

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az alfa-melanocita stimuláló hormon akut és krónikus hatásai a hemoxigenáz szignál-transzdukcióra, egészséges, illetve Zucker Diabetic Fat (ZDF) patkánymodellen

Dr. Szokol Miklós

Témavezető: Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2021.

AZ ALFA-MELANOCYTA STIMULÁLÓ HORMON AKUT ÉS KRÓNIKUS
HATÁSAI A HEMOXIGENÁZ SZIGNÁL-TRANSZDUKCIÓRA,
EGÉSZSÉGES, ILLETVE ZUCKER DIABETIC FAT (ZDF)
PATKÁNYMODELLEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szokol Miklós okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája

(kardiovaszkuláris megbetegedések doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Juhász Béla

Az értekezés bírálói: Dr. Fehér Pálma PhD

Dr. Dér Péter PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György akadémikus

tagok: Dr. Fehér Pálma PhD

Dr. Dér Péter PhD

Dr. Szabó Renáta PhD

Dr. Deák Ádám PhD

Az értekezés védeése online történik 2021.03.26-án 11.30 órai kezdettel. A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni a vitán, úgy jelezze a juhasz.bela@med.unideb.hu email címre küldött üzenettel a vitát megelőző nap 2021.03.25. 16.00 óráig. A tárgymezőbe kérjük beírni: Szokol Miklós részvételi szándék.

1. BEVEZETÉS

A 2-es típusú cukorbetegség (T2DM) egy krónikus, életet veszélyeztető metabolikus rendellenesség, melyet magas szisztémás cukorszintek, inzulinrezisztencia, valamint a diszregulált gyulladás következményeként több szerv károsodása jellemez. Sajnálatos módon, az érintettek egész életét végigkíséri a betegség, és problémák széles skáláját okozhatja, úgymint: retinopátia, nefropátia, miokardiális infarktus, stroke, valamint a végtagok ereinek súlyos károsodása, mely akár amputációhoz is vezethet. Fontos megemlítenünk a szívizom fokozott vulnerabilitását, amely aritmiára hajlamosít. A T2DM farmakoterápiáját jelenleg a biguanidok, szulfonil-ureák, α -glükozidáz gátlók, tiazolidindionok, Na⁺-glükóz kapcsolt transzporter-2 (SGLT-2) gátlók, glukagon-szerű fehérje-1 (GLP-1) analógok, dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-4) gátlók, amylin analógok, és egyes esetben az inzulin analógok alkotják. Ezek a hatóanyagok részben normalizálhatják a vércukorszintet, és enyhíthetik a betegség súlyos következményeit, hozzájárulva számos beteg állapotának javításához. Mindazonáltal, ezek a szerek csak palliatív megoldások, és általában nem tudják a páciens egészségét teljesen helyreállítani. Egyes epidemiológiai felmérések kimutatták, hogy a betegség incidenciája drámaian nőtt az utóbbi időben, már-már epidémiái méreteket öltve. Számos faktor hozzájárult ehhez a jelenséghez, elsődlegesen a mozgásszegény életmódból eredő tényezők, mint a túltápláltság, a fizikai aktivitás hiánya és főként a túlsúly, illetve elhízás. A T2DM kialakulásával és patogenezisével szembeni ellenintézkedések legfőképp a fiziológiás energiafelhasználást szabályozó mechanizmusokat célozzák. Ezen a csoporton belül az általunk is vizsgált melanokortin rendszer meghatározó szerepet játszik az egész szervezet energia homeosztázisának beállításában, mivel a rendszer egyes tagjai étvágycsökkentő tulajdonságuknak köszönhetően potens anorexigén hatással bírnak, míg mások fokozzák a táplálékfelvételt, ezáltal állítják be az egyensúlyt. A melanokortinok erősen befolyásolják az elhízás kialakulását, és járulékosan csökkentik a T2DM kialakulásának vagy rosszabbodásának kockázatát. Az is ismert, hogy a melanokortin analógok mind centrális, mind pedig perifériás injektálása drámaian megváltoztatja a táplálékfelvételt és a testsúlyt. Genetikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a melanokortin rendszer bármely tagjának génjében bekövetkezett mutáció összefüggésbe hozható az elhízás és a T2DM kialakulásával mind állatok, mind emberek esetében. Mechanikai kutatások kiderítették, hogy az alfa-melanocita stimuláló hormon (α -MSH), egy, a melanokortin családba tartozó neuropeptid, melyet test szerte számos különböző sejt expresszál változó mennyiségben, és mely a melanokortin (MC) 5 receptor aktiválása után a ciklikus adenzin monofoszfát/protein kináz A (cAMP/PKA), valamint a mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál-regulált kináz (MAPK/ERK1) útvonalon keresztül szignifikánsan csökkenti az adipociták zsírtartalmát. Az anorexigén hatáson túl, az α -MSH számos egyéb jótékony hatását mutatták be különböző állatkísérleti modellekben, melyek alapján kiderült, hogy anti-apoptotikus, anti-inflammatorikus, antiiszkémiás, valamint antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik. A vegyület a melanokortin receptorok nem-szelektív teljes agonista molekulájaként működik, és fejt ki hatását. A normál homeosztázisban betöltött szerepei közé

tartozik a haj és bőr pigmentációjának szabályozása, reproduktív funkció, valamint táplálékfelvétel és energia metabolizmus szabályozása. Kutatásaink szempontjából a legjelentősebb hatása az inzulinérzékenyítő hatás, illetve az iszkémia/reperfúzió-s (I/R) sérülésekkel szembeni endogén védekezés. Például miokardiális iszkémia/reperfúzió-nak kitett patkányok szív-, illetve májszöveti válaszainak befolyásolásáról szóló kísérletek igazolták a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) által okozott gyulladásos szövetkárosodás, valamint apoptotikus sejtpusztulás mérséklődését, mely bal kamrai kardioprotektív hatást eredményez, és mely a Janus kináz/ extracelluláris szignál-regulált kináz/transzkripciós szignál transzducer (JAK/ERK/STAT) szignalizáció modulációján keresztül valósul meg. Ismertek kifejezetten az α -MSH-indukált HO-1 fehérje expresszió és enzimaktivitás által mediált védő hatások is. Ezzel összhangban számos tanulmány a szívmot ért I/R károsodások elleni védekező rendszer egyik legfontosabb tagjaként említik a HO-1-et, hangsúlyozva annak jelentőségét. Mindazonáltal, a kardiomiocitában a hosszútávú α -MSH-kezelés, illetve az α -MSH/HO-1 indukció hatására létrejövő molekuláris változások csupán részben tisztáztak. A fenti eredmények alapján, illetve a HO-1 által befolyásolt, humán gyógyítás vonatkozásában relevanciával bíró folyamatok azonosítására történő erőfeszítésünknek megfelelően, ez a tanulmány az α -MSH HO-1 által közvetített, diabéteszben megjelenő, illetve kimondottan kardiovaszkuláris hatásokban betöltött szerepét, valamint a háttérben zajló celluláris folyamatokat hivatott felderíteni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az I/R kardiális fiziológias értékekre gyakorolt hatásának vizsgálata α -MSH-val előkezelt állatokból eltávolított izolált működő szíveken.
2. A változások HO-1 aktivitástól való függőségének vizsgálata, a szelektív HO-1 inhibitor molekula, az ón- protopofirin (SnPP) segítségével.
3. Ozmotikus mini pumpa segítségével hosszabb ideig fenntartott α -MSH stimuláció kardio-metabolikus paraméterekre, diasztolés szívfunkcióra és miofilament kooperációra gyakorolt hatásának demonstrálása 'Zucker diabetic fatty' (ZDF) patkánymodellben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kutatásunk első fázisában hím, 300-350 g súlyú Sprague-Dawley patkányokat, második fázisában pedig hím, 300-350 g súlyú (10 hetes, n=12) Zucker Diabetic Fat (ZDF-Leprfa) patkányokat vizsgáltunk. Az állatokat 20-24°C közötti hőmérsékleten, váltakozó fényviszonyok (12-12 h világos, illetve sötét periódus) mellett tartottuk. A Sprague-Dawley patkányokat normál rágcsáló táppal, míg a ZDF állatokat speciális, Purina 5008, táppal etettük. Mindkét faj tetszőleges mennyiségű (ad libitum) tápot ill. vizet fogyaszthatott.

3.2. Etikai irányelvek

A kísérleti állatok humánus bánásmódban részesültek, az Európai Unió 2010/63/EU rendeletének „Laboratóriumi Állatok Ellátásának Alapelvei” szerint, megfelelően az Orvosi Kutatások Nemzeti Társaságának, valamint a Laboratóriumi Állatok Ellátásáról és Használatáról szóló Iránymutatásnak, amit a Nemzeti Tudományos Akadémia szerkesztett, és a Nemzeti Egészségügyi Szervezet publikált (NIH Publikációs No. 86-23, javított 1985-ben). Az összes általunk használt protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága vette nyilvántartásba (DE MÁB 45/2001 és DE MÁB 35/2007) és Hajdú-Bihar Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás, valamint a Hajdú-Bihar Megyei Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyezte. A kísérletek kezdete előtt 4 hetes adaptációs periódust biztosítottunk az állatok számára.

3.3. Kísérleti elrendezés

3.3.1. Első fázis

Az első fázishoz 5 alapprotokollt dolgoztunk ki.

- I. α -MSH előkezelés hatásának vizsgálata a kardiális HO-1 expresszióra iszkémia/reperfúziós sérülés esetén.

