

EGYETEMI, DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az iszkémiás szívizomkárosodás felépülésének
elősegítése farmakológiai beavatkozásokkal**

**Írta:
Juhász Béla**

Témavezetők: Dr. Tószaki Árpád, Dr. Vecsernyés Miklós

Programvezető: Dr. Gergely Lajos

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

2004

Bevezetés

Napjainkban a szív- és érrendszeri megbetegedések világszerte vezetnek a halálozási statisztikákat. Az összes kardiovaszkuláris betegség mintegy felét az iszkémiás szívbetegegség (ISZB) teszi ki, melynek leggyakoribb megnyilvánulási formái az angina pectoris, a szívinfarktus és az aritmia, elsősorban a kamrafibrilláció miatt fellépő hirtelen szívhalál. 1999-ben a halálozások főbb halálokok szerinti megoszlásában a keringési rendszer betegségei 51,2 %-al az első helyen szerepelnek. Az elmúlt három évben nem változott lényegesen a keringési betegségeks halálozási gyakorisága, ami igen magas szinten stagnáló állapotot jelez. Földrajzi régióként azonban már eltéréseket tapasztalunk: az elmúlt 30 évben a legtöbb fejlett országban (USA, Japán, dél-európai országok) a halálozás csökkent, ugyanakkor a kelet-európai országokban a mortalitás drámaian emelkedett. Egyes becslések szerint – mivel a népesség elöregedésével a kardiovaszkuláris betegségeks előfordulása növekszik – 2020-ra mind a fejlett, mind a jelenleg fejlődő országokban az iszkémiás szívbetegegség lesz a vezető halálokok.

Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arány, ebben a betegségcsoportban Magyarországon 3,2-szer magasabb mint Franciaországban, 2-szer magasabb mint további 7 európai országban. A volt szocialista országokban kiemelkedően magas a keringési betegségeks miatti halálozás, Magyarország közöttük a középmezőnyben helyezkedik el. Ez a riasztó statisztika önmagában indokolja a témakör részletesebb vizsgálatát, hogy választ kapjunk arra, milyen mechanizmusok játszanak szerepet, és milyen hatással vannak a kardiovaszkuláris rendszer funkciójára, a koszorúér-betegegség és az aritmiák kialakulására.

Epidemiológiai megfigyelések alapján jól ismert, hogy a legtöbb fejlett országban az étrend magas zsír-, telítettsírsav, és koleszterintartalma, valamint a jelentős kalória bevitel összefüggésbe hozható a szívbetegegségekből eredő halálozásokkal. Ugyanakkor néhány mediterrán országban, főként Franciaország egyes területein, a jelentős zsír- és telítettsírsav-bevitel mellett abszolút értékben és arányát tekintve is lényegesen alacsonyabb az iszkémiás szívbetegegségeks morbiditása és mortalitása mint más azonos fejlettségű országokban. Tudományos vizsgálatok sokasága próbált magyarázatot keresni a tapasztalt eltérésre, s feltételezték, hogy a jelenség mögött életmódbeli, táplálkozási eltérések húzódnak meg. Az alkohol alacsony dózisban megakadályozhatja a trombózis kialakulását, mivel csökkenti a fibrinogén, és emeli a plazminogén koncentrációt. A fibrinogén koncentrációjának csökkenése visszaszorítja a vérlemezkék koagulációját, és így gátolja az ateroszklerózis kialakulását.

Az IS/RE indukálta szívizomkárosodás alapját képező mechanizmusok meglehetősen összetettek és még ma sem teljes mértékben tisztázottak. Nagy valószínűséggel szerepet játszanak bennük olyan tényezők, mint az α - és β -receptorok, ionok, zsírsavak és foszfolipidek, szabad gyökök, különböző génregulációk, apoptotikus szignálok.

