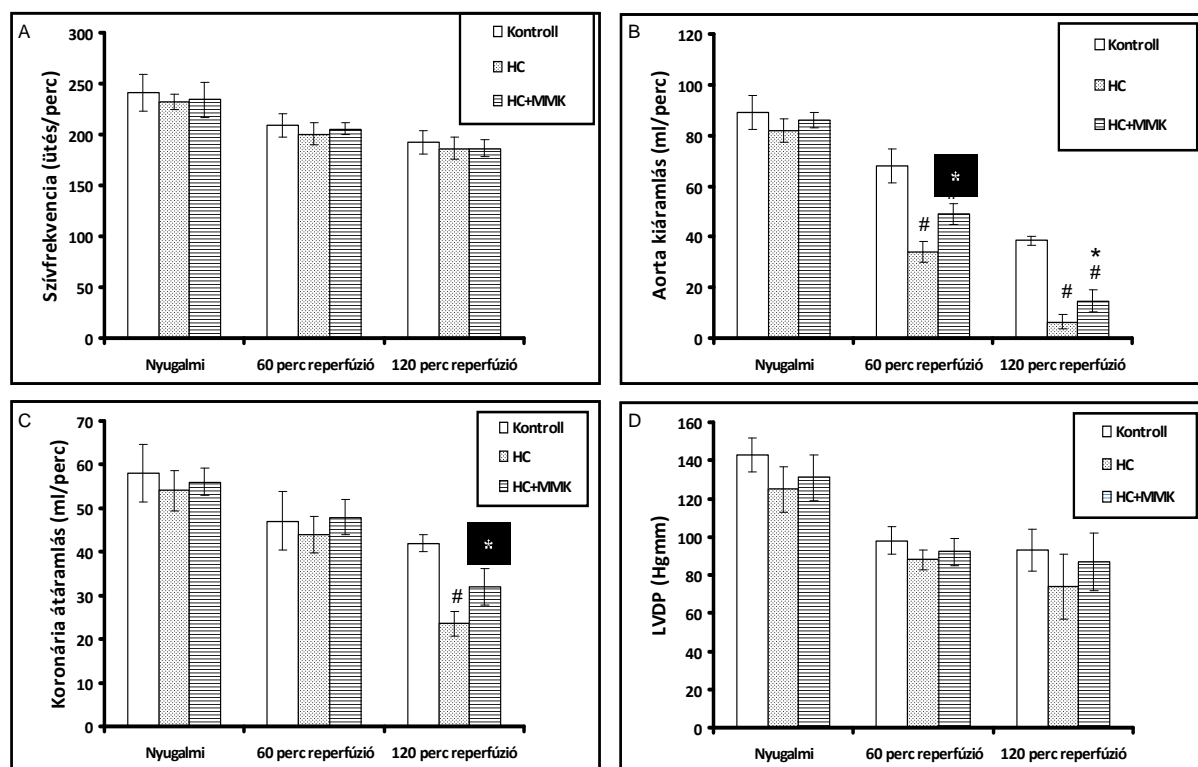
Az idő-függési vizsgálatban a hosszú hiperkoleszterinémias állapot (HC 40) szignifikáns kiáramlás csökkenést eredményezett. Az aorta kiáramlás ebben a csoportban mind a kontroll csoportokénál (Kontroll 12, Kontroll 40), mind a rövidebb hiperkoleszterinémias hatásnak kitett csoporténál (HC 12) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (9. ábra).

A meggyماغ-kivonat hatásának vizsgálatokor a nyugalmi hemodinamikai paraméterekben nem volt szignifikáns különbség a három csoport között. Az iszkémia-reperfúziós provokációt követően minden vizsgált paraméter csökkenést mutatott a kiindulási értékekhez képest. Az aorta kiáramlás mind a 60., mind a 120. perc reperfúzió után szignifikánsan alacsonyabb volt a koleszterindús táppal etetett (HC és HC+MMK) csoportokban a normál táppal etetethez (Kontroll) képest. A meggyماغ-kivonattal kezelt csoportban (HC+MMK) azonban 60 és 120 percnél is szignifikánsan magasabb aorta kiáramlást mértünk a csak koleszterindús tápot kapó csoporthoz (HC) képest.

A koronária átáramlás hasonlóan a többi paraméterhez, a globális iszkémiát követően, mindhárom csoportban, az idő függvényében csökkent. A három csoport értékeiben csak 120 percnél volt szignifikáns különbség megfigyelhető. A Kontroll csoport értékei szignifikánsan magasabbak voltak a koleszterin dús táppal etetett másik két csoporthoz képest (HC és HC+MMK), valamint a meggyماغ-kivonattal kezelt csoport értékei (HC+MMK) szignifikánsabban magasabbak voltak a csak koleszterindús tápot kapó (HC) állatok értékeinél (az aorta kiáramlás vizsgálata során kapott eredményekkel egybevetően) (10. ábra).



9. ábra. A koleszterindús táplálék hatása az izolált szíven mért aorta kiáramlásra. A 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) aorta kiáramlása szignifikánsan kisebb volt, mint az összes többi csoporté (*: $p < 0.05$).



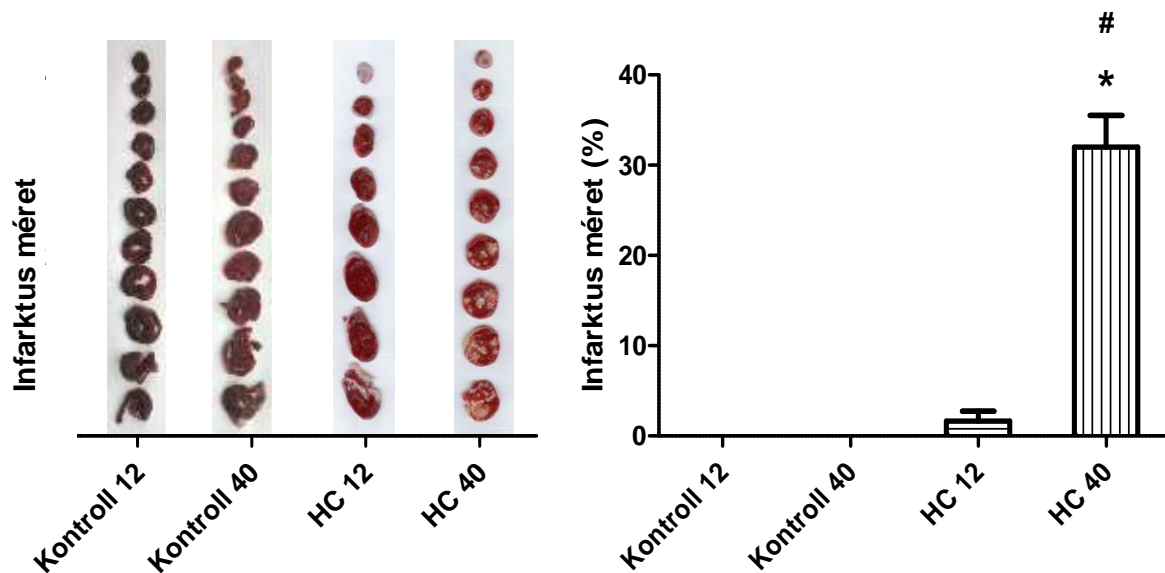
10. ábra. Az izolált nyúl szíveken mért hemodinamikai paraméterek változása iszkémia-reperfüzió hatására. A koleszterindús táppal etetett (HC és HC+MMK) állatok paramétereit hasonlítottuk össze a normál táppal etetett kontroll állatokéival (#: $p < 0.05$), illetve a

meggyماغ-kivonattal kezelt állatok paramétereit (HC+MMK) a csak koleszterindús táppal etetett nyulak paramétereivel (HC) (*: $p < 0.05$).

Az infarktusos területek mérete

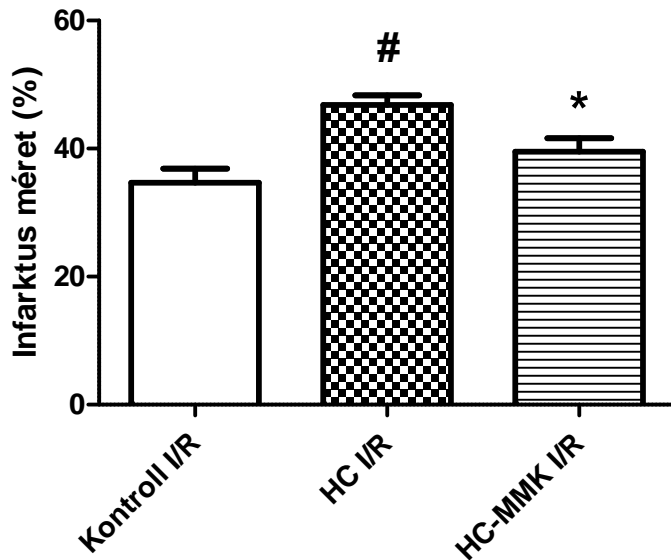
Az idő-függés vizsgálata során a 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) szívében szignifikánsabb nagyobb infarcerált területet kaptunk, mint a koleszterindús tápot csak 12 hétig kapó állatoknál (HC 12) illetve a 40 hétig normál táppal etetett állatok (Kontroll 40) esetében (11. ábra). Megjegyzendő, hogy a koleszterindús táppal 40 hétig etetett állatok (HC 40) szíveiben az infarktusos szövet foltos-csíkos mintázatot mutatott (vagyis nem alkotott egyetlen összefüggő részt), melyet mint teljes infarcerált régiót (Total Infarcted Region) határoztunk meg.

A meggyماغ-kivonat hatását vizsgáló kísérletek során a globális iszkémiát követő 120 perc reperfüzió után szignifikánsan nagyobb infarktusos területet kaptunk a csak koleszterindús táppal etetett (HC) állatoknál, mint a normál táppal etetett állatok (Kontroll) esetében. A meggyماغ-kivonattal kezelt állatok (HC-MMK) esetében viszont az infarktusos terület szignifikánsan kisebb volt a csak koleszterindús táppal etetett állatokhoz (HC) képest (12. ábra), sőt a HC-MMK csoport nem különbözött szignifikánsan a Kontroll csoporttól.