16 egészséges, 300-330 g súlyú, hím Sprague Dawley patkányt 2 csoportra osztottunk (n=8/csoport). Az I-a csoport tagjai 0,5 mL fiziológiás sóoldatot kaptak szubkután, 24 órával az izolált szívmodell kivitelezése előtt (lásd az Izolált „dolgozó szív” c. részt), az I-b csoport állatai 250 μ g/ttkg α -MSH oldatot (fiziológiás sóoldatban oldva) kaptak szubkután, 24 órával az izolált szívmodell elvégzése előtt. Az izolált „dolgozó szív” modell kivitelezése során az állatok szívét iszkémia/reperfúzióval tettük ki (lásd a Globális iszkémia és reperfúzió indukálása izolált „dolgozó szíven” c. részt). A miokardiumból származó mintákat folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk a további Western Blot analízisig.

- II. A HO-1 útvonal jelentőségének felderítése az α -MSH kardioprotektív hatásaiban

A II. protokoll szerint egy másik Sprague Dawley patkánypopulációt alkalmaztunk (50 állat), melyet 4 csoportra osztottunk az izolált „dolgozó szív” modellt 24 órával megelőző előkezelés alapján: a II-a csoport tagjai (n=15) szubkután 0,5 mL fiziológiás sóoldat injekciót kaptak; a II-b csoport állatai (n=14) szubkután 250 µg/ttkg α-MSH oldatot (fiziológiás sóoldatban oldva) kaptak; a II-c csoportba tartozó patkányok (n=11) intraperitoneálisan 50 µg/ttkg SnPP-t 0,5 mL fiziológiás sóoldatban feloldva kaptak 250 µg/ttkg szubkután α-MSH oldattal együtt; míg a II-d csoport állatai (n=10) csak 50 µg/ttkg SnPP-t 0,5 mL fiziológiás sóoldatban feloldva kaptak intraperitoneálisan. Az izolált „dolgozó szív” modell kivitelezése során az állatok szívét iszkémia/reperfúciónak tettük ki. A kísérlet végpontjaként a miokardiumszövetből származó mintákat vagy folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk a további HO-1 aktivitás meghatározásáig vagy megfestettük őket az infarktálódott terület nagyságának megállapításához (TTC festés), amit folyékony nitrogénnel történő lefagyasztás és -80 °C-on történő tárolás követett.

III. Az α-MSH direkt kardiális hatásainak megbecsülése izolált „dolgozó szív” modellen

Kezelésben nem részesülő Sprague Dawley patkányok szívét (n=8) használtuk izolált „dolgozó szív” modell kivitelezéséhez iszkémia/reperfúzió nélkül. 10 perc módosított Krebs-Henseleit pufferrel történő retrográd perfúzió (kimosási periódus) után a készüléket anterográd módra kapcsoltuk („dolgozó szív”), és mértük a kiindulási paramétereket (AF, CF, AoP és HR). A kezdeti szívfunkció felmérése után, 1 mL α-MSH oldatot (1 µmol/L α-MSH-t tartalmazott) injektáltunk direkt módon az aorta kanül oldalsó szárán keresztül a rendszerhez. 5 perc eloszlás után újra mértük a szívfunkciós paramétereket, az α-MSH direkt hatásainak megbecsüléséhez.

IV. Az α-MSH echokardiográfiával mérhető szívfunkciókra kifejtett direkt hatásainak analízise

A kezelésben nem részesülő patkányoknál (n=8) ketamin-xylazin kombinációval általános érzéstelenítést alkalmaztunk, majd leborotváltuk a mellkasukat. A jobb juguláris vénát láthatóvá tettük, majd megtisztítottuk a környező kötőszövetről, egy apró bemetszést ejtettünk a véna falán, majd egy fiziológiás sóoldatot tartalmazó polietilén kanült vezetünk bele. Ezután az állatot háton fekvő pozícióba helyeztük, és elvégeztük az echokardiográfiás méréseket (lásd az Echokardiográfia c. részt). A kiindulási paraméterek regisztrálása után, 3 különböző dózisu α-MSH-t (10, 100, 250 µg/ttkg, ebben a sorrendben) injektáltunk az állatnak a katéteren keresztül, miután újra regisztráltuk a szívparamétereket, immár az egyes, illetve kumulatív dózisu α-MSH befolyása alatt.

V. Izolált aorta gyűrűk α-MSH adminisztrációra adott vaszkuláris válaszainak vizsgálata

Minden egyes izolált aorta gyűrű kísérlethez (n=8) egy kezelésben nem részesült patkányt dekapitáltunk guillotine segítségével, majd sietve eltávolítottuk az abdominális aorta szakaszt. 90 perc Krebs oldatban való inkubálás után 1 µM fenilefrint adtunk a 6 aorta gyűrűből 5-höz, beleértve az intimától megfosztott [ET- (endothelium deprived)] mintát is, 2 percig, melyet egy 45 perces kimosási periódus követett. Ezután az 5 gyűrűn a következő kezelések valamelyikét alkalmaztuk: (1) Krebs oldat önmagában az

egyik intakt gyűrűhöz (naiv) és (2) az intimától megfosztott gyűrűhöz (naiv ET-), (3) 200 μM NOARG, (4) 3 μM INDO és (5) 200 μM NOARG 3 μM INDO-val egyidejűleg. Ezen kezelések után azonnal 1 μM fenilefrint adtunk az 5 preparátumhoz. 30 perc elteltével, mielőtt a kontraktilis erő elért egy plató értéket, minden aorta gyűrűhöz készítettünk egy α -MSH koncentráció-hatás (E/c) görbét (1 nM-től 1 μM -ig). A 6. aorta gyűrű esetében (6), a 90 perc Krebs oldatban való inkubálás után készítettük el az α -MSH E/c görbét (1 nM-től 1 μM -ig).

3.3.2. Második fázis

A ZDF patkányok kezdeti értékeinek, úgymint súly, OGTT és echokardiográfiás vizsgálatok regisztrálása után (n=12), a kísérleti állatokat 2 csoportra osztottuk: kezeletlen állatok (Kontroll; n=6), melyek csak vivőanyagot (fiziológiás sóoldat) kaptak, és α -MSH kezelésben részesülő állatok (MSH, n=6). Mindkét csoport tagjai szubkután beültetett ozmotikus mini pumpa segítségével kapták a kísérleti hatóanyagot, 6 héten keresztül. A jelen tanulmány hiányossága, hogy nem ábrázolunk adatokat az egészséges (sovány) kontroll állatokról. Az alfa-MSH koncentrációja 4,8 mg/mL volt, a pumpa pedig 0,15 $\mu\text{L}/\text{órás}$ dózisban adagolta az állatoknak (0,72 μg α -MSH óránként). 6 hét után regisztráltuk a végpont értékeket (súly, OGTT, echokardiográfia, szérum paraméterek és vérnyomás), majd pedig extermináltuk az állatokat mélyaltatás (ketamin/xylazin kombináció) alatt elvégzett torakotómia segítségével. Az állatok szívét és baziláris artériáját eltávolítottuk. Az izolált szívmodell elvégzése után pedig a szívizomszöveteket gyorsan lefagyasztottuk a NADPH oxidáz aktivitás és miocita erő meghatározásához. A baziláris artériákon kontraktilis erő méréseket végeztünk.

3.4. Kémiai reagensek

Az α -MSH-t a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk meg, míg az Sn(IV) protoporfirin IX dikloridot a Frontier Scientific Inc. (Logan, ÚT) biztosította. Minden egyéb kémiai anyagot és puffer oldatot a Sigma Aldrich Kft. bocsátott rendelkezésünkre (Budapest, Magyarország). Az izolált aortagyűrűkön történő kísérletekhez a következő reagensek voltak szükségesek: fenilefrin, egy szelektív alfa adrenerg receptor agonista; α -MSH; N_ω -nitro-L-arginin (NOARG), egy nitrogén oxid (NO) szintáz inhibitor; indometacin (INDO), egy ciklooxygenáz-gátló; valamint sók a Krebs-Henseleit puffer oldathoz (Krebs oldat). Ezekben a kísérletekben a következő összetételű Krebs oldatot használtuk: NaCl: 118mM, KCl: 4,7mM, CaCl_2 : 2,5 mM, NaH_2PO_4 : 1 mM, MgCl_2 : 1,2 mM, NaHCO_3 : 24,9 mM, glükóz: 11,5 mM, valamint aszkorbinsav: 0,1 mM, desztillált vízben feloldva. A fenilefrint Krebs oldatban oldottuk fel, míg az α -MSH-t feloldottuk Krebs oldatban, majd diszpergáltuk 20 μl ecetsav:víz (1:9) keverékében (vol/vol). A NOARG-t és INDO-t 96%-os etanolban oldottuk, majd a NOARG oldatot tovább hígítottuk fiziológiás sóoldattal.