Tennant és Wiggers (1935) megfigyelte, hogy a kamrafibrilláció nemcsak az iszkémiás szakaszban, hanem a keringés visszaállítása után, a reperfúziós szakaszban is nagy intenzitással bekövetkezhet. Vagyis a reperfúzió – mely nélkül az iszkémiás szívizom elhal – aritmiához vezethet. Ennek egyik oka az, hogy azokban a sejtekben, melyek az iszkémia ideje alatt hipoxiássá váltak, a hirtelen reoxigenizáció nagymértékű enzimfelszabadulással és strukturális károsodással jár az iszkémiás metabolitok kimosódása és a szabadgyökképződés miatt. A prekondicionálással társított kardiális védelem jelentősen képes lassítani a szívszövet ATP kimerülését, a szabad gyökök és a kimondottan károsnak tekinthető katabolitok kimosása miatt. Ezt nevezzük a „védelem első ablakának”. Sajnos azonban ez a hatás gyorsan elmúlik. Számos kutató ezután azt vizsgálta, hogy a rövid iszkémia/reperfúziós periódusok hasznosak-e abban az esetben is, hogyha a „hosszú”- idejű iszkémiát nem közvetlenül a prekondicionálás után, hanem azt követően 24 órával idézzük elő. Az eredmény biztató volt, hiszen a prekondicionált szívek sokkal jobb paramétereket mutattak a kontroll (nem-prekondicionált) csoporthoz képest, akár 24 óra múlva is. Ezt nevezték a „védelem második vonalának”. A szív „védelmének első és második ablakának” felfedezése óta számottevő információ és bizonyíték gyűlt össze, ezzel is jelezvén azt, hogy a prekondicionálás csakugyan lényeges az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások megelőzésében. Felmerült a gondolat, hogy a prekondicionálás elősegíti különböző endogén védő anyagok képződését és felszabadulását mint, pl.: a nitrogén-monoxid, bradikinin, prosztaciklin és adenzin, amelyek antiiszkémiás és antiaritmiás hatással rendelkeznek. A valósághoz azonban hozzátartozik, hogy a pontos hatásmechanizmus a mai napig nem tisztázott és nem elfogadott. Fontos kiemelnünk, hogy az állatkísérletek túlnyomó többségét a PC és a hozzá tartozó mechanizmusok terén, nagyrészt egészséges állatszíveken végezték (nyúl, patkány, kutya vagy sertés), az előzetes koronária vagy miokardiális sérülések nélkül. Ily módon a kapott eredmények patofiziológiai és klinikai jelentősége korlátozott, és ez laboratóriumi és klinikai dilemmához vezet.

A miokardiális IS/RE során a szívizomsejtek pusztulása kétféle mechanizmuson, apoptózison és nekrozison keresztül történhet. Már korábban leírták, hogy az apoptózis – a programozott sejthalál egy morfológiailag jól definiált formája – hozzájárulhat a miociták irreverzibilis károsodásához a DNS-fragmentáció útján. Az elmúlt két évtizedben számos vizsgálatot végeztek annak érdekében, hogy csökkentsék az IS/RE okozta sejthalál és ez által

az infarktusos terület mértékét. Nyilvánvalóan azon gyógyszerek amelyek képesek gátolni az apoptózist, azok képesek lehetnek az IS/RE során létrejött szövetkárosodást is kivédeni.

A szívizkémia a gyulladással is összefüggő folyamat. A gyulladással kapcsolatos tanulmányozása során, a nem szteroid gyulladásgátlók mellett, egyre nagyobb figyelmet kapott a proopiomelanokortin (POMC) egyik származéka, az α -melanocyt-stimuláló hormon (α -MSH), amely sokrétű hatása mellett endogén neurotroph, neuroprotektív, citoprotektív és neuroimmunmodulátor hatású szernek bizonyult. A legújabb megfigyelések szerint fontos szerepet játszik a felnőttkori obesitas kialakulásában azáltal, hogy az MC-4 receptorokon keresztül részt vesz a leptin hatásának közvetítésében. Kimutatták, hogy a centrális α -MSH-erg rendszer aktivitása csökken I-típusú diabéteszben, és inzulin pótlás hatására e változás megfordítható. A perifériás idegekben az α -MSH tartalom megnövekszik diabéteszes állatokban.

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

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

Az apoptózis kialakulásának megakadályozására számtalan farmakológiai lehetőség rendelkezésre áll, mint ahogyan arról számos szerző is beszámolt egéren, patkányon és nyúlön egyaránt.