11. ábra. Az infarktusos terület idő-függő változása alimentáris hiperkoleszterinémiában. Az ábra bal oldalán az egyes csoportokból egy-egy reprezentatív keresztmetszet sor látható, míg a jobb oldalon a TTC festéssel post mortem kimutatott infarktusos területek nagyságát tüntettük fel a teljes szívizom tömeg százalékában. A 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC

40) infarktos területe szignifikánsan meghaladta mind a 40 hétig normál táppal etetett állatok (Kontroll 40) (*: $p < 0.05$), mind a 12 hétig koleszterindús tápot kapó állatok (HC 12) infarktos területét (#: $p < 0.05$).

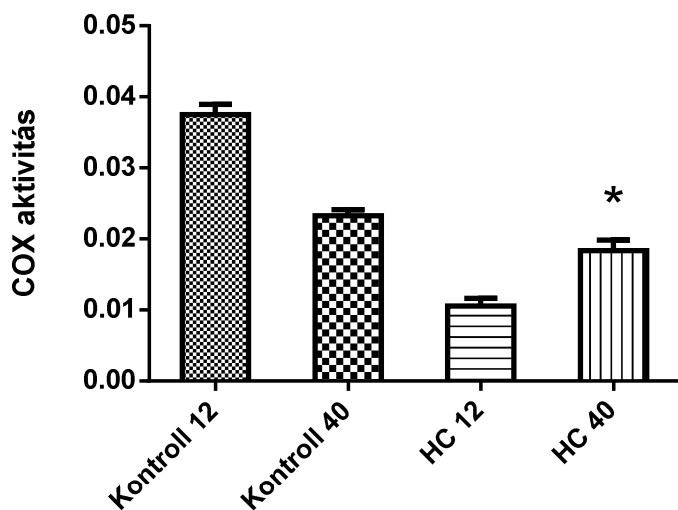


12. ábra. A 30 perc globális iszkémia és 120 perc reperfúzió után TTC-vel kimutatott infarktos terület százalékos aránya a meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben. A csak koleszterindús tápot kapó csoportban (HC I/R) szignifikánsan nagyobb infarktos terület volt mérhető a normál táppal etetett csoporthoz képest (Kontroll I/R) (#: $p < 0.05$). A meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett csoportban (HC+MMK I/R) ugyanakkor szignifikánsan kisebb infarktos területet mértünk a csak koleszterindús táppal etetett csoporttól (HC I/R) (*: $p < 0.05$).

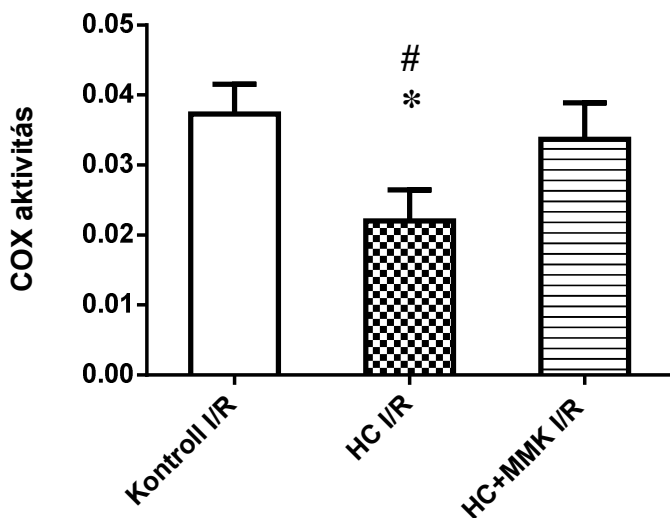
A citokróm c oxidáz (COX) aktivitás

Az idő-függési vizsgálatban a citokróm c oxidáz (COX) aktivitás a koleszterindús táppal etetett (HC 12, HC 40) állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a normál diétán tartott (Kontroll 12, Kontroll 40) állatokhoz képest. A 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) COX aktivitása viszont szignifikánsan magasabb volt, mint a 12 hétig etetett (HC 12) állatoké (13. ábra).

A meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben az iszkémia-reperfúziót követően történtek a mérések. A csak koleszterindús táppal etetett állatok esetén szignifikánsan alacsonyabb COX aktivitást mértünk mind a normál táppal etetett, mind a meggy-mag-kivonattal is kezelt állatokhoz képest (14. ábra).



13. ábra. A COX aktivitás idő-függése a normál és koleszterindús táppal etetett csoportokban. A 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 40) szívizmában mért COX aktivitás szignifikáns nagyobb volt, mint a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatoké (HC 12) (*: $p < 0.05$).



14. ábra. A COX aktivitás az iszkémia-reperfúziót (I/R) követően a különböző csoportokban. A csak koleszterindús táppal etetett állatok (HC I/R) COX aktivitása szignifikánsan kisebb volt, mint akár a normál táppal etetett állatoké (Kontroll I/R) (#: $p < 0.05$), akár a meggyógyítottakat is kapó állatoké (HC+MMK I/R) (*: $p < 0.05$).

A szívizomban mérhető COX III, HO-1 és VEGF fehérjék mennyisége

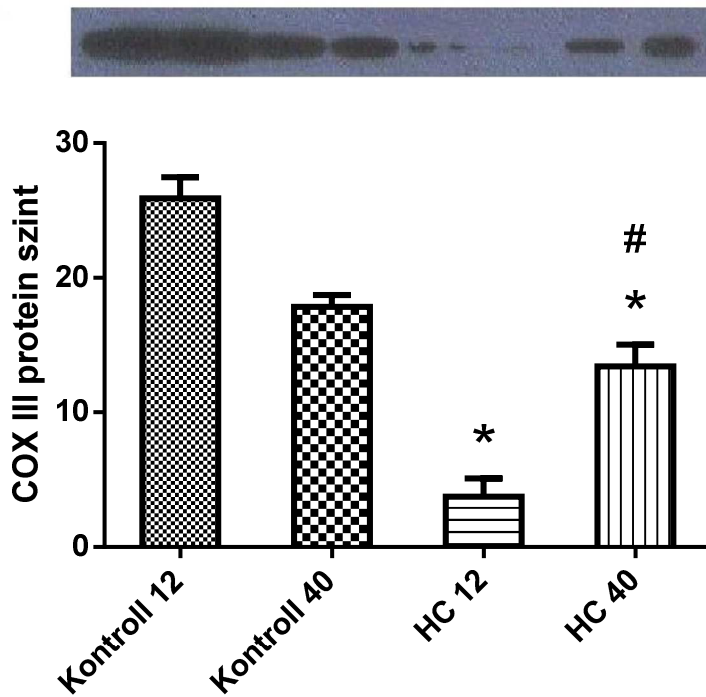
A COX III, a hem oxigenáz-1 (HO-1) és a vascular endothelial growth factor (VEGF) fehérjék mennyiségét Western blot technikával határoztuk meg a szívizomokban.

A COX III mennyisége az idő-függési vizsgálatban a COX aktivitással egyező mintát mutatott, a 40 hétig koleszterindús táppal etetett állatokban (HC 40) szignifikánsan magasabb mennyiséget mértünk, mint a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatok (HC 12) szívében.

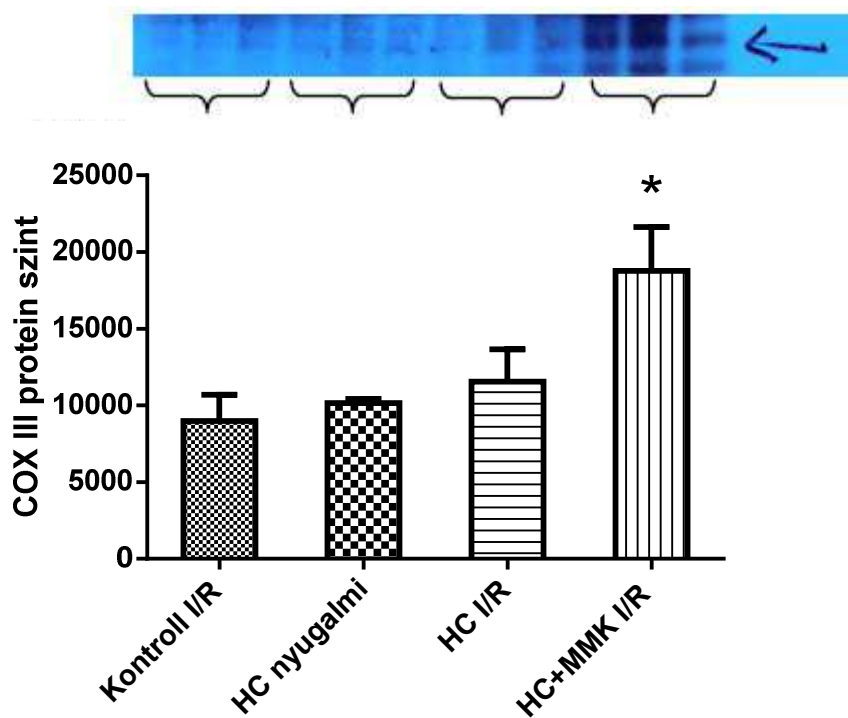
A meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló kísérlet során az iszkémia-reperfúzió átesett szívek között a meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús tápot kapó csoportban (HC+MMK I/R) szignifikánsabban magasabb COX III mennyiséget mértünk, mint a többi csoportban.

A HO-1 mennyisége az idő-függési vizsgálatban a koleszterindús táppal etetett állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a normál táppal etetett állatokban, ezen túl a 40 hétig koleszterindús tápot kapó csoportban (HC 40) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a koleszterindús tápot csak 12 hétig kapó (HC 12) csoportban. A meggy-mag-kivonat vizsgálata során a koleszterindús táppal etetett állatok (HC nyugalmi, HC I/R, HC+MMK I/R) szívében a kontrollhoz képest alacsonyabb HO-1 mennyiség volt mérhető. A meggy-mag-kivonattal kezelt koleszterindús táppal etetett állatok szívében az iszkémia-reperfúziót követően (HC+MMK I/R) szignifikánsan magasabb HO-1 mennyiséget mértünk, mint a csak koleszterindús táppal etetett állatok (HC I/R) iszkémia-reperfúzió átesett szívében.