3.5. Echokardiográfia

Az echokardiográfias méréseket kutatásunk mindkét fázisában elvégeztük, előzetesen ketamin/xylazin (50/5 mg/ttkg) intramuszkuláris kombinációjú általános érzéstelenítésben részesített patkányokon, a kísérletek kezdetén és végén. A kísérleti állatokat háton fekvő pozícióba helyeztük, a mellkasukat leborotváltuk. Az echokardiográfias méréseket Vivid E9 ultrahang rendszer segítségével hajtottuk végre, egy rágcsáló modellekhez kifejlesztett transzducerrel, 14 MHz-es munkafrekvenciával, magas temporális és térbeli felbontással. Minden egyes vizsgálatot 15-20 perces időtartam alatt végeztünk el. Hagyományos méréseket végeztünk 2 dimenziós és M-módban, standard nézetekből. Paraszternális hossz tengelyi és rövidtengelyi metszeteket is rögzítettünk, hogy biztosak legyünk abban, hogy mind a mitrális, mind az aorta billentyű, valamint az apex is ábrázolódik. A paraszternális rövidtengelyi metszeteket a középpapilláris izmok síkjában rögzítettük. M-mód felvételek készültek a középpapilláris izom síkjában mind paraszternális hossz tengelyi, mind paraszternális rövidtengelyi nézetekből. Doppler (PW) és szöveti Doppler (TVI) echokardiogramokat is rögzítettünk, majd további analízishez digitálisan tároltunk. A méréseket az Amerikai Echokardiográfiai Társaság (ASE) ajánlásainak megfelelően végeztük. Minden vizsgálat alatt folyamatosan monitoroztuk az állatok EKG-ját. Az alábbi paramétereket elemeztük a mérések során: az interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolé és szisztolé alatt (IVSs, IVSd), a bal kamrai végdiasztolés (LVIDd) és végszisztolés (LVIDs) belső átmérő, aorta gyök átmérő (Ao), bal pitvari átmérő (LA), bal kamrai ejekciós frakció (EF), szívfrekvencia (HR), mitrális gyűrű szisztolés csúcskiterése (MAPSE), bal kamrai csúcs E- és A-hullámok (pitvari korai és késői telődési sebesség), E/A arány (E/A), ejekciós idő (ET), izovolumetriás kontrakciós és relaxációs idő (IVCT, IVRT), miokardium performációs indexe (MPI vagy Tei-index), laterális e' és a' hullám sebessége, laterális e'/a' arány, E/e' arány, bal kamrai kiáramlás (LVOT) maximális és átlagos sebességi és nyomásparaméterei (LVOT Vmax, Vmean, LVOT maxPG és meanPG). Kiszámoltuk a végszisztolés térfogatot (ESV), végdiasztolés térfogatot (ESV), verőtérfogatot (SV), perctérfogatot (CO) és bal kamra tömeget (LV tömeg). A frakcionális rövidülést (FS) és az ejekciós frakciót (EF) az echokardiográf szoftvere kalkulálta (Teicholz-formula alapján), míg a bal kamra tömegét (LV tömeg) a következő formula alapján számoltuk: $LV \text{ tömeg (g)} = 0,8 \{1,04 [([LVIDd + IVSd + PWd^3] - LVIDd^3)]\} + 0,6$; ahol LVIDd a bal kamrai végdiasztolés átmérője; az IVSd az interventrikuláris szeptum diasztolés vastagsága; a PWd a poszterior fal diasztolés vastagsága. Minden adatot 3-5 egymást követő szív ciklus során mért értékek számtani átlagolásával kaptunk meg. Az adatok analízisét egy képzett kardiológus – a kísérleti protokoll ismerete nélkül – végezte, az EchoPAC PC szoftver (GE Healthcare, New York, NY, USA) segítségével, az objektív interpretáció biztosítása érdekében.

3.6. Izolált „dolgozó szív”

Kutatásunk mindkét részében rögzítettünk patkánymodellre kialakított izolált „dolgozó szív” apparátus segítségével mérhető paramétereket. Az állatok általános anesztéziában részesültek ketamin/xylazin

(50/5 mg/ttkg) kombináció intramuszkuláris beadása által, valamint a dorzális pénisz vénán keresztül intravénás heparin injekciót (1000IU/ttkg) kaptak a trombózis elkerülése érdekében. A szívüket bilaterális torakotómiát követően eltávolítottuk, majd jéghideg perfúziós pufferbe helyeztük, miután az aortán keresztül kanuláltuk a szíveket. A szív perfúzióját a Langendorff-protokollnak megfelelően végeztük, 10 perc kimosási periódust (úgynevezett „nem dolgozó” üzemmódban) alkalmaztunk konstans perfúziós nyomással, ami 100 kPa-nak felelt meg. A 10 perc kimosási idő alatt eltávolítottuk a vért, és a szív adaptálódott a megváltozott körülményekhez. A perfúziós médium módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer (mKH puffer) volt (118mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,7mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz). Egy kétfejű perisztaltikus pumpa kontrollálta a mKH puffer perfúziójának sebességét. A kimosási periódus után a Langendorff-apparátust „dolgozó” üzemmódra kapcsoltuk: megszüntettük a retrográd áramlást és a pulmonális véna felől, anterográd irányba perfundáltattuk a szíveket. Ezt követően a kezdeti szívfunkciós értékeket mértük: szívfrekvenciát (HR), aorta nyomást (AoP), bal kamrai diasztolés nyomást (LVDP), melyeket a készülékhez kapcsolt kalibrált nyomásmérő és számítógépes rendszer segítségével határoztuk meg segítségével regisztráltuk, az aorta áramlást (AF) és koronária áramlást (CF) áramlásmérővel határoztuk meg, míg a verőtérfogatot (SV) és perctérfogatot (CO) ezekből a mérésekből származtattuk. Az ezektől eltérő értékeket a különböző protokollok részletezik. Kutatásunk első fázisának kísérleti terve alapján az I. és II. protokoll szerint ezután 30 perc globális iszkémia, majd 120 perc reperfüzió következett, ami alatt folyamatosan nyomon követtük a szívfunkciós paramétereket, a 30., 60., 90. és 120. percben. A III. protokoll szerint, a kiindulási értékek megállapítása után az iszkémia/reperfüzió helyett, 1 ml α -MSH oldatot (1 μ mol/L koncentrációban) injektáltunk közvetlenül a rendszerhez, az aorta kanulón keresztül, az α -MSH adminisztráció direkt hatásának monitorozása céljából. A kutatás második fázisában a 6 hetes kezelési időszak végén végrehajtott exterminációt követően végeztük el az izolált „dolgozó szív” kísérletet. Mindkét fázisban a 120 perces reperfüziót követően azonnal miokardium biopsziát vettünk a bal kamra szövetéből, melyeket lefagyasztottunk további analízis céljából.

3.7. Globális iszkémia és reperfüzió indukálása izolált „dolgozó szíven”

Az izolált „dolgozó szíveken” történő globális iszkémia indukálása a kutatás első fázisában az I. és II. protokollban szerepelt, míg a második fázisban az exterminációt követően végeztük el. A kezdeti szívfunkciós paraméterek meghatározása után a pitvari bemenő és aorta kimenő véráramot befogtuk közel a pitvari és aorta kanulók eredéséhez, ebben a sorrendben, majd a perisztaltikus pumpát megállítottuk. A reperfüziót a pitvari és aorta áramok felengedésével, valamint a perisztaltikus pumpa újraindításával értük el. A normotermiás globális iszkémia alatt a miokardium kiszáradásának megelőzése céljából a termosztát üvegedényt (amiben felfüggesztettük a szíveket) lefedtük, és a benne lévő páratartalmat konstans értéken tartottuk. A kísérlet teljes időtartama alatt monitoroztuk, és rögzítettük a szívfunkciót egy számítógéphez csatlakoztatott, az izolált miokardiummal összeköttetésben lévő, ezüst elektródákból és nyomás transzducerekből álló eszköz segítségével.

Iszkémia előtt, illetve a reperfüzió alatt mértük a szívfrekvenciát (HR), koronáriaáramlást (CF), valamint az aortaáramlást (AF). Az AF-t a szívből adott idő alatt kipumpált pufferoldat mennyiségéből állapítottuk meg, míg a CF-et az adott idő alatt mért, szívből távozó koronária perfuzátumból határoztuk meg. A kísérlethez előre megállapítottunk kizáró kritériumokat, így amennyiben az iszkémia periódus előtt következett be kamrai aritmia, úgy azt az izolált szívet kizártuk a vizsgálatból.

3.8. Kardiális aritmia incidenciá megállapítása

A kutatásunk első fázisában az izolált „dolgozó szív” modellek értékelése alatt epikardiális elektrokardiogram (EKG) monitorozást végeztünk kettő darab, közvetlenül a szívhez csatlakoztatott ezüst elektróda segítségével. Az EKG regisztrátumok kiértékelésével állapítottuk meg a kardiális aritmiák incidenciáját. Kvantális megközelítés alapján analizáltuk az aritmiákat: volt-e minimum 1 aritmiás esemény vagy nem. Az aritmiákat (tehát, min. 1 aritmiás esemény bekövetkezett) további 2 csoportra osztottuk a következők szerint: (1) ha az aritmiás esemény(ek) után spontán módon helyreállt a szív pumpafunkciója, akkor „nem-komoly” aritmiaként jellemeztük, míg (2) ha a pumpafunkció nem állt helyre, akkor „komoly” aritmiaként jellemeztük, figyelmen kívül hagyva az aritmia típusát vagy mechanizmusát, illetve az aritmiás események számát.

3.9. Izolált aorta gyűrű kísérlet

Az első fázis minden kísérletéhez dekapitáltuk a patkányokat guillotine segítségével, majd sietve eltávolítottuk az aorta abdominális szakaszát. Minden kísérleti állatból származó aortából 6 db, egyenként kb. 2 mm széles gyűrűt hasítottunk le. Az egyik gyűrűt megfosztottuk az intima rétegétől egy kis pamut tampon segítségével. Minden gyűrűt vízszintesen felszereltünk egy huzalos szerelvényre, 10 mN nyugalmi feszüléssel, egy kb. 10 mL-es függőleges szervkamrában (Experimetria TSZ-04), ami 95% O₂ és 5% CO₂ (36 °C; pH 7,4) keverékkel oxigenizált Krebs oldatot tartalmazott. A körkörös izom izometriás kontrakciós erejét egy transzducer segítségével határoztuk meg (Experimetria SG-01D), és egy poligráf segítségével regisztráltuk (Medicor R-61 6CH Recorder).