Célkitűzések

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

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

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

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

Módszerek és anyagok

Izolált „dolgozó-szív” preparátum készítése:

Kísérleteinkhez hím Sprague-Dawley patkányokat és New-Zealand nyulakat (2,2-2,6 kg) használtunk. Az állatok a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásainak megfelelően voltak tartva és felhasználva.

a, Az α -MSH előkezelés:

A patkányok 3 csoportját külön-külön 40 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ és 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ koncentrációjú α -MSH oldattal kezeltük elő, melyet a háti részbe injektáltunk subcutan. Egy mg α -MSH feloldására 50 μl 0,1 M-os ecetsavat használtunk, és ehhez adtuk a kellő mennyiségű fiziológiás sóoldatot. A kontroll állatok hatóanyag nélküli oldatot kaptak. A szívek izolálását megelőzően intravénásan (iv.) heparint adtunk az állatoknak a trombusok kialakulásának megelőzésére.

b, A hiperkoleszterinémia létrehozása nyulakban:

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

c, Előkezelés standardizált szőlőkivonattal:

A kísérlet során a kb. 300 g tömegű hím Sprague-Dawley patkányok 3 csoportját külön-külön 3 héten keresztül 50 mg/ttkg, 100 mg/ttkg, 200 mg/ttkg koncentrációjú standardizált szőlőkivonattal etettük naponta. A koncentráció legpontosabb bejuttatásához gyomorszondát használtunk. A SSZK-t piros, zöld és kék-fekete szőlők, magvas és mag nélküli változataikból állították elő. A SSZK konzisztenciája szárított finom por volt. A kontroll állatok szintén gyomorszondán keresztül, 100 g testtömegre vonatkoztatva 45 μg glükóz és 45 μg fruktóz elegyét kapták naponta. Az anesztéziát 65 mg/ttkg koncentrációjú pentobarbitál oldattal idéztük elő, a véralvadás megakadályozására pedig 500 IU/ttkg heparint alkalmaztunk intravénásan.

A mellkas megnyitása után mindhárom kísérlet során ugyanúgy jártunk el. A szíveket kimetszettük és hideg perfúziós oldatba (Krebs-oldat) helyeztük. A preparálást követően a

szíveket az aortán és a vena pulmonalis-on keresztül ún. izolált „dolgozó-szív” perfúziós készülékkel tartottuk életben.

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

Iszkémia/reperfúzió kiváltása:

A „mosási” periódust követően a készüléket dolgozó módba kapcsoltuk Tíz perc aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, s így meghatározott ideig (30 percig) „globál iszkémiát” hoztunk létre. A reperfúzió indításához megszüntettük az elzárásokat, s a reperfúziós fázis időtartama 120 perc volt.

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

A posztiszkémiás szívfunkciók mérése, és a reperfúzió indukálta kamra fibrilláció regisztrálása:

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

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

Az α -MSH hatásának vizsgálata az apoptosis folyamatára:

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

Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata:

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

A másik lehetőség, hogy a globál iszkémia után festjük meg a szíveket 1 %-os TTC-oldattal. A vizsgálat után mindkét esetben a szíveket $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd a fagyott miokardiumból metszeteket készítettünk az apiko-bazális tengelyre merőleges síkban. A metszetek tömegét megmértük, és szárítás után két üveglap közé helyezve őket egy szkener és egy planimetriás software segítségével meghatároztuk valamennyi metszet infarktusos területének értékét. Ezen területértékeket megszoroztuk a metszetek tömegeivel, és az eredményeket összegeztük. Végül az infarktusos területek nagyságát százalékosan fejeztük ki az infarktust szenvedett szívizom tömege és az össztömeg hányadosaként. Regionális iszkémiát váltottunk ki az α -MSH vizsgálata során, globál iszkémiát pedig a SSZK és a PC vizsgálatánál.

A malonaldehid monitorozása:

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

A SSZK szabadgyökfogó tulajdonságának mérése:

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

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

Iszkémia/reperfúzió kiváltása prekondicionált szívekben:

A PC nem más, mint rövid periódusú IS/RE-s folyamatok egymás utáni ismétlése, annak ciklusszámától függően (1XPC, 2XPC, 3XPC és 4XPC). A rövid periódus kísérleteinkben 5 perc globál iszkémia és 5 perc reperfúziót jelent. A PC-t a hiperkoleszterinémias és nem-hiperkoleszterinémias csoport nyulaival is elvégeztük (csoportonként 6 állat). A PC befejezése után 30 perc globál iszkémia következett, amit 120 perc reperfúzió követett.