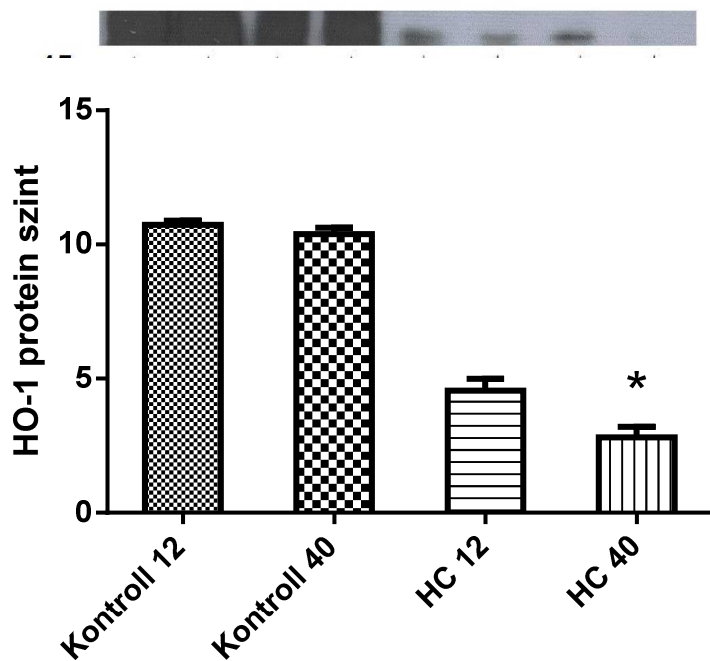
A VEGF mennyiségében sem az idő-függési, sem a meggy-mag-kivonat hatását felmérő vizsgálatban nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között.



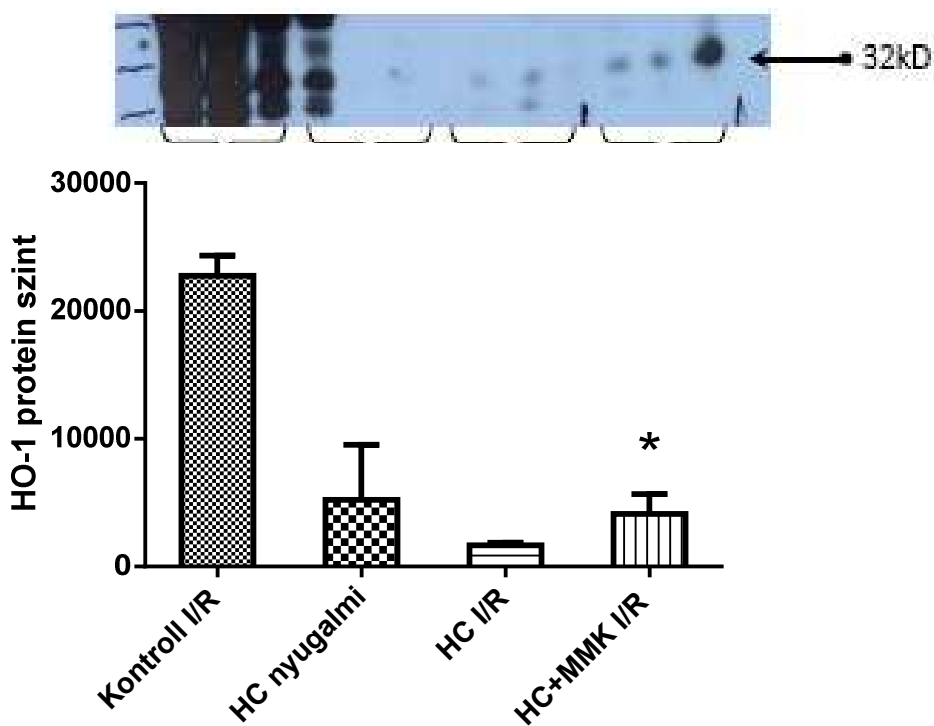
15. ábra. A COX III protein mennyisége 12, illetve 40 hétig normál (Kontroll 12, Kontroll 40), valamint koleszterindús táppal etetett (HC 12, HC 40) nyulak miokardiumában. A koleszterindús diétán tartott csoportok COX III szintje szignifikánsan alatta maradt a normál táppal etetett csoportok értékeinek (*: $p < 0.05$). A HC 40 csoportból származó minták COX III tartalma ugyanakkor szignifikáns meghaladta a HC 12 csoport mintáinak COX III tartalmát (#: $p < 0.05$).



16. ábra. A COX III mennyisége csak koleszterindús táppal etetett állatok szívében iszkémia-reperfúziós provokáció nélkül (HC nyugalmi) illetve iszkémia-reperfúzió (I/R) után (HC I/R), továbbá normál illetve meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús tápot kapó állatok szívében iszkémia-reperfúzió után (Kontroll I/R illetve HC+MMK I/R). A COX III mennyisége a meggy-mag-kivonattal kiegészített koleszterindús táppal etetett csoportban (HC+MMK I/R) szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak koleszterindús táppal etetett csoportban (HC I/R) (*: $p < 0.05$).

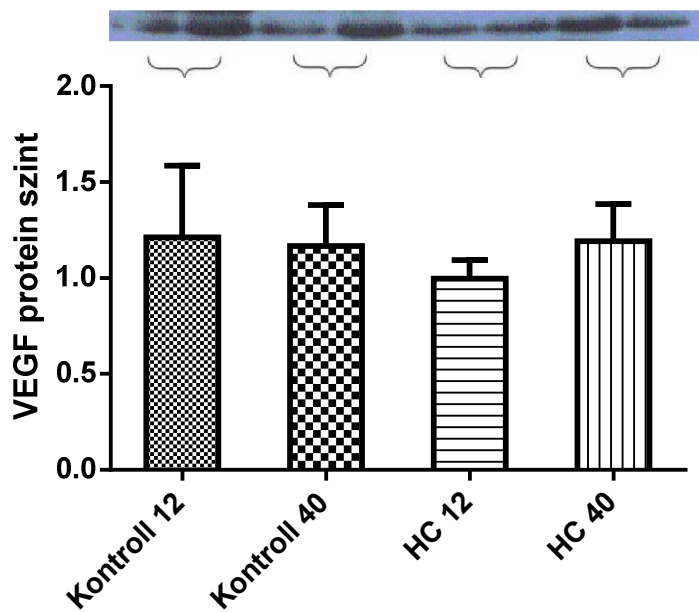


17. ábra. A HO-1 mennyisége normál táppal 12 és 40 hétig (Kontroll 12, Kontroll 40), illetve koleszterindús táppal 12 és 40 hétig (HC 12, HC 40) etetett nyulak szívében. A HC 40 csoportban mért HO-1 mennyiség szignifikánsan kisebb, mint a többi csoportban meghatározott HO-1 értékek (*: $p < 0.05$).

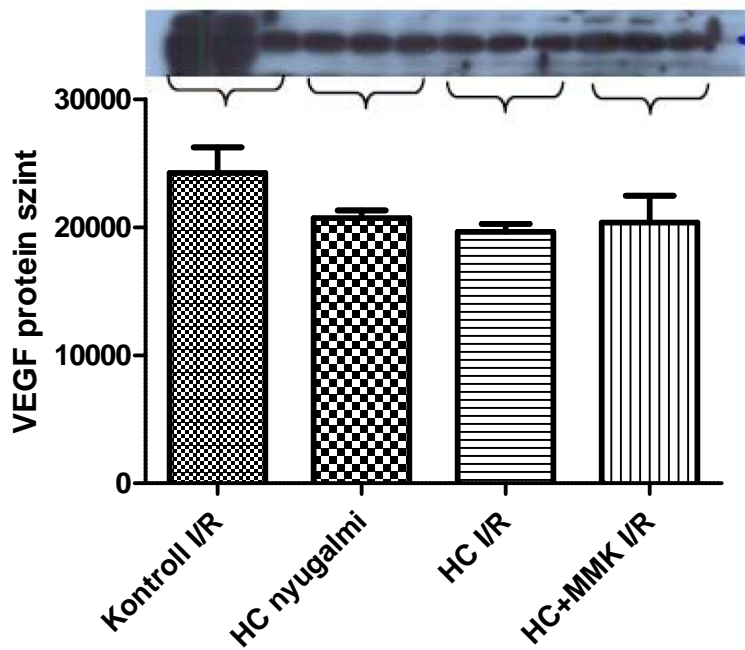


18. ábra. A HO-1 mennyisége csak koleszterindús táppal etetett állatok szívében iszkémia-reperfúziós provokáció nélkül (HC nyugalmi) illetve iszkémia-reperfúzió (I/R) után (HC I/R),

továbbá normál illetve meggyماغ-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok szívében iszkémia-reperfúzió után (Kontroll I/R illetve HC+MMK I/R). A meggyماغ-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok (HC+MMK I/R) szívében a HO-1 mennyisége szignifikánsan meghaladta a csak koleszterindús táppal etetett állatok (HC I/R) szívében mérhető iszkémia-reperfúzió utáni értéket (*: $p < 0.05$).



19. ábra. A VEGF mennyisége normál táppal 12 és 40 hétig (Kontroll 12, Kontroll 40), valamint koleszterindús táppal 12 és 40 hétig (HC 12, HC 40) etetett nyulak szívében. Az egyes csoportok nem különböztek szignifikánsan egymástól.



20. ábra. A VEGF mennyisége csak koleszterindús táppal etetett állatok szívében iszkémia-reperfúziós provokáció nélkül (HC nyugalmi) illetve iszkémia-reperfúzió (I/R) után (HC I/R), továbbá normál illetve meggyماغ-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok szívében iszkémia-reperfúzió után (Kontroll I/R illetve HC+MMK I/R). Az egyes csoportok nem különböztek szignifikánsan egymástól.

MEGBESZÉLÉS

Munkánk során a fokozott alimentáris koleszterin bevitel okozta hiperkoleszterinémia hemodinamikai és szövettani következményeit vizsgáltuk, továbbá a szintén alimentárisan bejutott, bizonyítottan HO-1 induktor hatású meggy-mag-kivonat hatását mértük fel a hiperkoleszterinémia okozta elváltozásokra nyúl állatmodellben.