3.10. Az izolált „dolgozó szívek” infarktálódott területeinek meghatározása

Kutatásunk első fázisában direkt, az állatok feláldozása utáni módszerként trifenil-tetrazolium klorid (TTC) festést alkalmaztunk minden egyes szív infarktálódott területének azonosításához. Az izolált „dolgozó szív” modell kísérlet végén foszfátpufferben (Na₂HPO₄ 88mM, NaH₂PO₄ 1,8 mM) lévő 100 mL 1%-os TTC oldatot adtunk direkt módon a rendszerhez az aorta kanül oldalsó szárán keresztül. Az analízis során megállapítottuk, hogy a TTC az élő miokardiumot mély vörösre festette, míg az infarktus területe halvány maradt. A szíveket – 80 °C-on tároltuk egy hétig, majd 2-3 mm vastag haránt irányú metszeteket készítettünk az apiko-bazális tengely mentén, melyek súlyát megmértük, szárazra itattuk, végül szövettani tárgylemezre helyeztük őket, és a Hewlett-Packard Scanjet szkennel segítségével

beszkenneltük. Az NIH 1.61 képszerkesztő szoftver használatával minden kép esetén egyenlő mértékű háttérsötétként, fényerőt és kontraszterősítést alkalmaztunk a jobb minőség és elkülöníthetőség érdekében. Az infarktus területeit (halvány területek, fehér pixelek) minden képen körüljelöltük, és méretüket pixelsűrűség analízissel számoltuk ki. Az infarktálódott és a teljes terület nagyságát számítógépes planométer szoftver segítségével mértük: Scion for Windows Densitometry image program. Az infarktus méretét minden szív esetén az érintett terület teljes területhez viszonyított százalékos arányában adtuk meg (pixel százalék).

3.11. A szívizom HO-1 aktivitásának mérése

A kutatásunk első fázisában a miokardium HO-1 aktivitását a következő általánosan használt protokoll alapján állapítottuk meg: a szövetmintákat homogenizáltuk egy 7,4 pH-jú, 10 mM HEPES-t (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetyl-sulfonsav), 32 mM szukrózt, 1mM DTT-t (ditiotreitól), 0,1 mM EDTA-t, 10 µg/mL szójabab tripszin inhibitort, 10 µg/mL leupeptint és 2 µg/mL aprotinint tartalmazó oldatban (homogenizációs puffer). A homogenizátum 30 perces, 20 000-n és 4°C-on történő centrifugálása után megkaptuk a felülúszót. A Tenhunen és munkatársai által alkalmazott módszerrel minden felülúszó esetében külön meghatároztuk a HO-1 aktivitást. Röviden, a HO-1 aktivitást a hemből keletkezett bilirubin számítógép alapú spektrofotometriás analízisével mértük. Ehhez a HO-1 enzimatis mérési protokollhoz szükséges egy reakcióelegy, mely tartalmaz egy rész felülúszót, 2 mM glükóz-6-foszfátot, 0,14 U/mL glükóz-6-foszfát dehidrogenázt, 15 µM hemet, 150 µM NADPH-t, 120 µg/mL patkány máj citoszolt, a biliverdin reduktáz forrásaként, 2 mM MgCl₂-t és 100 mM KH₂PO₄-t. Minden reakcióelegyet 1 óráig inkubáltunk a sötétben. A reakciót az elegy jégre helyezésével szakítottuk meg. A bilirubin-képződést a 460 és 530 nm-en mért optikai denzitáskülönbségek alapján állapítottuk meg. A HO-1 aktivitást az óránkénti milligramm fehérjéből képződött nanomoláris mennyiségű bilirubin formájában fejeztük ki.

3.12. HO-1 fehérje szívizomszöveti expressziójának meghatározása Western Blottal

A kutatás első fázisának végén, minden patkány lefagyasztott bal kamra szövetéből 300-300 mg-t homogenizáltunk 800 µL homogenizációs pufferben (25 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM nátrium-klorid, 4mM nátrium-ortovanadát, 10 mM NaF (nátrium-fluorid), 10 mM nátrium-pirofoszfát, 10 nM okadánsav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluorid), valamint 1x proteáz inhibitor koktél) egy Polytron homogenizátor segítségével. A homogenizátumokat lecentrifugáltuk 2000 rpm, 4 °C-on 10 percig. A felülúszókat tovább centrifugáltuk. A maradék felülúszók citoszolikus extraktumok, amiket kísérletesen ennek a sejtfrakciónak a meghatározásához használtunk. Ezután a mintákat (50 µg minden esetben) nátrium-dodecil-sulfát gélelektroforézissel szeparáltuk, 12%-os tris-glicin pufferelt akrilamid-poliakrilamid gélt alkalmazva 120 V-on 90 percig. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk 100 V-on 1 óráig keresztül. 5%-os szárított sovány tejfehérje koncentrációjú Tween 20-al kiegészített trisz(hidroximetil)-aminometán pufferelt só oldatban (TBST) blokkoltuk a

membránt a nem-specifikus kötődések elkerülése érdekében, majd egy éjszakán át inkubáltuk őket a primer antitesttel 4 °C-on (1:1000 hígítás; anti-GAPDH; anti-HO-1 nyúl monoklonális antitest, Sigma-Aldrich Kft.). Az éjszakai inkubáció után a membránokat torma peroxidáz-konjugált kecske anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel kezeltük (1:3000 hígítás). A kötések azonosítására kemilumineszcens reakció szolgált. Röntgensugár alkalmazásával változó ideig tartó autoradiográfiával végeztük el az azonosítást. A szkennelt blokkok kvantitatív analízisét a Scion for Windows Densitometry Image program segítségével hajtottuk végre.

3.13. Ozmotikus Pumpa Implantációja

A kutatásunk második fázisában az Alzet® ozmotikus mini pumpák tarkóbőr alá történő sebészi implantációját a ZDF patkányok ketamin/xylazin (100/5 mg/kg) kombinációjú mélyaltatásában végeztük, 1 cm-es nyíláson keresztül. Az implantáció előtt a pumpákat feltöltöttük alfa-MSH oldattal (200 µL, 4,8 mg/mL sűrűségű oldat), majd behelyeztük őket 37 °C-os fiziológiás sóoldatba, minimum 4 órára. A mini pumpák inzercióját követően a nyílásokat sebészi varratokkal zártuk, majd a sebet Betadine® oldattal fertőtlenítettük. A műtét 10-15 percig tartott, miután a patkányok posztoperatív ellátásban részesültek. A pumpa folyamatos, 0,15 µL/h adminisztrációt biztosított. A kontroll csoport pumpáit fiziológiás sóoldattal töltöttük meg, és ugyanezzel a módszerrel ültettük be.

3.14. Orális Glükóz Tolerancia Teszt (OGTT)

A ZDF patkányok OGTT-jét a standardizált módon végeztük. Röviden, minden állat esetében elvégeztük a tesztet a 6 hetes kísérlet kezdetén, valamint a végén, 12 órás éhezést követően. 3g/kg glükózt kaptak az állatok, 1g/ml sűrűségű oldat formájában, orális szondázási technikával. A szérum glükóz szintet a farki vénákból határoztuk meg a 0., 30., 60., 90. és 120. percben glükométer segítségével.

3.15. Éber állatok vérnyomásmérése

A kutatás második fázisának végpontján, a patkányok szisztolés és diasztolés vérnyomásértékeit egy non-invazív, farkra erősíthető mandzsettával rendelkező eszközzel – amely Tértfogati Nyomás Regisztráló szenzor technológiát alkalmaz – mértük meg. A méréseket éber állatokon végeztük, melyeket egy fűthető műanyag kalodába helyeztünk a mérés idejére. Minden állat esetében 5 egymást követő regisztrátumot értékeltünk ki a legpontosabb meghatározás érdekében.

3.16. Szérum paraméterek analízise

A második fázis végpontján, 14 órás éhezést követően, a patkányok farkovénájából származó vérmintát EDTA-K2 mentes csövekbe tettük. A mintagyűjtést és -feldolgozást aseptikus módon végeztük, hogy minimalizáljuk a hemolitikus aktivitást. A Debreceni Egyetem Labor Medicina Intézetének segítségével meghatároztuk a szérum koleszterin,- triglicerid- és vércukor értékeket.

3.17. Izolált kardiomiociták erőmérése

A második fázisban az izolált „dolgozó szív” modellből (n=3-4) származó bal kamrai (LV) kardiomiociták (n=12, csoportonként) teljesítményét a korábban leírt módon mértük, az iszkémia/reperfúziós protokollt követően. Röviden, a mélyfagyasztott (-80 °C) szöveteket mechanikailag szétválasztottuk, demembranizáltuk 0,5%-os Triton X-100 detergens oldat segítségével, 5 perc alatt az izoláló oldatban (MgCl₂: 1,0 mM; KCl: 100,0 mM; EGTA: 2,0 mM; ATP: 4,0 mM; imidazol: 10,0 mM; pH 7,0), 4°C-on. Minden egyes kiválasztott sejtet szilikon ragasztóanyaggal rögzítettünk egy rozsdamentes acél 'rovar' tű egyik végéhez, amely egy nagysebességű hossz mérő berendezéshez csatlakozott, míg a másik vége egy érzékeny erőmérő transzducerhez kötődött, 15°C-on. A kardiomiocita izometriás erőgeneráció 2,3 µm-es szarkomérhosszúság mellett történt, és a LabVIEW szoftver segítségével analizáltuk. Egy egyedülálló szívizomsejt Ca²⁺-függő erőképzését a preparátum nyugalmi oldatból (BES: 10,0 mM; KCl: 37,11 mM; MgCl₂: 6,41 mM; EGTA: 7,0 mM; ATP: 6,94 mM, kreatin foszfát: 15,0 mM; pH7,2) aktiváló oldatba (ugyanaz az összetétele, mint a nyugalmi oldatnak, azzal a különbséggel, hogy Ca²⁺-EGTA-t tartalmaz az EGTA helyett) történő áthelyezésével indukáltuk. A Ca²⁺ koncentrációt $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$ egységként jelöltük (pCa). Minden oldathoz frissen adtunk proteázgátlót: fenilmetilszulfonil fluorid: 0,5 mM; leupeptin: 40 µM és E-64: 10 µM. A kardiomiociták Ca²⁺-aktivált erőgenerációját maximális aktiváló oldat segítségével (pCa 4,75), valamint váltakozó Ca²⁺-tartalmú oldatok segítségével (pCa 5,4-7,0) mértük. A szubmaximális erőket a maximális erőkre normalizáltuk, és illesztettük a módosított Hill egyenlethez az Origin 6.0 analízis programmal. A pCa50 által jelzett fél-maximális kontrakcióhoz tartozó pCa érték önmagában meghatározza a kontrakciós apparátus erőgenerációjának Ca²⁺-érzékenységét, míg az nHill együtthatóként kifejezett Ca²⁺-érzékenységi görbe meredeksége a miofilamentumok közötti kooperációt jellemzi. Az eredeti aktív erőket a miociták keresztmetszetére normalizáltuk, ami az aktív feszülést mutatja (kN/m Ca²⁺-ban kifejezve). A statisztikai analízist a GraphPad Prism 5.02 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az adatokat párosítatlan Student t-próbával hasonlítottuk össze.