Statisztika:

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

Eredmények

I. Az α -MSH hatása

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

A 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ és 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ koncentrációjú α -MSH kezelés csökkentette a kamrai fibrillációk kialakulását a kezeletlen kontroll értékhez viszonyítva 92 %-ról, 17 %-ra ($p < 0,05$) és 25 %-ra ($p < 0,05$). A 200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ ill. 400 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ α -MSH kezelés következtében a csökkenés statisztikailag szignifikánsnak bizonyult.

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

2/a. α -MSH hatása a szívfrekvenciára:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH kezelésben részesült állatok LVDP értékei nem javultak számottevő mértékben a kontroll csoport értékeihez képest, ellenben a $200 \mu\text{g/ttkg}$ ill. $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-al kezelt állatok értékei szignifikáns növekedést mutattak. A nagyobb dózissal kezelt állatok LVDP értékeinél – az aorta kiáramlás értékeihez hasonlóan – már a preiszkémias fázisban is javuló tendenciát látunk a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, bár ez nem szignifikáns.

3.) α -MSH hatása az apoptózisra:

Az IS/RE során károsodott kezeletlen kontroll, ill. a $40 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok esetében észlelhető a „DNS-létra”, hiszen létrejött a programozott sejthalál folyamata, amit a DNS fragmentációja jelez. A $200 \mu\text{g/ttkg}$ és $400 \mu\text{g/ttkg}$ α -MSH-val kezelt állatok esetében pedig gyakorlatilag ugyanaz látható, mint a nem iszkémias, aerob kontrollnál, azaz a

DNS töredezése elmarad. Ezek után indokoltan kezdtünk bele a következő munkafázisba, hiszen ha az előkezelés gátolta az apoptózist, akkor nagy valószínűséggel képes csökkenteni az infarktusos terület nagyságát is.

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

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

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

II. A prekondicionálás hatása

1.) A koleszterin diéta hatása a szérumszintre:

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

2.) A prekondicionálás hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére:

Tanulmányaink második részében a PC hatásait hasonlítottuk össze a nem-hiperkoleszterinémiás és a hiperkoleszterinémiás csoport eredményeinek tükrében. A posztisztkémiás szívfunkciók együttes értékelésére azért van szükség, mert ez így képez komplex logikai rendszert. Az iszkémia előtti vizsgálatokban azt találtuk, hogy a nem-hiperkoleszterinémiás csoport HR, CF, AF, LVDP értékeihez képest a hiperkoleszterinémiás csoport ugyenezen értékei szignifikáns csökkenést mutattak ($p < 0,05$). Mivel kísérleteinknek

nem az volt a fő célja, hogy választ kapjunk a koleszterindiéta hatásaira, így ezen értékek leírásától és diszkussziójától eltekintek.

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

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

A nem-hiperkoleszterinémiás csoportban a pozitív kontroll LVDP értéke a reperfúzió 60. percében $7,7 \pm 0,5$ kPa, a 120. percben $2,4 \pm 0,5$ kPa. Ezen érték a 3XPC hatására a 60. percben $11,4 \pm 0,9$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $6,7 \pm 0,8$ kPa ($p < 0,05$) és a 4XPC hatására a 60. percben $12,8 \pm 0,8$ kPa ($p < 0,05$), a 120. percben $7,6 \pm 0,9$ kPa ($p < 0,05$). Az egészséges állatokra tehát ebben az esetben is kedvezően hatott a PC.