Szérum koleszterinszint

A vizsgálatainkban alkalmazott, 2% koleszterint tartalmazó táppal *ad libitum* etetett nyulakban hiperkoleszterinémiás állapot alakult ki. A szérum koleszterinszint az eltelt hetekkel párhuzamosan emelkedett. A mmol/l-ben mért szérum koleszterinszintek csaknem megegyeztek az eltelt hetek számával (3. és 4. ábra). A normál $2 \pm 0,5$ mmol/l körüli érték így az idő-függési vizsgálatban a 12 hetes kezelés végére $14 \pm 1,3$ mmol/l-ra, a 40 hetes kezelés végére $37 \pm 3,5$ mmol/l-ra, a meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló 16 hetes kísérlet végére pedig $24 \pm 1,6$ mmol/l-ra emelkedett. A nyúl szervezetére ezzel egy egyre fokozódó hiperkoleszterinémiás teher hárult, melynek következményei az idő előrehaladtával halmozottan jelentkeztek. Ez magyarázza az idő-függési vizsgálatban a HC 12 és HC 40 csoportok közötti szignifikáns különbségeket, valamint a 40. hét után észlelt markáns anatómiai és fiziológiai eltéréseket.

Familiáris hiperkoleszterinémia

A humán gyógyászatban familiáris hiperkoleszterinémiás betegekben mérhetünk a kísérleteinkben előfordulóhoz hasonlóan magas szérum koleszterin értékeket [57], illetve figyelhetünk meg hasonló patológiás elváltozásokat [58, 59]. A primer hiperlipidémiákat a WHO/Fredrickson klasszifikáció alapján osztják különböző csoportokba. Fokozott ateroszklerózis a magas szérum LDL szinttel járó familiáris hiperkoleszterinémiában (II.a) és familiáris kevert hiperlipidémiában (II.b) figyelhető meg. A betegség patomechanizmusa az LDL receptor elégtelen működése, mely miatt az LDL clearance nem megfelelő. A vérben a magas koleszterin tartalmú LDL felhalmozódik, ott szabadgyökök hatására oxidálódik. Az oxidált LDL-t makrofágok veszik fel, melyek az érfalba migrálva (habos sejtek) a T limfocitákkal együtt alkotják az ateroszklerotikus plakk magját. Ennek következtében a betegek szervezetében kiterjedt ateroszklerózis figyelhető meg, mely miatt igen korai életkorban jelentkezik koronária szklerózis, szívizom infarktus (legfiatalabb 2 éves korban),

stroke, perifériás verőér betegség. A homozigóta betegek átlagosan 30-40 éves korukban, valamely érbetegség szövödményében halnak meg. A betegség kezelésében a különböző támadáspontú gyógyszerek kombinációja mellett alkalmaznak monoklonális antitesteket [60], génterápiát [61], a dialízishez hasonló elven működő LDL-aferezist [62], valamint májtranszplantációt is [63, 64].

Az emelkedett szérum koleszterin szint kardiavaszkuláris hatásai

Torakális ateroszklerózis

A torakális aortában kialakult ateroszklerózis a hiperkoleszterinémia makrovaszkuláris szövödményeinek látványos megjelenési formája. A zsigeri erek és az alsóvégtag ereinek szűkítése révén azokban krónikus vérellátási zavart, az oxigénigénytől függő mértékű iszkémiás fájdalmat (és pl. klaudikációt) okoz. A klinikumban egy nem-invazív módszerrel, a boka-kar index használatával ítélni lehet meg a perifériás ateroszklerózis mértékét. A csökkent boka-kar index egyértelmű kardiavaszkuláris rizikófaktor [5], amely mind a hospitalizációval, mind a mortalitással összefüggést mutat.

Kísérleteinkben a normál táppal etetett állatok torakális aortájában ateroszklerotikus plakk nem ábrázolódott. Már 12 és 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés jelentős torakális ateroszklerózist provokált, az aorta plakkok kiterjedése a teljes érfelszín $61 \pm 14\%$ -a és $75 \pm 11\%$ -a volt, mely a normál táppal etetett állatokhoz képest szignifikánsan nagyobbak bizonyult (5. és 6. ábra). A 40. hét végére az ateroszklerotikus léziók progressziója volt megfigyelhető (a teljes érfelszín $88 \pm 5\%$ -a), mely szignifikánsan nagyobb mind a normál, mind a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest.

Miokardiális iszkémia és infarktus

A makrovaszkuláris eltérések mellett súlyos koronária szklerózis következményei is tetten érhetőek voltak vizsgálatainkban.

Az emelkedett koleszterinszint ateroszklerotikus plakkok kialakulásához vezet. Az ateroszklerotikus plakkok a koszorúsereket is szűkítik, ezzel rontják a szívizom vérellátását. Súlyos koszorúsér szűkület esetén a szívizom vérellátása nyugalomban elégséges lehet, de a csökkent véráramlás a terhelésre fokozódó miokardiális oxigénigényt már nem képes kielégíteni. Az oxigén-igény és kínálat egyensúly megbomlásának következtében iszkémiás területek alakulnak ki. Az iszkémiás szívizom működése elégtelenné válik, kezdetben a

diasztolés, később a szisztolés funkció romlása észlelhető. Rövid ideig tartó iszkémia megszűnését követően a szívizom funkciója rendeződik. Rövid repetitív iszkémiás epizódok miokardiális protekcióval bírnak, mely jelenséget prekondicionálásnak nevezünk [65]. Érdekes módon a prekondicionálás hiperkoleszterinémiás állapotban nem működik.

Amennyiben az iszkémia elhúzódóvá válik, a szívizom elhal. Az így kialakult nekrotikus szövet mennyisége az ellátott terület nagyságától és az oxigénhiányos állapot hosszától függ. Mivel ilyenkor teljes érelzáródás nem alakul ki, az EKG-n kiterjedt, súlyos ST depresszió figyelhető meg, de ST eleváció nem látható, a klinikumban ezt az állapotot nem ST elevációs infarktusként definiálják [66].

A koszorúereken kialakult plakkok az esetek egy részében berepednek, felszínükön a stabil, vékony és jól tapadó falis trombus helyett instabil, egyre vastagodó és könnyebben leváló trombus képződik. Az így kialakult trombus a koszorúeret teljes egészében elzárja, ezzel a vérellátás akutan romlik. A koszorúsér teljes elzáródása következtében kialakult elektromos zavar miatt az EKG-n az ST szakasz megemelkedik. A klinikumban ezen eseteket ST elevációs szívizom infarktusként definiálják. Ekkor az elzáródott ér teljes ellátási területén nagy, összefüggő nekrotikus szövet alakul ki [67].

A szív pumpafunkciója az iszkémia vagy nekrozis által érintett terület nagyságától, a megfelelő összehúzóerőre képtelen szívizom mennyiségétől függően változik. A pumpafunkció in vivo szívultrahang segítségével az ejekciós frakcióval és a frakcionális rövidüléssel, in vitro izolált szívizom preparátumon pedig az aorta kiáramlással jellemezhető.

A fentiek alapján az idő-függési vizsgálatban kapott eredményeket a következőképpen értelmezhetjük.

A magas koleszterin szint hatására a generalizált ateroszklerózis részjelenségeként súlyos koszorúsér szklerózis jelentkezett, mely következtében miokardiális iszkémia és infarktus alakult ki. Az infarktusz terület a 12 hetes koleszterindús táppal történő etetést követően ($1,7 \pm 2,65\%$) nem különbözött szignifikánsan a normál táppal etetett állatokétól, azonban a 40. hét végére a szívizom $32 \pm 8,6\%$ -a volt elhalt terület, mely szignifikánsan magasabb mindkét csoporthoz képest (11. ábra). A TTC festés kapcsán a HC 40 állatokban a szívizom infarktusz területek helyenként nagyobb, összefüggő területeket alkottak, máshol foltos, csíkos megjelenést mutattak. Ez a kettős mintázat arra utal, hogy az állatok szívében mind az ST elevációs, mind a nem ST elevációs infarktusznak megfelelő patomechanizmus szerepet játszott a nekrotikus területek kialakulásában.

Az in vivo elvégzett szívultrahangos vizsgálat az infarktusos és aktuálisan iszkémiás szívizom területek következtében kialakult csökkent szisztolés funkciót igazolta. A 40 hetes koleszterindús táppal történt etetést követően a bal kamra szisztolés funkciót jellemző paraméterek (frakcionális rövidülés és ejekciós frakció) szignifikánsan kisebb értéket mutattak a többi csoporthoz képest. A HC 40 csoportban ($20 \pm 3\%$) a frakcionális rövidülés a Kontroll 12 ($35 \pm 5\%$), Kontroll 40 ($33 \pm 4\%$) és HC 12 ($32 \pm 6\%$) állatoknál mért értékeknél szignifikánsan kisebb volt. Az ejekciós frakció a frakcionális rövidüléssel azonos módon változott, a HC 40 állatokban ($38 \pm 5\%$) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a többi csoportban (Kontroll 12: $60 \pm 7\%$, Kontroll 40: $58 \pm 6\%$, HC 12: $55 \pm 9\%$) (7. ábra).

Az ex vivo izolált szívizom preparátumon kivitelezett mérések a szívultrahangos eredményekkel egyező képet igazoltak. A 40 hétig tartó koleszterindús táplálást követően a szívizmok a vizsgálati rendszerben beállított utóterheléssel szemben (1. ábra) gyakran képtelenek voltak érdemi aorta kiáramlást létrehozni, a mért értékek ($4,6 \pm 11,4$ ml/perc) szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a másik három csoportban (Kontroll 12: 146 ± 53 ml/perc, Kontroll 40: 120 ± 18 ml/perc, HC 12: 72 ± 18 ml/perc) (9. ábra).

A meggyomag-kivonat hatását vizsgáló kísérletben, a 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés hatására, a bal kamra szisztolés funkcióját in vivo jellemző frakcionális rövidülésben és ejekciós frakcióban, valamint ex vivo az aorta kiáramlásban és a bal kamra által generált nyomásban a vizsgált csoportok (Kontroll, HC, HC+MMK) között szignifikáns különbség nem volt (10. ábra).

A fentiek alapján kísérleti elrendezéseinkben szignifikáns mértékű bal kamra szisztolés funkció csökkenéshez és miokardiális infarktus kialakulásához viszonylag hosszú behatási időre van szükség.