3.18. Artériás kontraktilis erőmérés

A második fázis végén, a ketamin/xylazin kombinációval létrehozott anesztézia alatt elvégzett torakotómia után, a kísérleti állatok agyát eltávolítottuk, és egy szilikon tartalmú, 0-4 °C-os Krebs oldattal (NaCl: 110 mM, KCl: 5 mM, MgSO₄: 1 mM, NaHCO₃: 24 mM, glükóz: 5 mM, KH₂PO₄: 1,0 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) töltött petri csészébe helyeztük. Az oldatot korábban egy gázkeverékkel hoztuk egyensúlyba (5% CO₂, 10% O₂ és 85% N₂, pH 7,4). A baziláris artériákat mikrosebészeti eszközök segítségével izoláltuk. Az artériákat egyenlően, 4 mm hosszú gyűrűkre vágtuk, amelyeket egy izometriás kontrakció mérő rendszerbe applikáltunk. A Ca²⁺-mentes Krebs oldatot Ca²⁺-tartalmúra cseréltük (NaCl: 110 mM, CaCl₂: 2,5 mM, KCl: 5 mM, MgSO₄: 1 mM, NaHCO₃: 24 mM, glükóz: 5 mM, KH₂PO₄: 1,0 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Minden kísérlet előtt egy normalizációs protokollt iktattunk be, 1,5 mN erővel megnyújtva a preparátumokat, amit 15

másodpercenként egyenlő mértékben emeltünk, amíg a számolt intraluminális nyomás el nem érte a 13,4 kPa-t. A kísérleteket ezután ezen a feszülési szinten végeztük el. Regisztráltuk az erek KCl-ra (6-66 mM), szerotoninra (1 nM-10 μ M) és angiotenzin II-re (1 nM-100 μ M) adott kontraktilis válaszát.

3.19. NADPH oxidáz aktivitás mérés

A NADPH oxidáz eredetű szuperoxid termelést, a lucigenin által gerjesztett kemilumineszcencia segítségével mértük a második fázis végén. A bal kamrákból (LV) származó mintákat az ex vivo perfúziós kísérletek végeztével azonnal lefagyasztottuk, és -70 °C-on tároltuk az analízisig. A bal kamrai mintákból (n=4 az α -MSH-val kezelt, illetve a kezeletlen kontroll csoportból is) megközelítőleg 100 mg-ot (nedves szövet) homogenizáltunk 10 egység jéghideg 1x Ca^{2+} -mentes Dulbecco Foszfát Pufferelt Sóoldatban, ami 40 μ M leupeptint és 5 μ M E64 proteázgátlót tartalmazott. A centrifugálás után a golyót félretettük, és Bicinchoninias Savi Assay-t alkalmaztunk a felülúszóban található fehérjekoncentráció meghatározása céljából, borjú szérum albumint (BSA) használtunk kontrollként. A fehérjekoncentrációk körülbelüli értéke 20 mg/ml volt. A NADPH oxidáz enzim aktivitásméréséhez használt reakciós elegy 50 μ L szívizom homogenizátumot tartalmazott Krebs-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) oldatban (NaCl: 110 mM, KCl: 5 mM, MgSO_4 : 1 mM, NaHCO_3 : 24 mM, glükóz: 5 mM, KH_2PO_4 : 1,0 mM, 20 mM HEPES, 50 μ M lucigenin). A szcintillációs csövek sötét adaptáción mentek keresztül, megmértük a minták bazális lumineszcenciáját PerkinElmer Tricarb 2800 tr folyékony szcintilláció számlálóval. Az enzimatis aktivitást 100 μ M NADPH reakcióelegyhez való hozzáadásával stimuláltuk. Ezután 2 percig közvetlenül mértük a lumineszcenciát. A bazális és stimulált lumineszcencia közötti különbséget kiszámoltuk, majd normalizáltuk a protein koncentrációra.

3.20. Statisztikai analízis

Az összes leírt adat a csoportokból származó egyes eredmények átlagaiként jelenik meg \pm az átlagok standard hibája (standard error of mean, SEM). A gaussi eloszlás megállapításához D'Agostino & Pearson omnibus normalitás tesztet alkalmaztunk. A statisztikai analízist egyutas varianciaelemzéssel (ANOVA) és Bonferroni poszt-tesztel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn poszt-tesztel (ha a normalitás nem teljesült) végeztük. 2 csoport közötti különbség szignifikanciaszintjének meghatározásához Student t-próbát használtunk. Kettőnél több halmazt az egyutas varianciaanalízissel hasonlítottunk össze, melyet a Tukey's posztteszt követett. Az átlagértékek közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 6.07 program segítségével végeztük (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A kutatás első fázisának eredményei

4.1.1. Echokardiográfiás eredmények: Frakcionális Rövidülés és Ejekciós Frakció (IV. protokoll)

Minden állat szívfrekvenciája (HR) és légzésszáma stabil maradt a kísérlet során. Sőt, mi több, a 2 „vak”, független vizsgáló által megállapított értékek között nem volt szignifikáns különbség. A paraszternális hossz tengely és rövidtengely mentén mért FS és EF értékek szorosán korreláltak. A 100 és 250 µg/ttkg α-MSH adminisztrációt követően az FS szignifikánsan nőtt, összehasonlítva az injekció előtt mért (Kontroll) értékekkel (FS_{100 µg/ttkg}: 53,79 ± 2,497 és FS_{250 µg/ttkg}: 55,00 ± 2,688 vs. FS_{Kontroll}: 45,69 ± 2,241). Hasonló tendenciát figyeltünk meg az EF értékekben (EF_{100 µg/ttkg}: 88,31 ± 1,745 és EF_{250 µg/ttkg}: 89,21 ± 1,527 vs. EF_{Kontroll}: 81,52 ± 2,296). Az α-MSH 10 µg/ttkg dózisban látható emelkedést eredményezett az FS és EF értékekben, azonban ez az emelkedés nem érte el a statisztikai szignifikancia határát (FS_{10 µg/ttkg}: 52,50 ± 2,773 vs. FS_{Kontroll}: 45,69 ± 2,241) és (EF_{10 µg/ttkg}: 87,04 ± 1,963 vs. EF_{Kontroll}: 81,52 ± 2,296). Az interventrikuláris és bal kamrai szabad falvastagságok, valamint a bal kamra tömegek között nem mutatkozott szignifikáns különbség egyszeri α-MSH adminisztráció hatására.

4.1.2. Izolált „dolgozó szívmodell” eredmények

4.1.2.1. α-MSH és SnPP hatásai a szívfrekvenciára (HR)

Az α-MSH kezelés emelte a szívfrekvenciát, különösen a reperfúziós periódus első szakaszában ($p < 0,05$), összehasonlítva a kontroll csoporttal. Az SnPP kezelés ellensúlyozta az α-MSH HR-emelő hatását ($p < 0,05$) a teljes reperfúziós periódus alatt (pl. a 30. percben: 172,0 ± 21,22 ütés/perc SnPP + α-MSH vs. 271,4 ± 7,117 ütés/perc α-MSH; a 60. percben pedig: 180,5 ± 22,28 ütés/perc SnPP + α-MSH vs. 275,1 ± 6,698 ütés/perc α-MSH).

4.1.2.2. α-MSH és SnPP hatásai a koronáriaáramlásra (CF)

Az izolált „dolgozó szív” modell elvégzése alatt a CF értékeket is nyomon követtük egyrészt iszkémia előtt, másrészt a reperfúzió 30., 60., 90. és 120. percében. Az α-MSH kezelés javította az iszkémia előtti CF értékeket a kontroll értékekhez viszonyítva (28,14 ± 0,99 vs. 21,93 ± 1,39 mL/perc). Az α-MSH-val kezelt állatok reperfúzió alatt mért CF értékei az összes időpontban emelkedettek voltak, és ez a különbség szignifikánsnak bizonyult az összes többi csoporthoz viszonyítva ($p < 0,05$). Az α-MSH-val kezelt állatok CF értéke a reperfúzió 120. percében (25,45 ± 1,60 mL/perc) 16%-kal volt magasabb, mint a kontroll csoport iszkémia előtt mért értéke (21,93 ± 1,39 mL/perc), és csak 10%-kal csökkent az α-MSH-kezelt patkányok iszkémia előtti értékéhez képest (28,14 ± 0,99 mL/perc). A HO-1 inhibitor, SnPP szignifikánsan ellensúlyozta az α-MSH kezelés CF-emelő hatását, ($p < 0,05$).