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

3.) Prekondicionálás hatása az infarktos terület nagyságára:

Az egészséges (C) állatok szíveinek több mint harmad része (39 ± 6 %) elhalt a 30 perc iszkémia és a 120 perc reperfúzió során. A PC ciklusszámától függően, az elhalt terület

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

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

A nem-hiperkoleszterinémias kontroll (C) csoportban a 30 perc iszkémiát követően 17 %-ban fordult elő a VF és 33 %-ban a VT. Ebben a kísérletben az iszkémia előtt nem alkalmaztunk PC-t, mert arra voltunk kíváncsiak, hogy a koleszterindiéta milyen módon befolyásolja a szív aritmiára való hajlamát. Várakozásunknak megfelelően, ezek az értékek mindkét esetben (VF, VT) 50 %-ra növekedtek a hiperkoleszterinémias állatok esetén, ami azt jelenti, hogy a koleszterindús táplálék bevitele kimondottan hátrányosan érintette a HC-ás csoport tagjait. Kísérletünkben arra is választ kerestünk, hogy mi történik akkor, ha a két csoport elemeit 4XPC-nak vetjük alá a 30 perces iszkémia előtt. A 4XPC-t azért választottuk, mert az befolyásolta legnagyobb mértékben a posztiszkémiás szívfunkciókat és az infarktusos terület nagyságát is. Az egészséges patkányoknál (C) a 4XPC a VF-ót 8 %-ra, a VT-át pedig 17 %-ra csökkentette. A (HC)-ás állatokban ezek az értékek mindkét esetben (VF, VT) 67 %-ra emelkedtek, ami egy fokozott aritmiakészséget mutat. Előző kísérleteinkkel analóg módon a PC itt sem hozott pozitív eredményeket a „beteg” csoport szempontjából.

III. A SSZK hatása

1.) A SSZK hatása a posztiszkémiás szívfunkciók felépülésére:

1/a. SSZK hatása a koronária átáramlásra:

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

1/b. SSZK hatása az aorta kiáramlásra:

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

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

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

1/c. SSZK hatása a bal kamrai nyomásra:

A kezeletlen csoport bal kamrai nyomás értékei a RE folyamán $14,8 \pm 0,7$ kPa értékről 60 perc elteltével $5,7 \pm 0,5$ kPa-ra, illetve 120 perc elteltével $5,5 \pm 0,4$ kPa-ra változtak. Az 50 mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei a fentiek alapján $14,5 \pm 1,0$ kPa-ról $7,5 \pm 0,8$ kPa-ra, ill. $5,2 \pm 0,5$ kPa-ra módosultak. A 100 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok értékei $14,1 \pm 0,5$ kPa-ról $12,7 \pm 0,8$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $8,2 \pm 0,6$ kPa-ra ($p < 0,05$), míg a 200 mg/ttkg SSZK-al előkezelt állatok értékei $14,7 \pm 0,9$ kPa-ról $12,9 \pm 0,7$ kPa-ra ($p < 0,05$), ill. $8,9 \pm 0,6$ kPa-ra ($p < 0,05$) változtak.

Az 50 mg/ttkg SSZK kezelésben részesült állatok LVDP értékei nem javultak számottevő mértékben a kontroll csoport értékeihez képest, ellenben a 100 mg/ttkg ill. 200

mg/ttkg SSZK-al kezelt állatok értékei szignifikáns növekedést mutattak. A nagyobb dózisokkal kezelt állatok LVDP értékei az aorta kiáramlás értékeihez hasonlóan, szignifikáns különbséget nem mutattak, a preiszkémias fázisban. AZ LVDP értékei is bizonyítják, hogy a megfelelő dózisú standardizált szőlőkivonat szignifikánsan javítja a patkányszív pumpafunkcióját.

1/d. SSZK hatása a kardiális kiáramlásra:

A kardiális kiáramlás értéke, a szívből kiáramló összefolyadék mennyisége, azaz a koronária átáramlás és az aorta kiáramlás összege, amelyeket az előző két ábra értékeiből pontosan kiszámolhatók. A 100 mg/ttkg és a 200 mg/ttkg SSZK szignifikáns javulást okozott a kardiális kiáramlásban ($p < 0,05$).

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

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

A 200 mg/ttkg SSZK hasonlóan jótékony hatásúnak bizonyult, hiszen az értékeket szívizom összehúzódásonként $0,25 \pm 0,06$ ml-ről $0,17 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) ill. $0,15 \pm 0,01$ ml-re ($p < 0,05$) javította.