Diasztolés diszfunkció

Általánosságban elmondható, hogy a szívizom funkcióját rontó változások első jele a diasztolés diszfunkció. A diasztolé ugyanis, valójában energiaigényes folyamat, melynek során a szisztolé alatt felszabadult intracelluláris kalcium visszapumpálása zajlik a szarkoplazmatikus retikulumba. A visszapumpálásért felelős fehérje az ATP-igényes Ca^{2+} ATPáz (SERCA2).

Diasztolés diszfunkciót számtalan miokardiális és extramiokardiális tényező okozhat. A szívizom működésével összefüggésbe hozható folyamatok károsíthatják a kalcium homeosztázist, a miofilamentumok működését, a sejt energiaháztartását, a citoskeletont és az

extracelluláris mátrixot. Az extramiokardiális okok érinthetik a neurohormonális rendszert, a pericardiumot, továbbá a szív elő- és utóterhelését, melyet egy sor kór állapot befolyásol [68]. A hiperkoleszterinémia által elindított vaszkuláris események és intracelluláris folyamatok során a miokardiális energiaháztartás felborul. Ennek következtében kezdetben diasztolés, később szisztolés funkciózavar alakul ki.

In vivo a szívultrahang megfelelő módszer mind a szisztolés, mind a diasztolés funkció vizsgálatára [69]. A kora- és késődiasztolés szöveti sebességek aránya normálisan nagyobb, mint 1, diasztolés diszfunkció esetén viszont az arány 1-nél kisebb.

A meggy-mag-kivonat hatását vizsgáló kísérletekben szívultrahanggal szöveti sebesség méréseket is végeztünk, mellyel lehetőséget adott a diasztolés funkció értékelésére. A normál táppal etetett állatok bal kamra diasztolés funkciója megtartott volt ($E'/A' > 1$). A csak koleszterindús táppal etetett állatokban diasztolés diszfunkciót észlelünk, az $E'/A' < 1$ -nek adódott (8. ábra). Az E'/A' arányban a csoportok között a különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (HC kisebb mind a Kontroll, mind a HC+MMK csoporttal összehasonlítva).

Összefoglalva: A 12 hétig tartó koleszterindús táppal történt etetést követően a normál táppal etetett állatokhoz képest szignifikánsan nagyobb kiterjedésű torakális aorta ateroszklerózis (5. ábra), szignifikánsan alacsonyabb aorta kiáramlás volt megfigyelhető (9. ábra). Ezen eltérések a 40 hetes kezelési idő végére szignifikánsan tovább romlottak, mind a normál, mind a 12 hétig koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest. A fentiek mellett a szívizomban szignifikánsan nagyobb kiterjedésű teljes infarktusos területet (11. ábra), ennek következtében csökkent bal kamra funkciók paramétereit (7. ábra) mértünk.

A fentiekkel összhangban 16 hétig tartó koleszterindús táppal történt etetés mellett torakális ateroszklerózist (6. ábra), diasztolés diszfunkciót (8. ábra) detektáltunk.

A meggy-mag-kivonat addíció kardiovaszkuláris hatásai

Ismert tény, hogy a szérumban a koleszterin szintjét csökkentő statinok HO-1 induktor hatással is bírnak [70], ugyanakkor a koleszterinszint csökkenését 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reduktáz gátló tulajdonságukkal magyarázzák [71]. Az enzim által katalizált HMG-CoA - mevalonát átalakulás a koleszterinszintézis fontos lépése, mely gátlásával az intracelluláris koleszterinszintézis csökken. A májsejtek endogén koleszterinszintézisének csökkenése növeli a sejtfelszíni LDL receptorok expresszióját. A

fokozott LDL receptor expresszió és koleszterin clearance következtében nő az exogén koleszterin hasznosítása, ami csökkenti a szérumban a koleszterin szintjét [72]. A statinok a HMG-CoA reduktáz gátláson túl számos egyéb hatással rendelkeznek, melyeket összefoglaló néven pleiotrop hatásokként említünk [73]. A pleiotrop hatásnak tulajdonítják a statin kezelés során az endotél diszfunkció visszafejlődését, a gyulladási paraméterek csökkenését, az ateroszklerotikus plakkok stabilitásának növekedését és a trombociták aggregációs hajlamának mérséklődését [74].

Vizsgálatunkban – legjobb tudomásunk szerint – elsőként tapasztaltuk, hogy a HO-1 induktor hatással bíró meggy-mag-kivonat szignifikáns mértékben csökkentette a szérumban a koleszterinszintet (HC: $24 \pm 1,6$ mmol/l, HC+MMK: $19,3 \pm 1$ mmol/l) (4. ábra). Az, hogy a HO-1 indukció pontosan milyen molekuláris mechanizmussal éri ezt el, jelenleg nem ismert.

A 16 hetes koleszterindús táppal történt etetéshez képest a meggy-mag-kivonat addíció szignifikáns torakális ateroszklerózis csökkentő hatással bírt. Az aorta plakkok kiterjedése a HC csoportban a teljes érfelszín $75 \pm 11\%$ -a, a HC+MMK csoportban $58 \pm 6\%$ -a volt (6. ábra).

Iszkémia-reperfúzió

A meggy-mag-kivonat hatásának vizsgálata során a nyugalmi szisztolés funkcionális paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között. Az izolált szívek terhelhetőségét felméréndő, 30 perc globális iszkémiának majd 120 perc reperfúzióknak tettük ki a preparátumokat. Ez hasonló a humán kardiológiában használatos terheléses vizsgálatokhoz, melynek során a szívizmot provokáljuk és a provokációt követő funkcióváltozás értékelésével nyerünk adatokat a szívizom állapotára. Így nem csak a nyugalmi funkció, hanem benne lévő tartalék (rezerv) megítélésére is lehetőség nyílik.

A HC és HC+MMK csoportok eredményeit értékelve: vizsgálatunkban a meggy-mag-kivonat addíciójának a koleszterin szint csökkenésén túl alimentáris koleszterin bevitellel indukált hiperkoleszterinémiában, számos kedvező hatását figyelhettük meg. A csak koleszterin dús táppal etetett állatokhoz képest

- szignifikáns mértékben csökkentette a torakális aortában az ateroszklerotikus plakkok méretét (HC: $75 \pm 10\%$, HC+MMK $58 \pm 6\%$) (6. ábra),

- javította a bal kamra diasztolés funkcióját (HC E'/A': $0,98 \pm 0,02$; HC+MMK E'/A': $1,29 \pm 0,2$) (8. ábra),
- iszkémia-reperfúziót követően mind 60 és 120 perccel szignifikáns mértékben növelte az aorta kiáramlást (60 percnél: HC I/R: 34 ± 13 ml/perc, HC+MMK I/R: 49 ± 10 ml/perc; 120 percnél: HC I/R: 6 ± 6 ml/perc, HC+MMK I/R: 15 ± 3 ml/perc) (10/B. ábra),
- iszkémia-reperfúziót követően 120 perccel szignifikáns mértékben növelte a koronária átáramlás (120 percnél: HC I/R: 24 ± 3 ml/perc, HC+MMK I/R: 32 ± 4 ml/perc) (10/C. ábra),
- csökkentette az iszkémia-reperfúziót követően kialakult szívizominfarktus méretét (HC I/R: $47 \pm 4\%$, HC+MMK I/R: $39 \pm 5\%$) (12. ábra).

A meggy-mag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatoknál, az iszkémia-reperfúzió provokációt követően megfigyelhető nekrotikus terület mennyisége, a normál táppal etetett állatokéval közel egyező mértékű volt (infarktus méret: Kontroll I/R: $35 \pm 5\%$, HC+MMK I/R: $39 \pm 5\%$) (12. ábra). Az aorta kiáramlási és koronária átáramlási sebesség koleszterin bevitel okozta csökkenését a meggy-mag-kivonat nem védte ki teljes mértékben (60 és 120 percnél szignifikánsan alacsonyabb aorta kiáramlás és 120 percnél szignifikánsan alacsonyabb koronária átáramlás volt mérhető), de a csak koleszterindús táppal etetett állatokhoz képest mérsékelte azt (10. ábra B,C).

A fentiek alapján a meggy-mag-kivonat kardioprotektív hatással rendelkezik. Ezek a kedvező hatások nyilvánvalóan összefüggésben állnak a hiperkoleszterinémia mérséklésével, de elképzelhető, hogy a koleszterin csökkentő hatás csak egy, a meggy-mag-kivonat kardioprotektív hatásának többféle mechanizmusa közül.

A hiperkoleszterinémia molekuláris hatásai

Annak vizsgálatára, hogy a meggy-mag-kivonat milyen molekuláris mechanizmusokon keresztül éri el kardioprotektív hatásait, vizsgálatainkat molekulárbiológiai mérésekkel is kiegészítettük.

Citokróm c oxidáz

A sejt nyugalmi energiatermelésében és iszkémia-reperfúziós sérülésében alapvető jelentőséggel bíró COX szintje és aktivitása kísérleteinkben normál táppal etetett állatoknál az idő függvényében csökkent (13. és 15. ábra). Szignifikáns különbség volt a Kontroll 12 (protein: 26 ± 3 , aktivitás: $0,038 \pm 0,004$) és Kontroll 40 (protein: 18 ± 2 , aktivitás: $0,023 \pm 0,002$) csoport értékei között. Koleszterindús táppal történt etetés során a 12 hetes időpontban mért COX szint és aktivitás a kontroll állatokéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt (HC 12 protein: 4 ± 3 , aktivitás: $0,0012 \pm 0,005$), melyhez képest a 40. hétre szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető (HC 40 protein: 13 ± 3 , aktivitás: $0,0015 \pm 0,008$). A 40. hét végére a Kontroll és HC állatok COX szintjében és aktivitásában szignifikáns különbség nem volt. Ennek a pontos magyarázata nem ismert, a feltételezés szintjén mozogva, a csökkent energiatermelésre válaszként adott fokozott COX expresszió lehet.

Az iszkémia-reperfúzió a szívizomban mért COX fehérje mennyiségére HC állatokban nem volt szignifikáns hatással (HC nyugalmi protein: 10148 ± 2892 , HC I/R protein: 11545 ± 3654) (16. ábra).