4.1.2.3. α -MSH és SnPP hatásai az aortaáramlásra (AF)

A II. protokollt alkalmazva ezekhez a kísérletekhez, az AF értékek jelentősen emelkedtek az α -MSH-val kezelt csoportban ($52,07 \pm 1,93$ mL/min) a kontrollhoz képest ($39,57 \pm 2,44$ mL/perc $p < 0,001$) az iszkémiás inzultus előtt. Az α -MSH-val kezelt csoporthoz viszonyítva, az SnPP-vel, illetve α -MSH+SnPP-vel kezelt állatok iszkémia előtti AF értékei csökkentek, azonban a kontroll csoporthoz képest növekedtek ($48,00 \pm 2,16$ és $43,36 \pm 3,42$ mL/perc ebben a sorrendben). Az α -MSH-kezelt patkányok AF értékei a reperfúzió minden időpontjában szignifikáns emelkedést mutattak a megfelelő kontroll értékekhez viszonyítva ($p < 0,01$). Még az iszkémia előtti kontroll értékekhez képest is, az α -MSH-val kezelt állatok AF értékei minden időpontban emelkedettebbek voltak, kivéve a reperfúzió 120. percét. Ráadásul szignifikáns különbség mutatkozott az α -MSH-val kezelt patkányok AF értékei, valamint az összes többi csoport AF értékei között a reperfúzió időszakában ($p < 0,01$). Habár az SnPP-vel kezelt állatok kiindulási AF értékei emelkedtek a kontrollcsoporthoz képest, a reperfúzió végére a kontroll kiindulási értékek 20%-ára csökkentek ($8,00 \pm 2,94$ mL/perc). Hasonló tendenciát figyeltünk meg a α -MSH+SnPP-vel kezelt csoport esetén is, habár ezen állatok értékei bármely időpontban, illetve a reperfúzió teljes időszakában magasabbak voltak, mint a csak SnPP kezelésben részesülő állatoké.

4.1.2.4. α -MSH és SnPP hatásai a perctérfogatra (CO) és verőtérfogatra (SV)

Az α -MSH-val kezelt állatok CO és SV értékei a kísérlet minden időpontjában szignifikánsan magasabbak voltak, mint a megfelelő kontroll értékek. Mindazonáltal, az SnPP nem tudta ellensúlyozni ezt a jelenséget.

4.1.3. Az α -MSH adminisztráció direkt hatása az izolált szívmodelleken (III. protokoll)

Az α -MSH kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a koronária átáramlás (CF), illetve a CF/CO% a kiindulási értékekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Az AF, CO, HR és SV értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezdeti értékekhez képest.

4.1.4. Kamrai aritmiák incidenciájának és súlyosságának meghatározása (II. protokoll)

A kontroll patkányok 80%-ánál nem tapasztaltunk aritmiás eseményt. Azonban az állatok 6,7%, és 13,3%-ában nem súlyos, illetve súlyos aritmiákat észleltünk, ebben a sorrendben. Az α -MSH-val kezelt állatoknál nem tapasztaltunk aritmiás eseményt. Az α -MSH+SnPP csoportban, az izolált „dolgozó szívek” 36,4%-a nem mutatott aritmiát, míg 27,2%-nál nem-súlyos, további 36,4%-nál súlyos aritmiás eseményeket detektáltunk. A csak SnPP kezelésben részesülő patkányok izolált szíveinek 30%-a nem mutatott aritmiát, 60%-ánál nem súlyos, 10%-ánál súlyos aritmiás eseményeket észleltünk.

4.1.5. A NOARG és INDO hatásai az α -MSH-mediált vaszkuláris tónus válaszokra (V. protokoll)

4.1.5.1. Fenilefrinre adott vaszkuláris válasz (prekontrakció)

A naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt állatok α -MSH kezelés előtti aorta gyűrű kontrakciós erejük E/c görbéje (mN-ban, átlag \pm SEM) $3,47 \pm 0,37$, $4,21 \pm 0,41$, $4,46 \pm 0,39$, $1,98 \pm 0,26$ és $3,68 \pm 0,4$ volt, ebben a sorrendben, szignifikáns különbséggel a naiv és 3 μ M INDO-val kezelt csoport értékei között ($p < 0,01$).

4.1.5.2. α -MSH-ra adott vaszkuláris válasz

Az α -MSH kezelés nem hozott direkt szignifikáns változást a nyugalmi vaszkuláris tónusban. Ezzel ellentétben, a prekontrahált aortagyűrűk szignifikáns relaxációt mutattak α -MSH hatására. Az 1 μ M koncentrációjú α -MSH által elért maximális relaxáció (a kezdeti kontrakciós erő százalékos hányadában megadva, átlag \pm SEM) nem mutatott szignifikáns különbséget a naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt csoportok között ($20,01 \pm 4,64$, $21,65 \pm 4,53$, $16,75 \pm 5,41$, $21,24 \pm 6,73$ és $23,71 \pm 5,7$ ebben a sorrendben). Így az α -MSH vaszkuláris tónusfokozó hatása (az $\alpha 1$ adrenoreceptorok stimulálásán keresztül) feltehetően független az intima jelenlététől, csakúgy, mint az endotélium prosztaciklin, illetve NO-termelő képességétől.

4.1.6. Az α -MSH és HO-1 gátlás hatása az iszkémia/reperfúzió-indukált kardiális infarktus kiterjedésére (II. protokoll)

Szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg az iszkémia/reperfúziós sérülés következtében kialakult infarktus területére (a teljes terület százalékos arányában kifejezve) vonatkozóan a II. protokoll szerint kezelt állatok szívében. Az α -MSH-val kezelt állatok szívének TTC-festése szignifikánsan kisebb infarktus területet jelzett a vivőanyaggal kezelt kontroll állatok szívéhez képest ($19,74 \pm 1,044\%$ vs. $41,91 \pm 3,922\%$) ($p < 0,05$). Ezt a kardioprotektív hatást teljes mértékben ellensúlyozta az α -MSH-val kezelt állatok SnPP-vel történő előkezelése ($42,15 \pm 3,235\%$ vs. $19,74 \pm 1,044\%$) ($p < 0,05$). Sőt, mi több, az SnPP kezelés önmagában szemmel láthatóan növelte az infarktus területét ($53,17 \pm 2,347\%$).

4.1.7. Az α -MSH és SnPP kezelés hatásai a szöveti HO-1 aktivitásra (II. protokoll)

A HO-1 enzim aktivitását a II. protokoll szerint előkezelt állatokból származó miokardium mintákban vizsgáltuk. Az enzimaktivásban nem mutatkozott szignifikáns különbség. Mindazonáltal, az α -MSH-val kezelt állatok HO-1 aktivitása enyhén emelkedett a kontroll állatokhoz képest; az SnPP előkezelés csökkentette az enzimaktivitást, míg ez a csökkenés kevésbé intenzívnek tűnt az α -MSH + SnPP-vel kezelt csoportban, a csak SnPP-vel előkezelt patkányokhoz képest. Habár a HO-1 aktivitás mérése korrelál a fent említett módszerekkel, a csoportok közötti különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét.

4.1.8. Western Blot analízis (I. protokoll)

A 250 μ g/kg α -MSH-val kezelt állatokból származó izolált „dolgozó szív” modellek posztiszkémia/reperfúziós minták HO-1 fehérje expressziója szignifikánsan magasabb volt, a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll állatokból származó minták HO-1 fehérjetartalmához képest ($p < 0,05$).

4.2. A kutatás második fázisának eredményei

4.2.1. Súlygyarapodás, szérumparáméterek, vérnyomás és bal kamra tömeg/teljes testtömeg arány

Az állatok kezdeti testtömege $326,7 \pm 5,723$ g volt. A kísérleti csoportok súlygyarapodása, szérum koleszterin,- és triglicerid szintje, valamint a non-invazív vérnyomásmérés eredményei tekintetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Ezzel ellentétben, szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és α -MSH-kezelt állatok bal kamra (LV) tömegének a teljes test tömegéhez viszonyított arányában

4.2.2. Az OGTT eredményei

A ZDF kontroll és α -MSH-val kezelt állatok értékei emelkedtek a kezdeti értékekhez képest, de a két csoport értékei semelyik időpontban nem mutattak szignifikáns különbséget.

4.2.3. Echokardiográfia

A ZDF kontroll csoportban a szisztolés paraméterek (EF, FS, MAPSE), valamint a diasztolés értékek (E-hullám sebessége, E/e arány és IVRT) rosszabbodtak a kezdeti értékekhez képest. Az enyhe, de szignifikáns Tei-index emelkedés ($0,491 \pm 0,014$ vs. $0,305 \pm 0,012$) globálisan romló szívfunkcióra utal. Az α -MSH-val kezelt állatok szisztolés értékei, mint a frakcionális rövidülés (FS), ejekciós frakció (EF) és a mitrális annulus kitérése (MAPSE), enyhe javulást mutattak a Kontroll csoporthoz képest. Az α -MSH-val kezelt patkányok FS és EF értékei szignifikánsan növekedtek a ZDF kontroll állatok értékeihez viszonyítva (FS: $32,33 \pm 0,421\%$ vs. $36,83 \pm 0,703\%$; EF: $66,50 \pm 0,067\%$ vs. $72,00 \pm 0,774\%$, ebben a sorrendben). Az α -MSH-val kezelt patkányok MAPSE értékei a normál tartományban maradtak, a ZDF kontroll állatok MAPSE értékei viszont szignifikánsan romlottak ($2,268 \pm 0,010$ mm vs. $1,602 \pm 0,045$ mm). Az izovolumetriás relaxációs idő csökkenéséből látható, hogy az α -MSH-val kezelt csoport bal kamrai diasztolés funkciója enyhén javult a ZDF kontroll csoporthoz képest ($43,00 \pm 1,125$ ms vs. $58,00 \pm 1,826$ ms). A bal pitvar aorta átmérőhöz viszonyított mérete (LA/Ao) szemlélteti, hogy a ZDF kontroll állatok bal pitvarának átmérője nőtt az α -MSH-val kezelt állatokéhoz képest ($1,104 \pm 0,043$ vs. $0,945 \pm 0,029$). Az E/A és E/e', valamint a laterális e' értékeket nem befolyásolta a kezelés. A Tei-index (Myocardial Performance Index, MPI) emelkedettebb volt a beteg Kontroll patkányok esetében, mint az α -MSH-val kezelt patkányoknál, amely a Kontroll állatok globális szívfunkciójának romlására utal ($0,491 \pm 0,014$ vs. $0,392 \pm 0,013$). A bal kamrai kiáramlási pálya (LVOT) paraméterei is szignifikánsan emelkedettebbnek bizonyultak az α -MSH-val kezelt csoportban, mint a ZDF kontroll csoportban. Az α -MSH kezelés mérsékelten növelte a véráramlási sebességet (V), valamint a nyomásgradienst (PG) (LVOTV átlag: $0,441 \pm 0,024$ m/s vs. $0,553 \pm 0,019$ m/s; LVOT átlag PG: $1,095 \pm 0,088$ Hgmm vs. $1,592 \pm 0,106$ Hgmm). Következésképpen, a verőtér fogat (SV) és a perctér fogat (CO) értékek is emelkedtek a kezelt állatoknál (SV: $0,406 \pm 0,046$ mL vs. $0,581 \pm 0,030$ mL; CO: $77,55 \pm 7,763$ mL/perc vs. $112,30 \pm 6,110$ mL/perc, ebben a sorrendben). Az anesztézia alatt végrehajtott

echokardiográfiás vizsgálat során nem mutatottunk ki különbséget a csoportok szívfrekvenciájában (HR).