2.) SSZK hatása az infarktusos terület nagyságára:

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

terület nagyságának tekintetében, mert $20,2 \pm 0,5$ %-ra ($p < 0,05$) csökkentette az infarktus kiterjedését.

3.) SSZK hatása a szívben lévő malonaldehid koncentrációra:

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

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

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

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

Diszkusszió

a, α -MSH kezelés:

Számos tényezőről bizonyították, hogy kritikus szereppel bír az IS/RE indukálta szívizomkárosodás kialakulásában, de ezen tényezők fontossága ma még nem egyértelműen

igazolt, sőt néha ellentmondásos. Kísérleteink egyik részében igazoltuk, hogy a 200 µg/ttkg és a 400 µg/ttkg α-MSH előkezelés a posztisztkémiás periódus alatt szignifikánsan javította a CF, AF, ill. LVDP értékeket összehasonlítva a kezeletlen kontroll állatok értékeivel.

Már korábban leírták, hogy a szívfrekvenciát csökkentő vegyületek (gyógyszerek) képesek megvédeni a miokardiumot az IS/RE káros hatásaitól. Fontos megjegyezni, hogy kísérleteinkben az α-MSH protektív hatásához nem kapcsolódik semmilyen változás a szívfrekvenciában. Mivel az α-MSH kezelést az iszkémia kiváltása előtt 12 órával hajtottuk végre, így arra következtethetünk, hogy a protektív hatás jelentős része már a preisztkémiás fázisban bekövetkezik. Ezt a megállapítást támasztja alá az a tény is, hogy a 200 µg/ttkg és 400 µg/ttkg α-MSH-val előkezelt állatok preisztkémiás AF és LVDP értékei megnövekedtek a kontroll csoport értékeihez képest. Érdekes ugyanakkor, hogy a CF értékeinél nem tapasztaltunk hasonló változást a preisztkémiás fázisban, bár a reperfúziós fázis alatt regisztrált értékek az AF és az LVDP értékeihez hasonlóan szignifikáns mértékben javultak a kontroll csoportok értékeihez viszonyítva.

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

A reperfúzió során fellépő aritmiák kialakulását a 200 µg/ttkg és a 400 µg/ttkg α-MSH előkezelés redukálta, védve ezzel a szívet a kimerüléstől. Felmerül a kérdés, hogy a reperfúzió során megfigyelt antifibrillációs hatás az α-MSH hatásainak direkt következménye, vagy másodlagosan jelentkezik más mechanizmusokhoz kapcsoltan.

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

Érthető feltételezésünk volt, hogy ha az apoptózis mértéke az előkezelések hatására csökkent, akkor az α -MSH képes lehet limitálni az infarktusos terület nagyságát is, mivel a nekrotizált sejtek között apoptotikus sejteket is találtak az infarktusos területeken. Bár még nem tisztázott, és nem is képezi jelen tanulmány tárgyát annak eldöntése, hogy milyen mértékben szerepel az apoptózis és a nekrozis külön-külön a miokardiális infarktus kialakulásában, de valószínűleg egy „nefro-apoptotikus” mechanizmus idézi elő a sejtkárosodást. Az α -MSH és a melanokortin peptidek gyulladáscsökkentő hatását több esetben, így artritiszben és iszkémiában is igazolták. Ez a hatás gyakran hozható összefüggésbe gyulladást kiváltó citokinek – mint az interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6 és tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) – csökkent termelődésével, illetve gyulladáscsökkentő citokinek – interleukin-10, interleukin-8 – megnövekedett mennyiségével.

A kísérletsorozatról egyértelműen kitűnik, hogy a 200 μ g/ttkg és a 400 μ g/ttkg α -MSH előkezelés az infarktusos terület nagyságát szignifikáns mértékben csökkentette. Az eredményeket elemezve feltűnik, hogy a 200 μ g/ttkg és a 400 μ g/ttkg α -MSH előkezelés hatásai nem különböznek egymástól szignifikáns mértékben. Ez felveti annak a valószínűségét, hogy az α -MSH hatása, illetve a hatás kialakulásában legalább részben szerepet játszó MC-receptorcsalád szaturálódik.

b, Prekondicionálás hatása:

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

összetett mechanizmusok interakciójáról van szó, mintsem egy egyszerű folyamatról, amely egyedül lenne felelős a prekondicionálás jótékony hatásáért.