Hem oxigenáz-1

A HO (hem oxigenáz) a hősokk-fehérjék családjába tartozó ubikviter molekula, mely a hem lebomlásáért felelős. Már az algák is gyakorlatilag ugyanolyan molekuláris szerkezettel tartalmazzák, mint az emberi szervezet. A hem lebontása során Fe^{2+} , szénmonoxid (CO) és biliverdin keletkezik [75]. A HO kulcsfontosságú enzim a vörösvértestek degradációjában [76], de ezen kívül számos más élettani folyamatban is részt vesz. Bizonyos stresszorok hatására expressziója fokozódik, amely a protektív szabályozási folyamatok része [77, 78]. Protektív hatása a hem lebomlása kapcsán keletkező biológiailag aktív metabolitokkal mutat összefüggést.

A CO számtalan biológiai hatással rendelkezik [79]. Neurotranszmitter funkcióját, továbbá antiinflammatorikus, antiapoptotikus, antioxidáns, mi több, szerv-transzplantáció kapcsán kilökődés gátló hatását igazolták. Emellett ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) dependens simaizom relaxáló és trombocita aggregáció gátló hatással is bír [80].

A biliverdin biliverdin-reductase hatására bilirubinná alakul át. A biliverdin antivirális, a bilirubin pedig erős antioxidáns hatással bír [81, 82]. Az LDL oxidáció gátlása révén a magasabb bilirubin szinttel élő egyéneknél alacsonyabb a szívizom infarktus előfordulása [83].

A Fe^{2+} számtalan, a sejt számára veszélyes oxidatív reakcióban vehet részt, melyek a sejt halálát okozhatják. A HO-1 a ferritin szintézis aktiválása révén előmozdítja az Fe^{2+} biztonságos raktározását.

Állatkísérletes modellben igazolták, hogy a magasabb miokardiális HO-1 szint iszkémia-reperfúzió során kardioprotektív hatással bír [84].

Idő-függési vizsgálatunkban a normál táppal etetett állatok szívizmában mért HO-1 protein mennyisége lényegesen és szignifikánsan magasabb volt, mint a koleszterindús táppal etetett állatoké (HO-1 protein szint: Kontroll 12: $11 \pm 0,5$; Kontroll 40: $10 \pm 0,7$; HC 12: $5 \pm 1,4$; HC 40: $3 \pm 1,2$) (17. ábra). A HO-1 szintje az alimentáris koleszterin bevitel idejével párhuzamosan csökkent, a HC 12 és HC 40 értékek között szignifikáns különbség volt megfigyelhető.

A fentiek alapján tehát a hiperkoleszterinémiás állapot időfüggő HO-1 csökkenést eredményez, melynek következtében a HO-1 protektív hatásai kisebb mértékben tudnak érvényesülni.

Iszkémia-reperfúzió vizsgálatunkban a miokardiális HO-1 szintet szignifikáns mértékben nem befolyásolta, tendencia jelleggel annak csökkenését észleltük (HO-1 HC nyugalmi: 5230 ± 7482 ; HC I/R: 1691 ± 353) (18. ábra).

A meggy-mag-kivonat hatásai a COX és HO-1 szintekre

HO-1

A meggy-mag-kivonat alkalmazása mellett a HO-1 expressziójának emelkedése várható [85]. Vizsgálatunkban a meggy-mag-kivonat szignifikáns mértékben emelte a koleszterin dús táppal etetett nyúl szívizom iszkémia-reperfúzió utáni HO-1 szintjét (HO-1 HC I/R: 1691 ± 353 , HC+MMK I/R: 4143 ± 2676). Ez a HO-1 emelő hatás azonban a hiperkoleszterinémiában HO-1 csökkentő hatásánál gyengébbnek bizonyult, a HC+MMK I/R érték (4143 ± 2676) a Kontroll I/R értéknél (22754 ± 2761) szignifikánsan alacsonyabbnak adódott (18. ábra).

A meggy-mag-kivonat HO-1 emelő hatása szerepet játszhat a torakális ateroszklerózisban, szívultrahangos és haemodinamikai paraméterekben megfigyelhető kedvező hatásában.

COX protein szint és aktivitás

Egy, a HO-1 és a COX szint összefüggését vizsgáló tanulmányban, melyet streptozocinnal cukorbeteggé tett patkányok veséjén végeztek, a HO-1 indukció a mitokondriális transzportfolyamatok és a COX szint emelkedésével járt együtt [86]. Munkánk során - az előbb említett tanulmánnyal összhangban - a COX protein szint emelkedését észleltük meggyomag-kivonat hatására (16. ábra). A 120 perc reperfúzió után a COX mennyisége (HC+MMK I/R: 18779 ± 4960) szignifikánsan magasabb (2.1-1.8-1.6 szorosa) volt mind a kontroll (Kontroll I/R: 8981 ± 2982), mind a koleszterindús táppal etetett állatok nyugalmi (HC nyugalmi I/R: 10148 ± 494) és iszkémia-reperfúziót követő (HC I/R: 11545 ± 3654) szívizmában mért értékekhez képest. A COX aktivitás 120 perc reperfúzió után a meggyomag-kivonattal kezelt állatok esetében (HC+MMK I/R: $0,034 \pm 0,01$) hasonlóan bizonyult a kontroll állatok COX aktivitás értékéhez (Kontroll I/R: $0,037 \pm 0,009$) (14. ábra), annak ellenére, hogy a 2x nagyobb COX protein mennyiség alapján magasabb enzim aktivitást vártunk.

Iszkémia-reperfúziót követően, a kontroll (Kontroll I/R: 8981 ± 2982) és HC állatok (HC I/R: 11545 ± 3654) szívizmában mért közel azonos mennyiségű COX fehérje mellett (16. ábra), a koleszterin dús táppal etetett állatok esetén (HC I/R: $0,022 \pm 0,009$) a kontroll állatokénál (Kontroll I/R: $0,037 \pm 0,009$) alacsonyabb COX aktivitást mértünk (14. ábra).

A fentiek alapján a hiperkoleszterinémia csökkent COX aktivitást okoz. A csökkent COX aktivitás pontos mechanizmusa mindmáig tisztázatlan. Feltehető, hogy a COX aktivitás megváltozott szabályozása, esetleg az emelkedett ROS szint állhat a háttérben.

VEGF változások

A VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) jelentős szerepet játszik az endotélium regenerációjában és az iszkémia utáni neovaszkularizációban [29]. Saját adataink alapján - a várakozásokkal ellentétben - a szívizom VEGF protein mennyiségében nem volt szignifikáns különbség a normál, a csak koleszterindús táppal etetett és a meggyomag-kivonatot is tartalmazó koleszterindús táppal etetett állatok között (19. és 20. ábra). A fenti eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy nyúlban a hiperkoleszterinémia okozta változások hátterében, továbbá a meggyomag-kivonat jótékony hatása mögött a VEGF-től független mechanizmusok állnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink igazolták, hogy 2%-os koleszterint tartalmazó táppal etetett nyúlban, hiperkoleszterinemiás állapot hozható létre. A szérumban a koleszterinszint mértéke a behatási idővel egyenesen arányos. 40 hetes etetést követően a szérumban a koleszterinszint és a kialakult patofiziológiai eltérések alapján familiáris hiperkoleszterinemiának megfelelő állatmodellt kapunk. Az így kiváltott hiperkoleszterinémia következtében a behatási idővel egyenesen arányos a torakális ateroszklerózis mértéke.

16 hét után a szívultrahanggal mérhető paraméterekben csak diasztolés diszfunkció észlelhető. 40 hét után a súlyos koronária ateroszklerózis következtében miokardiális infarktusz alakul ki, melyek súlyos szisztolés diszfunkciót okoznak. A csökkent bal kamra funkció in vivo echokardiográfiával és ex vivo izolált szívizom preparátumon is mérhető.

A szívizom COX szintje és aktivitása normál táppal etetett állatokban az idő függvényében csökken, koleszterindús táppal etetett állatoknál a kezdeti csökkenést követően emelkedik, a 12. héten nagyon alacsony, a 40. héten az ugyanaddig normál táppal etetett állatokéval azonos értéket vesz fel. A hiperkoleszterinémia azonos mennyiségű COX protein mellett csökkent COX aktivitást okoz. Iszkémia-reperfúzió a COX mennyiségét nem befolyásolja.

A hiperkoleszterinémia a miokardiális HO-1 szintet a behatási idővel párhuzamosan csökkenti.

Szignifikáns VEGF változást a hiperkoleszterinémia vizsgálatunkban nem okozott.

A meggy-mag-kivonat addíció a 16 hetes koleszterindús táppal történt etetés kapcsán szignifikáns mértékben csökkenti a szérumban a koleszterinszintet, a torakális ateroszklerózis mértékét, csökkenti a bal kamra diasztolés diszfunkció kialakulását. Globális iszkémia-reperfúziót követően csökkenti az így kialakult szívizom infarktus méretét, javítja az aorta kiáramlást és koronária átáramlást. A meggy-mag-kivonat növeli a miokardiális HO-1 és COX szinteket, a VEGF-re nincs hatással.

Vizsgálatainkban hiperkoleszterinemiás állatmodell segítségével igazoltuk a magas koleszterinszint idő-függő aterogén hatását, valamint hiperkoleszterinemiás állapotban a meggy-mag-kivonat koleszterinszint csökkentő és kardioprotektív tulajdonságait.

Eredményeink alapján hiperkoleszterinemiás állapotban, mint például a familiáris hiperkoleszterinémia, a meggy-mag-kivonat reális kiegészítő terápiás lehetőséget jelenthet.