4.2.4. Izolált „dolgozó szívmodell” eredmények

Az α -MSH iszkémiás szívre kifejtett hatását izolált „dolgozó szív” modell segítségével vizsgáltuk 6 héttel a sebészeti beavatkozás után. A 6 hetes kezelésnek nem volt hatása sem a Kontroll, sem az α -MSH-val előkezelt állatokból származó szívek kontraktilis funkciójának preisztkémiás paramétereire, beleértve az aorta kiáramlást, a koronária átáramlást, a szívfrekvenciát, a perctérfogatot, a verőtérfogatot és aortanyomást. Noha a preisztkémiás értékekben jelentős különbség nem mutatkozott, a kifejlődött nyomás idő deriváltja szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az MSH csoportban a Kontroll csoporthoz képest. Érdekes módon, a reperfüzió 60. és 120. percében a dp/dt szignifikánsan magasabb volt az MSH-csoportban, mint a Kontroll paraméterek ugyanabban az időpillanatban. Sőt, mi több, 30 perccel a globális iszkémia után az MSH-val kezelt állatok AF és SV értékei magasabbak voltak, mint a kezeletlen, kontroll állatok értékei. Ezenkívül, az iszkémia utáni helyreállítás végén, a Kontroll patkányok AF ($1,667 \pm 0,711$; 16A ábra), CO ($11,500 \pm 3,708$; 16D ábra), SV ($0,072 \pm 0,024$; 16E ábra), AoP ($40,500 \pm 12,230$; 16F ábra) és dp/dt ($341,700 \pm 71,830$; 16G ábra) értékei szignifikánsan csökkentek a preisztkémiás állapothoz képest (AFpre: $23,170 \pm 4,554$; COpre: $43,500 \pm 5,054$; dp/dtpre: $1650 \pm 96,120$; Aopre: $93,330 \pm 9,482$ és SVpre: $0,268 \pm 0,021$). Ezzel ellentétben, az MSH-val kezelt állatok esetében, csak a posztisztkémiás AF ($2,400 \pm 0,778$), AoP ($68,800 \pm 3,952$) és dp/dt ($558,300 \pm 55,630$) mutatott szignifikáns csökkenést a preisztkémiás értékekhez képest (AFpre: $22,800 \pm 2,480$; dp/dtpre: $1133 \pm 127,200$; Aopre: $98,200 \pm 2,760$). Más szóval, annak ellenére, hogy néhány jelentős különbséget ki tudunk mutatni a párhuzamos mérések eredményei között, az MSH-val kezelt kísérleti csoport posztisztkémiás CO ($19,400 \pm 2,849$) és SV ($0,128 \pm 0,025$) értékeiben észlelt preisztkémiás állapothoz viszonyított csökkenés (COpre: $42,000 \pm 4,195$; SVpre: $0,249 \pm 0,021$) nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. Ugyancsak nem találtunk szignifikáns különbséget a koronária áramlás és szívfrekvencia értékekben, sem a különböző kísérleti csoportok között, sem pedig egy csoporton belül különböző időpillanatokban mért értékek között.

4.2.5. Az α -MSH kezelést követő fokozott kardiomiocita kontraktilis teljesítmény

A bal kamrai kardiomiociták aktív feszülés-pCa kapcsolata szemmel látható α -MSH-indukált változásokat mutat a ZDF patkányok celluláris mechanikai teljesítményében. A kezeletlen vs. α -MSH-val kezelt kísérleti állatokból származó bal kamrai kardiomiociták magasabb aktív feszülésre való hajlamot mutattak (pCa 5,6-nál: $31,04 \pm 3,44$ kN/m², p=0,08; pCa 5,8-nál: $25,50 \pm 3,43$ kN/m² vs. $18,13 \pm 2,15$ kN/m², p=0,08). A kezelt vs. kontroll állatokból származó LV kardiomiociták normalizált erő-pCa kapcsolata hasonló Ca-érzékenységet jelzett (pCa₅₀: $5,87 \pm 0,03$ vs. $5,82 \pm 0,02$), de szignifikánsan magasabb Hill együtthatót (n_{Hill} : $2,87 \pm 0,19$ vs. $2,17 \pm 0,08$; 3D ábra), ami az α -MSH-val kezelt csoportban jelenlévő jobb miofilamentum kooperációra utal.

4.2.6. Az agyi erek vaszkuláris státusza

Nem találtunk különbséget a két csoport szerotoninra adott válaszában (a maximum dózisu 5-HT-ra (10 μ M), $7,31 \pm 0,85$ mN a Kontroll csoportban vs. $7,95 \pm 1,51$ mN az alfa-MSH-val kezelt csoportban, 18B ábra). Ugyancsak nem találtunk jelentős különbséget a két csoport ATII-re produkált kontrakcióiban sem (a maximum dózisu ATII-re (100 μ M), $1,99 \pm 0,55$ mN a Kontroll csoportban vs. $1,53 \pm 0,188$ mN az alfa-MSH-val kezelt csoportban).

4.2.7. NADPH oxidáz aktivitás

Az α -MSH-val kezelt, illetve a kezeletlen Kontroll csoport bal kamrai NADPH oxidáz aktivitása nem különbözött szignifikánsan.

5. MEGBESZÉLÉS

Az α -MSH, a proopiomelanokortin neuropeptid származéka egy szekretált melanotropin (melanocita stimuláló hormon), ami a melanokortin receptorokhoz kötődik, és több fiziológiai hatása van, elsődlegesen a tápanyagfelvétel szabályozása, aminek súlycsökkenés és az elhízás elkerülése lehet a következménye – valamint a cukorbetegség kockázatának csökkenése. A humán metabolikus rendszerre kifejtett hatásain túl korábbi kutatások igazolták, hogy a kardiovaszkuláris rendszerre is pozitív befolyással bír, ugyanis szerepe van az iszkémia/reperfúzió következtében kialakult károsodások megelőzésében, illetve csökkentésében. Kutatásunkban egyrészt a rövidtávú α -MSH kezelés hatását kívántuk vizsgálni egészséges patkányok iszkémia/reperfúzióknak kitett szívének funkciójára, illetve ennek a hatásnak a HO-1 általi függőségét; másrészt a hosszútávú α -MSH kezelés hatását a diabétesz mellitusban fellépő iszkémia/reperfúzió okozta kardiális károsodásokra, valamint a metabolikus paraméterekre.

A tanulmányban bemutatott EF-re és FS-re kifejtett α -MSH hatás echokardiográfiai elemzése szemlélteti, hogy a hormon adminisztrációja korrelál ezen paraméterek szignifikáns emelkedésével. Feltételezéseink szerint ezek a hatások az emelkedett szimpatikus aktivitásnak köszönhetők. A II. protokoll alapján alkalmazott α -MSH kezelés emelte az izolált „dolgozó szívek” EKG-val regisztrált ütési frekvenciáját a reperfúzió kezdeti szakaszában. A HO-1 aktivitás hozzájárulását az a megfigyelés támasztja alá, hogy a hormon által kiváltott HR-emelkedést az SnPP adminisztráció, ami egy HO-1 inhibitor szer, ellensúlyozta. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy az SnPP + α -MSH-val kezelt csoportban észlelt szembetűnően alacsony szívfrekvencia értékek részben a tanulmányban említett számos súlyos aritmiás esemény következményei is lehettek. Az α -MSH előkezelés szignifikánsan emelte a CF és az AF értéket is, mind a preiszkémias, mind pedig a reperfúziós időtartam alatt. Ezek a hatások szintén szignifikánsan HO-1-függőek voltak, mivel a hormon által indukált CF és AF emelkedést az SnPP megakadályozta. Mindkét érték emelkedéséről bebizonyosodott, hogy összefüggésben állnak az izolált „dolgozó szív” modell során tapasztalt javult szívfunkcióval és az iszkémiás eseményeket elszenvedett betegek jobb prognózisával. Ezek és az ehhez hasonló megfigyelések felvetik az α -MSH, valamint olyan hatóanyagok, melyek fokozzák a HO-1 expresszióját, iszkémia/reperfúzió-asszociált patológiai elváltozások megelőzésében és terápiájában történő lehetséges alkalmazását. Ezzel ellentétben, habár az α -MSH kezelés szignifikánsan emelte a perctérfogatot és a verőtérfogatot, ez a hatás nem vagy csak részben volt HO-1-függő, mivel az SnPP nem volt képes megakadályozni ezen értékek emelkedését.