Az egészséges szíven megfigyelt jótékony hatások ellenére egy előzőleg károsodott, beteg szív egészen másképp reagálhat a prekondicionálásra, mint az egészséges szívszövet. Éppen ezért tartottuk fontosnak, hogy PC kísérleteinket ne csak egészséges, hanem beteg szíveken is elvégezzük.

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

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

A prekondicionálás kardioprotektív hatásának elmaradásáról mások is beszámoltak. „Pacing”-el indukált prekondicionálás során, szintén a kardioprotektív hatás elmaradását tapasztalták ateroszklerotikus nyulakban. Hiperlipidémiás csoportban vizsgálták a ballon ismételt felfújásának hatásait angioplasztika során. Kísérleteik azt mutatják, hogy a miokardiális iszkémia redukciója elmaradt a beteg csoportban, azonban a koleszterol plazma

szintjének csökkentésével a kardioprotekció megjelenésére számíthatunk. A fentiek alapján láthatjuk, hogy a hiperlipidémia negatív módon befolyásolja a PC hatásait, bár ennek a pontos okát azonban még nem tudjuk. A mitokondriális és szarkolemma membrán mikroviszkozitásának megváltozása ill. a lipidek akkumulációja és redisztribúciója a miocitákban feltehetően inkább felelőssé tehető, mintsem a szérumban magas lipoprotein szintje, mivel a miociták morfológiai változása már tíz napos koleszterindús diéta esetén kimutatható. Ezzel összhangban előrehaladott HC esetén a prekondicionált, iszkémia/reperfúzióknak kitett szívszövet nem képes regenerálódni, így egyre jobban romló szívfunkciókat, az infarktus kiterjedését, aritmiákra való nagyobb hajlamot mutatnak.

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

Eredményeink tehát a nem-hiperkoleszterinémias csoportban megerősítették a prekondicionáló iszkémiás periódusok védő hatását a későbbi hosszabb iszkémia után vizsgált hemodinamikai, elektrofiziológiai és patomorfológiai paramétereken. Ezzel szemben a hiperkoleszterinémias csoportban a PC szignifikánsan rontotta mind az élettani, mind a patomorfológiai paramétereket, a prekondicionáló periódusok számával (tendenciát tekintve) egyenes arányban. Ez arra utal, hogy hiperkoleszterinémiában a rövid időtartamú iszkémiás periódusok nem „prekondicionáló”, hanem sokkal inkább károsító hatásúak.

Vizsgálataink megerősítették azt a korábbi megfigyelésünket, hogy az iszkémiás prekondicionálás, mint a szív iszkémiás adaptációját fokozó jelenség, az egészséges szívre jellemző. A hiperkoleszterinémias állapotban tapasztalható, nem pontosan ismert mechanizmussal létrejövő válaszképtelenség a rövid időtartamú iszkémiás periódusok

prekondicionáló ingerére aláhúzza a diszlipidémia kóroki szerepét a fejlett országokban népbetegségnek számító kardiovaszkuláris megbetegedésekben.

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

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

c, SSZK hatása:

Kísérleteink harmadik fázisának eredményei azt mutatják, hogy a 100 mg/ttkg és a 200 mg/ttkg SSZK-al etetett állatok ellenállóbbak az iszkémia/reperfúzió során létrejött miokardiális károsodásokkal szemben, mint a SSZK-al nem etetett kontroll állatok. A SSZK-al etetett patkányok szívei szignifikáns javulást mutattak a posztiszkémiás funkciók, infarktusos terület tekintetében a kontroll állatokhoz képest. A SSZK-al etetett állatok szívében a malonaldehid koncentráció is kisebb volt, bizonyítva ezzel a SSZK in vivo antioxidáns tulajdonságát. A kontroll állatok 100 g testtömegre vonatkozóan 45 µg glükózt és 45 µg fruktózt kaptak, ezzel egyértelműen kizártuk azt, hogy a jótékony hatásokért a glükóz és a fruktóz a felelős. Az oxidatív stressz és a szabadgyökök kulcsfontosságú szerepet játszanak a különböző szívbetegségekben mint pl.: a kongesztív szívelégtelenség, kardiomiopátia, hipertrófia, ateroszklerózis és iszkémiás szívbetegség. Normál állapot esetén egy egészséges egyensúly áll fenn a szabadgyökök képződése és az antioxidáns hatású enzimek és „scavenger”-ek között. Ennek az egyensúlyi állapotnak a zavara esetén lecsökken a gyökfogók kapacitása és megnő a szabadgyökök koncentrációja. A szabadgyökök közül a szuperoxid-anion (O_2^-) a legártalmatlanabb, a hidroxil szabadgyök (OH^\cdot) pedig a legveszélyesebb a sejtekre. A biomolekulák, beleértve a lipideket, a proteineket, és a DNS-t