SUMMARY

Our experiments confirmed, that hypercholesterolemia can be induced by chow supplemented with 2% cholesterol in rabbits. Moreover, a linear correlation could be observed between the serum cholesterol levels and the feeding time. Based on the serum cholesterol levels and pathophysiological alterations an animal model of familial hypercholesterolemia can be generated following an exposition time of 40 weeks. The extent of atherosclerotic lesions in the thoracic aorta correlated with the duration of the high cholesterol diet. In animals fed with high cholesterol diet echocardiography showed left ventricular diastolic dysfunction after 16 weeks. However, high cholesterol diet for 40 weeks induced severe coronary atherosclerosis and consequent myocardial necrosis leading to severe systolic dysfunction. The impairment in the left ventricular function could be both assessed by echocardiography *in vivo* and measured on isolated myocardial preparations *ex vivo*. The expression level and activity of cytochrome c oxidase (COX) decreased in animals fed with cholesterol-free rabbit chow. In contrast, expression level and activity of COX in the high cholesterol diet group was very low after 12 weeks and increased significantly after 40 weeks to the levels observed in the animals fed with cholesterol-free diet for 40 weeks. Despite similar COX protein levels hypercholesterolemia led to reduced COX activity. The expression of COX was not influenced by ischemia-reperfusion. Significantly lower levels of HO-1 protein were detected in heart tissues derived from rabbits with high cholesterol diet compared to hearts from the non-hypercholesterolemic control animals. No apparent significant differences could be observed in the VEGF protein expression levels between non-hypercholesterolemia control rabbits and those experiencing diet-induced hypercholesterolemia. Addition of sour cherry seed extract (SCSE) to high cholesterol diet for 16 weeks significantly decreased serum cholesterol level, the degree of atherosclerosis in the thoracic aorta and improved left ventricular diastolic dysfunction. SCSE-treated animals exhibited significantly reduced infarct size, improved cardiac function and improved coronary flow following global ischemia-reperfusion. Increased myocardial HO-1 and COX protein expression were also observed in hearts from SCSE-treated rabbits with no major changes in the VEGF levels. Using an animal model of hypercholesterolemia our studies confirmed the time-dependent atherogenic effects of hypercholesterolemia, the cholesterol-lowering and cardioprotective effects of the sour cherry seed extract. Based on these observations the sour cherry seed extract could serve as a potential supplementary therapeutical option in conditions associated with elevated cholesterol levels (e.g. familial hypercholesterolemia).

HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Mendis, S., et al., *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. 2011, Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization. vi, 155 p.
2. Pocock, S.J., et al., *A score for predicting risk of death from cardiovascular disease in adults with raised blood pressure, based on individual patient data from randomised controlled trials*. *BMJ*, 2001. **323**(7304): p. 75-81.
3. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
4. Greenland, P., S.C. Smith, Jr., and S.M. Grundy, *Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests*. *Circulation*, 2001. **104**(15): p. 1863-7.
5. Newman, A.B., et al., *Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(3): p. 538-45.
6. Morrow, D.A., *Cardiovascular risk prediction in patients with stable and unstable coronary heart disease*. *Circulation*, 2010. **121**(24): p. 2681-91.
7. van der Graaf, A., et al., *Molecular basis of autosomal dominant hypercholesterolemia: assessment in a large cohort of hypercholesterolemic children*. *Circulation*, 2011. **123**(11): p. 1167-73.
8. McCommis, K.S., et al., *Hypercholesterolemia increases mitochondrial oxidative stress and enhances the MPT response in the porcine myocardium: beneficial effects of chronic exercise*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **301**(5): p. R1250-8.
9. Stapleton, P.A., et al., *Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. **7**: p. 54.
10. Shen, G.X., *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders*. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2012. **12**(2): p. 106-12.
11. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
12. Prasad, K., *Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed*. *Circulation*, 1999. **99**(10): p. 1355-62.
13. Prasad, K. and J. Kalra, *Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E*. *Am Heart J*, 1993. **125**(4): p. 958-73.
14. Prasad, K. and P. Lee, *Suppression of hypercholesterolemic atherosclerosis by pentoxifylline and its mechanism*. *Atherosclerosis*, 2007. **192**(2): p. 313-22.
15. Musatov, A. and N.C. Robinson, *Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase*. *Free Radic Res*, 2012. **46**(11): p. 1313-26.
16. Chandran, K., et al., *Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q*. *Biophys J*, 2009. **96**(4): p. 1388-98.
17. Stokes, K.Y., et al., *Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(8): p. 1026-36.
18. Ingram, D.G., et al., *Chronic nitric oxide synthase inhibition blunts endothelium-dependent function of conduit coronary arteries, not arterioles*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(6): p. H2798-808.

19. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J. **33**(14): p. 1787-847.
20. Blair, J.E., M. Huffman, and S.J. Shah, *Heart failure in North America*. Curr Cardiol Rev, 2013. **9**(2): p. 128-46.
21. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
22. Bak, I., et al., *Cardioprotective mechanisms of Prunus cerasus (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1329-36.
23. Fahy, E., et al., *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S9-14.
24. Brunzell, J.D., et al., *Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(15): p. 1512-24.
25. Gunner, M.R., et al., *Molecular mechanisms for generating transmembrane proton gradients*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1827**(8-9): p. 892-913.
26. Sinibaldi, F., et al., *Role of lysines in cytochrome c-cardiolipin interaction*. Biochemistry, 2013. **52**(26): p. 4578-88.
27. Liu, R.R. and T.H. Murphy, *Reversible cyclosporin A-sensitive mitochondrial depolarization occurs within minutes of stroke onset in mouse somatosensory cortex in vivo: a two-photon imaging study*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36109-17.
28. Huttemann, M., et al., *Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1817**(4): p. 598-609.
29. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
30. Rosano, J.M., et al., *Targeted Delivery of VEGF after a Myocardial Infarction Reduces Collagen Deposition and Improves Cardiac Function*. Cardiovasc Eng Technol, 2012. **3**(2): p. 237-247.
31. Won, Y.W., et al., *Post-translational regulation of a hypoxia-responsive VEGF plasmid for the treatment of myocardial ischemia*. Biomaterials, 2013. **34**(26): p. 6229-38.
32. Li, J., et al., *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
33. Shahneh, F.Z., et al., *Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies*. Hum Antibodies. **22**(1): p. 15-9.
34. Abcouwer, S.F., *Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy*. J Clin Cell Immunol. **Suppl 1**(11).
35. Lanzetta, P., et al., *Different antivascular endothelial growth factor treatments and regimens and their outcomes in neovascular age-related macular degeneration: a literature review*. Br J Ophthalmol. **97**(12): p. 1497-507.
36. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme*. J Biol Chem, 1969. **244**(23): p. 6388-94.
37. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 517-54.

38. Durante, W., K.J. Peyton, and A.I. Schafer, *Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(11): p. 2666-72.
39. Panahian, N., M. Yoshiura, and M.D. Maines, *Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice*. *J Neurochem*, 1999. **72**(3): p. 1187-203.
40. Bak, I., et al., *Isolation and analysis of bioactive constituents of sour cherry (*Prunus cerasus*) seed kernel: an emerging functional food*. *J Med Food*. **13**(4): p. 905-10.
41. Piccolella, S., et al., *Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L.): role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(6): p. 1928-35.
42. Blando, F., C. Gerardi, and I. Nicoletti, *Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods*. *J Biomed Biotechnol*, 2004. **2004**(5): p. 253-258.
43. Mahmoud, F.F., et al., *Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3+ TNF-alpha+ and CD3+IL-8+ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients*. *Phytother Res*. **27**(5): p. 767-74.
44. Bak, I., et al., *Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels*. *Phytother Res*, 2011. **25**(11): p. 1714-20.
45. *Laboratory animal welfare; U.S. government principles for the utilization and care of vertebrate animals used in testing, research and training; notice*. *Fed Regist*, 1985. **50**(97): p. 20864-5.
46. Lang, R.M., et al., *Recommendations for chamber quantification*. *Eur J Echocardiogr*, 2006. **7**(2): p. 79-108.
47. Quinones, M.A., et al., *Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2002. **15**(2): p. 167-84.
48. Foppa, M., B.B. Duncan, and L.E. Rohde, *Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy?* *Cardiovasc Ultrasound*, 2005. **3**: p. 17.
49. Yamamoto, F., M.V. Braimbridge, and D.J. Hearse, *Calcium and cardioplegia. The optimal calcium content for the St. Thomas' Hospital cardioplegic solution*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1984. **87**(6): p. 908-12.
50. Tosaki, A. and P. Braquet, *DMPO and reperfusion injury: arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts*. *Am Heart J*, 1990. **120**(4): p. 819-30.
51. Nachlas, M.M. and T.K. Shnitka, *Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity*. *Am J Pathol*, 1963. **42**: p. 379-405.
52. Fishbein, M.C., et al., *Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique*. *Am Heart J*, 1981. **101**(5): p. 593-600.
53. Ytrehus, K., et al., *Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(6 Pt 2): p. H2383-90.
54. Schultz, J.E., et al., *Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2607-15.
55. Dickson, E.W., et al., *Naloxone blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(9): p. 1751-6.
56. Pelosi, A., et al., *Cardiac tissue Doppler and tissue velocity imaging in anesthetized New Zealand white rabbits*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. **50**(3): p. 317-21.

57. Raal, F., et al., *Elevated PCSK9 levels in untreated patients with heterozygous or homozygous familial hypercholesterolemia and the response to high-dose statin therapy*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(2): p. e000028.
58. Watts, G.F., et al., *Familial hypercholesterolaemia: a review with emphasis on evidence for treatment, new models of care and health economic evaluations*. Int J Evid Based Healthc, 2012. **10**(3): p. 211-21.
59. Nordestgaard, B.G., et al., *Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society*. Eur Heart J, 2013.
60. Stein, E.A., et al., *Effect of the PCSK9 Monoclonal Antibody, AMG 145, in Homozygous Familial Hypercholesterolemia*. Circulation, 2013.
61. Chen, S.J., et al., *Biodistribution of AAV8 vectors expressing human LDL receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia*. Hum Gene Ther Clin Dev, 2013.
62. Lee, W.P., et al., *Defining the role of lipoprotein apheresis in the management of familial hypercholesterolemia*. Am J Cardiovasc Drugs, 2011. **11**(6): p. 363-70.
63. Marais, A.D. and D.J. Blom, *Recent advances in the treatment of homozygous familial hypercholesterolaemia*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(4): p. 288-94.
64. Guan, Z.J., et al., *[Results from six years of follow-up of domino liver transplantation patients who received homozygous familial hypercholesterolemia livers]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2013. **20**(11): p. 863-4.
65. Quindry, J.C. and K.L. Hamilton, *Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury*. Curr Cardiol Rev, 2013. **9**(3): p. 220-9.
66. Jneid, H., et al., *2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines*. Circulation, 2012. **126**(7): p. 875-910.
67. O'Gara, P.T., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2013. **127**(4): p. e362-425.
68. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1503-8.
69. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1387-93.
70. Mrad, M.F., et al., *Statins modulate transcriptional activity of heme-oxygenase-1 promoter in NIH 3T3 Cells*. J Cell Biochem, 2012. **113**(11): p. 3466-75.
71. Tobert, J.A., *New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase*. Circulation, 1987. **76**(3): p. 534-8.
72. Ma, P.T., et al., *Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8370-4.
73. Bonetti, P.O., et al., *Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?* Eur Heart J, 2003. **24**(3): p. 225-48.