is, potenciális célpontjai a **OH[·]** gyöknek, ebből kifolyólag maradandó károsodás érheti a sejteket és szöveteket. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a SSZK közvetlenül is képes a szabadgyökök közömbösítésére, mely a malonaldehid szint szignifikáns csökkenésében nyilvánult meg a SSZK-al kezelt csoportoknál. Az iszkémia/reperfúzió során felszabaduló szabadgyökök nem képesek kifejteni káros hatásukat, a SSZK antioxidáns tulajdonsága révén, védve így a szívet az aritmiától és egyéb károsodástól.

A vörösborban lévő antioxidánsokról már évek óta kiderült, hogy jótékony hatással bírnak az emberi szervezetre, mind a daganatok kifejlődésének megakadályozásában, mind a kardioprotekció terén. Mivel a vörösbor alapanyaga a szőlő, így elvileg ugyanazon hatóanyagok találhatóak meg mindkettőben csak más arányban és mennyiségben. Éppen ezért tanulmányaink során arra kerestük a választ, hogy a standardizált szőlőkivonatnak megvan-e ugyanazon jótékony hatása mint a vörösbornak. A szőlő a többi zöldséggel és gyümölccsel ellentétben nagy hányadban tartalmaz antioxidáns sajátságú polifenolokat. Az egyik legfontosabb összetevője a resveratrol majdnem kizárólag a szőlőben fordul elő a hazai élelmiszerek közül. A resveratrol a reperfúzió indukálta szövetkárosodások csökkentése mellett nagyon hatékonyan bizonyult a nekrozis és az apoptózis visszaszorításában is, sőt a daganatok kemopreventív aktivitásában is kulcsfontosságú szerepet játszik, s ebben a témakörben antimutagén anyagként olvashatunk róla. Képes gátolni a trombocitaaggregációt, ami köztudott, hogy az egyik legnagyobb rizikófaktor az ateroszklerózis kialakulásában. Érdekes jelenség még, hogy a resveratrol antioxidáns tulajdonsága révén PC 12 sejtekben csökkentette az oxidatív stresszt. A resveratrol jótékony hatásai mellett meg kell még említenünk a szőlőmagkivonatból nyert proanthociánok kardioprotektív hatását, melynek során csökkent a kamrai aritmiák előfordulása, valamint az apoptotikus kardiomiociták száma is. A szőlőmagból kivont proanthocyánok gátolni képesek proapoptikus géneket pl.: JNK-1 és c-Jun.

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

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

Közlemények:

1. **Juhász B**, Der P, Turoczi T, Bacskay I, Varga E, Tosaki A. (2004) Preconditioning in Intact and Previously Diseased Myocardium: Laboratory or Clinical Dilemma? *Antioxid. Redox Signal.* 6, 325-333. **IF: 3.027**
2. Vecsernyes M, **Juhász B**, Der P, Kocsan R, Feher P, Bacskay I, Kovacs P, Tosaki A. (2003) The administration of α -melanocyte-stimulating hormone protects the ischemic/reperfused myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 177-83. **IF:2.352**
3. Cui J, **Juhász B**, Tosaki A, Maulik N, Das D. (2002) Cardioprotection With Grapes. *J. Cardivasc. Pharmacol.* 5, 762-9. **IF: 1,602**

Az értekezéshez fel nem használt, de a témához kapcsolódó közlemények

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