74. Ravingerova, T., et al., *Changes in PPAR gene expression and myocardial tolerance to ischaemia: relevance to pleiotropic effects of statins*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(12): p. 1028-36.
75. Pittala, V., et al., *A focus on heme oxygenase-1 (HO-1) inhibitors*. Curr Med Chem, 2013. **20**(30): p. 3711-32.
76. Morse, D. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1: from bench to bedside*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(6): p. 660-70.
77. Taketani, S., et al., *The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase*. FEBS Lett, 1989. **245**(1-2): p. 173-6.
78. Keyse, S.M. and R.M. Tyrrell, *Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(1): p. 99-103.
79. Mishra, M. and J.F. Ndisang, *A critical and comprehensive insight on heme oxygenase and related products including carbon monoxide, bilirubin, biliverdin and ferritin in type-1 and type-2 diabetes*. Curr Pharm Des, 2013.
80. Alshehri, A., et al., *Mechanisms of the vasorelaxing effects of CORM-3, a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule: interactions with eNOS*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013. **386**(3): p. 185-96.
81. Liu, Y., et al., *Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(6): p. 960-7.
82. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
83. Djousse, L., et al., *Effect of serum albumin and bilirubin on the risk of myocardial infarction (the Framingham Offspring Study)*. Am J Cardiol, 2003. **91**(4): p. 485-8.
84. Vulapalli, S.R., et al., *Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(2): p. H688-94.
85. Mahmoud, F.F., et al., *Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3+ TNF-alpha+ and CD3+IL-8+ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients*. Phytother Res, 2012. **27**(5): p. 767-74.
86. Di Noia, M.A., et al., *Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome C oxidase activity in experimental diabetes*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15687-93.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/401/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

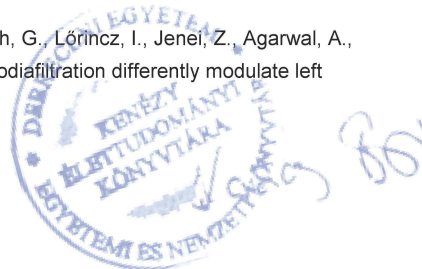
Jelölt: Kertész Attila Béla
Neptun kód: S5APBH
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10037250

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Juhász, B., **Kertész, A.**, Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D.D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF:3.311 (2012)
2. **Kertész, A.**, Bombicz, M., Priksz, D., Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D.D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: Time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF:2.464 (2012)

További Közlemények

3. Czifra, Á., Páll, A., Kulcsár, J., Barta, K., **Kertész, A.**, Paragh, G., Lőrincz, I., Jenéi, Z., Agarwal, A., Zarjou, A., Balla, J., Szabó, Z.: Hemodialysis and hemodiafiltration differently modulate left ventricular diastolic function.
BMC Nephrol. 14 (1), 76-82, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2369-14-76>
IF:1.644 (2012)



4. **Kertész, A.B.**, Édes, I.: Fabry disease cardiomyopathy: From genes to clinical manifestations.
Curr. Pharm. Biotechnol. 13 (13), 2477-2484, 2012.
IF:2.69
5. Domokos É., Kardos L., Bednárszky I., Bene O., Bódi A., Daragó A., Fülöp T., Homoródi N., Péter A., Rácz I., Hegedűs I., **Kertész A.B.**: Az interventrikuláris szeptum mérése echokardiográfiával: Mérési különbségek és klinikai következményeik.
Cardiol. Hung. 41, 15-20, 2011.
6. Juhász, B., Das, D.K., **Kertész, A.**, Juhász, Á., Gesztelyi, R., Varga, B.: Reduction of blood cholesterol and ischemic injury in the hypercholesteromic rabbits with modified resvaratrol, logevinex.
Mol. Cell. Biochem. 348 (1-2), 199-203, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0615-2>
IF:2.057
7. Petrovski, G., Das, S., Juhász, B., **Kertész, A.**, Tósaki, Á., Das, D.K.: Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy.
Antioxid. Redox Signal. 14 (11), 2191-2200, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3486>
IF:8.456
8. Constantin T., Székely A., Ponyi A., Gulácsy V., Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Medvecz M., Fiedler O., Széchezy R., Varga E., Rudas G., **Kertész A.**, Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mohamed M., Rákóczi É., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség - terápiás útmutató.
Orv. Hetil. 151 (31), 1243-1251, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28796>
9. Constantin T., Rákóczi É., Ponyi A., Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Csíkós M., Fiedler O., Széchezy R., Varga E., Rudas G., **Kertész A.**, Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mahdi M., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség: Diagnosztikai útmutató.
Orv. Hetil. 151 (7), 243-249, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28795>
10. Rácz I., Szabó G., Kolozsvári R., Fülöp L., Bódi A., Péter A., **Kertész A.**, Balogh L., Hegedűs I., Ungvári T., Édes I., Kőszegi Z.: A falmozgászavar változása akut miokardiális infarktusban a tünetektől a revaszkularizációig eltelt idő függvényében.
Cardiol. Hung. 40 (2), 104-109, 2010.

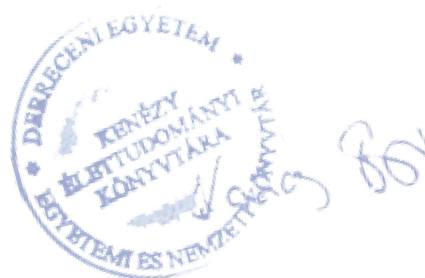
11. Tóth Z., Nagy-Baló E., **Kertész A.**, Clemens M., Herczku C., Tint D., Kun C., Édes I., Csanádi Z.:
Pitvarfibrilláció kezelése a pulmonalis vénák krioballon-izolációjával: Középtávú eredmények az
első 55 beteg alapján.
Orv. Hetil. 151 (5), 163-171, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28798>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20.622

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5.775**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok
bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports
Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.12.17



TÁRGYSZAVAK

hiperkoleszteinémiás nyúl, hiperkoleszterinémia, ateroszklerózis, szívultrahang, izolált dolgozó szív, iszkémia-reperfúzió, meggy-mag-kivonat, kardiális homeosztázis, hem oxigenáz, citokróm oxidáz, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

hypercholesterolemic rabbit; hypercholesterolemia, atherosclerosis, echocardiography, isolated working heart, ischaemia/reperfusion, sour cherry seed extract, cardiac homeostasis, heme-oxygenase, cytochrome oxidase, vascular endothelial growth factor (VEGF)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy ilyen munka megírása hosszú folyamat végeredménye. Mint minden nagyobb eredmény eléréséhez, ehhez is a számtalan apró lépés vezet. Hogy a sors, a szerencse, a véletlenek összjátéka, vagy a Jóisten keze van e mögött, mindenki saját életnézete alapján ítéli meg. Erről, mint sok minden másról, én nem sokat tudok, csak annyit, hogy a munkám írása kapcsán Vaszilij Grosszman „Élet és sors” című művét olvastam. De ez már csak a befutó, a célszalag előtti néhány méter. Hogy idáig eljutottam, sok mindenki segített, akár évekkal azelőtt, hogy ebbe a munkába fogtam volna. Ha nem is végeláthatatlan azoknak a sora, akiknek köszönetet mondanék, de mégsem említhetek mindenkit név szerint, muszáj mértéket tartani.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tósaki Árpád egyetemi tanárnak (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett tanszéken.

Köszönöm témavezetőm, Dr. Juhász Béla egyetemi adjunktus (DEOEC GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék), továbbá a tanszék minden dolgozója baráti segítségét munkám során.

Köszönök mindent:

Szüleimnek, akik egész életemben támogattak, nehéz helyzetemben segítettek.

Gyermekeimnek, Gergelynek és Csongornak, akikből a szünni nem akaró energiát nyertem.

Dr. Karsai Dénesnek, gyerekkori barátomnak, akire felnézek és büszke vagyok, aki bármikor felhívhat, és bármikor felhívhatok.

Bélteky Márta matematika tanárnőmnek, akitől azt tanultam, hogy „ha valamit érdemes csinálni, akkor azt érdemes jól csinálni”. Ezt próbáltam, lehetőség szerint munkámban szem előtt tartani.

Prof. Dr. Édes Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Klinika dolgozója lehessenek, és munkahelyemen termékeny táptalajt biztosított mind a betegellátás, mind a tudományos munka magas színvonalú végzésére.

Dr. Hegedűs Idának, aki a szívultrahang transzducert először a kezembe adta, mert attól kezdve az echokardiográfia „rabja” vagyok, nem tudok, és nem is akarok szabadulni tőle.

Dr. Bódi Annamáriának, aki lényeglátásával, hatalmas klinikai tapasztalatával, rövid-velős megjegyzéseivel segítette fejlődésem. A kisállat echokardiográfia felé az ő munkássága terelt.

Dr. Csapó Kálmánnak és Dr. Brugós Lászlónak, első főnökeim, akiktől a betegellátás lényegét, a szakma iránti alázatot tanultam.

Munkatársaimnak, akik türelemmel voltak munkám elkészítése kapcsán a mindennapokban.

Dr. Tóth Zsuzsanna Eszternek, aki gondoskodó szeretetével, hasznos tanácsaival, észrevételeivel segítette munkámat.

A kutatás eszközbeszerzése/infrastruktúrája/egyéb a (OTKA 78223, 104017 (Juhász Béla, Tósaki Árpád); TAMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 (Tósaki Árpád); TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 (Balla György, Balla József, Juhász Béla); TAMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0024 (Kertész Attila, Juhász Béla, Tósaki Árpád)) által biztosított forrásból valósult meg.

A kutatás a TAMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg (Tósaki Árpád).



FÜGGELÉK