Az α -MSH adminisztrációja szignifikánsan emelte a kezelt állatok CF értékeit, szemben a kontroll értékekkel. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az α -MSH intenzív vazodilatatív hatást közvetít a koronária erekre, rámutatva egy további élettani hatásra, mely talán klinikai stratégiák kidolgozásában is szerepet játszhat olyan patológiai állapotok esetén, amelyekben specifikus erek célzott tágításával esetleges javulás érhető el.

Ez a kutatás az olyan hatóanyagoknak, mint az α -MSH, melyek modulálják a HO-1 aktivitását, további potenciális használati lehetőségeit vetette fel a kamrai aritmiákra való hajlam csökkentésében. Az EKG analízis eredményei azt mutatják, hogy az α -MSH kezelés – valószínűsíthetően a HO-1 indukción keresztül – gátolja az aritmiás események kialakulását a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporthoz képest. A hormonkezeléssel párhuzamosan alkalmazott SnPP a kamrai aritmiákra való hajlamot fokozta, ami arra utal, hogy a HO-1 ebben a vonatkozásban kardioprotektív hatású. A csak SnPP kezelésben részesülő patkányokhoz képest az SnPP + α -MSH-kezelt állatokban gyakrabban megjelenő súlyos aritmiák biológiai alapját képezheti az α -MSH által okozott HR-növekedés. A hormonnak ez a tulajdonsága, az SnPP proaritmiás hatásával kombinálva, hozzájárulhat a súlyos aritmiás események magasabb incidenciájához.

Az izolált, fenilefrin által prekontrahált aorta gyűrű modell kísérlet eredményeit azt láttatják, hogy az α -MSH kezelés nem eredményezett direkt módon szignifikáns változást a nyugalmi vaszkuláris tónusban. Mindazonáltal, ezzel ellentétben a prekontrahált aorta gyűrűk szignifikáns relaxáción mentek keresztül válaszul az α -MSH adminisztrációra. Az 1 μ M α -MSH koncentráció hatására kialakult maximális relaxáció nem különbözött szignifikánsan a naiv, naiv ET-, 200 μ M NOARG-, 3 μ M INDO-, 3 μ M INDO + 200 μ M NOARG-gal kezelt csoportok között. Így az α -MSH vaszkuláris tónusfokozó hatása (az α 1 adrenoreceptorok stimulálásán keresztül) feltehetően független az intima jelenlététől, csakúgy, mint az endotélium prosztaciklin, illetve NO-termelő képességétől. Ezen eredmények, valamint a hormon fenilefrin-kezelt aorta gyűrűkre gyakorolt szignifikáns relaxáló hatása azt vetítik elő, hogy az α -MSH potenciális szereppel bírhat olyan terápiás rendszerek felállításában, ahol a betegek prognózisának javítása érdekében a vazodilatáció egy fontos és elvárt tényező.

Az α -MSH előkezelés képessége az iszkémia/reperfúzió-idukált infarktus területének csökkentésére, a hormon által produkált kardioprotektív hatásspektrum egy újabb bizonyítékát jelentheti. Ennek a hatásnak az egyik leglényegesebb mechanika alapja a HO-1 citoprotektív képességében rejlik – feltehetően felerősíti a kardiomiocitákon belüli, valamint a kardiovaszkuláris szövetben megtalálható egyéb sejtekben lévő iongyökök kompartmentalizációját –, hiszen az enzim SnPP általi gátlása megakadályozta az I/R által okozott infarktus területének csökkentését nemcsak az α -MSH-kezelt szívekben, hanem a kontroll állatokban is.

A HO-1 expressziójának szignifikáns növekedése, valamint az α -MSH által stimulált miokardiális HO-1 aktivitás azt bizonyítja, hogy a hormon képes fokozni ezt a fontos adaptációs választ, ami tovább hangsúlyozza a terápiás alkalmazásának lehetőségét.

A jelen tanulmány második fázisának eredményei rávilágítanak arra, hogy az α -MSH-val kezelt cukorbeteg állatok kisebb mértékű súlygyarapodást produkáltak a csak vivőanyaggal kezelt patkányokhoz képest, habár ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, valószínűsíthetően az alacsony mintaelemszám miatt. Ennek ellenére, a kísérlet végén szignifikáns különbséget tapasztaltunk

az α -MSH-val kezelt kísérleti állatok bal kamra tömegének teljes testhez viszonyított tömegében a Kontroll patkányok értékeihez viszonyítva. Ennek fő magyarázata lehet, hogy a kontroll állatok bal kamrájának fala jelentősebb vastagodáson ment keresztül, mint az α -MSH-val kezelt csoport tagjainak bal kamrája. Mivel ez a jelenség, ami ventrikuláris hipertrófia néven ismert, emelkedett kockázatot jelent az iszkémiás szívelégtelenség kialakulására, az ebben a kutatásban szereplő, jótékonynak bizonyuló α -MSH kezelés, potenciálisan humán klinikai alkalmazásba kerülhet.

A bemutatott echokardiográfiai eredmények a hosszú távú α -MSH kezelés kardiovaszkuláris szisztolés és diasztolés funkciókra gyakorolt protektív szerepére utalnak. Ez az eredmény releváns a kutatásunk első fázisának eredményeihez, melyben különböző α -MSH dózisok (10, 100 és 250 μ g/kg) akut egyszeri adminisztrációjának echokardiográfias paraméterekre kifejtett befolyását vizsgáltuk, és a szisztolés funkciók (EF, FS) szignifikáns javulását detektáltuk. A krónikus α -MSH kezelés hasonló hatást idézett elő. Különösképpen, a hormonterápiában részesülő állatok frakcionális rövidülése, ejekciós frakciója, verőtérfogata és perctérfogata emelkedett szignifikánsan a Kontroll patkányok értékeihez képest (FS: $32,33 \pm 0,421\%$ vs. $36,83 \pm 0,703\%$; EF: $66,50 \pm 0,067\%$ vs. $72,00 \pm 0,774\%$, SV: $0,41 \pm 0,046$ mL vs. $0,581 \pm 0,030$ mL; CO: $77,55 \pm 7,763$ mL/perc vs. $112,30 \pm 6,110$ mL/perc ebben a sorrendben). A bal kamrai kiáramlási pálya (LVOT) értékei szintén emelkedtek a kezelt csoportban, direkt összefüggést demonstrálva az emelkedett EF, FS, SV és CO paraméterekkel, mint a szisztolés funkció jelzőivel.

Korábbi kutatások azt igazolták, hogy az α -MSH nem befolyásolja vagy csak nagyon csekély mértékben emeli a vérnyomást. Sőt, a hormon más echokardiográfiai paraméterekre gyakorolt hatása is átgondolandó. Például, az emelkedett bal pitvar-aortagyök arány (LA/Ao), ami bal pitvari tágulásra utal. Ebben a tanulmányban az α -MSH csökkentette ezeket az értékeket, habár mindkettő az egészséges tartományban maradt. Az MV (mitrális billentyű) decelerációs időt (ms), ami a bal kamra remodellingnek és diasztolés diszfunkciónak egy erős prognosztikai markere, ugyancsak megvizsgáltuk. Az α -MSH ozmotikus pumpa kezelés szignifikánsan javította a diabétesz-indukált diasztolés diszfunkciót. A kezelt állatok mitrális billentyű decelerációs idő ($66,67 \pm 3,201$ vs. $85,50 \pm 5,258$ ms) és IVRT ($58 \pm 1,826$ vs. $43,00 \pm 1,125$ ms) értékei javulást mutattak a kontroll állatokhoz képest. Jelen kutatás kísérletei kiterjedtek a mitrális annuláris sík szisztolés kitérésének (MAPSE) mérésére is, amit bal atrioventrikuláris sík elmozdulásának is nevezünk (AVPD). Korábbi tanulmányok igazolták, hogy összefüggés van a csökkent MAPSE érték, valamint az életkor, illetve a miokardiális infarktuson átesett, szívelégtelenségben vagy pitvarfibrillációban szenvedő betegek bal kamra funkciója között, és hogy a MAPSE a hagyományos echokardiográfiai markereknél érzékenyebb paraméter a bal kamrai szisztolés funkció korai stádiumú romlásának detektálására. A szívfunkció egy másik mérőszáma ebben a kutatásban a miokardiális performációs index (MPI), ami egy egyszerűen elvégezhető, regisztrálható és jól reprodukálható, Doppler áram segítségével meghatározott érték. Az MPI, mint egyedülálló prognosztikus marker, használható a diabéteszes kardiális diszfunkció jellemzésére. A kutatásunkban

kimutattuk, hogy a hosszú távú α -MSH kezelés szignifikánsan javította mindkét paramétert; MAPSE: $1,602 \pm 0,045$ mm vs. $2,268 \pm 0,010$ mm, MPI: $0,491 \pm 0,014$ vs. $0,392 \pm 0,013$.

A Langendorff-apparátusban kivitelezett izolált „dolgozó szív” modell során szignifikánsan emelkedett preisztkémiás nyomásváltozást mértünk (dp/dt) az MSH csoportban a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. Az iszkémia/reperfúziós sérüléshez kapcsolatosan az AF, dp/dt, AoP értékek szignifikánsan csökkentek mindkét csoportban a preisztkémiás értékekhez viszonyítva. Annak ellenére, hogy majdnem minden eredmény romlott a 120 perc reperfúzió végére, emelkedett AF és SV értékeket mértünk az α -MSH-val kezelt csoportban a kontroll értékekhez képest, a reperfúzió 30. percében. Sőt, mi több, a hormonterápiában részesülő állatok posztisztkémiás CO és SV paraméterei nem csökkentek szignifikánsan a kiindulási, preisztkémiás értékekhez képest. Ezek az eredmények konzisztensek az első fázis eredményeivel, miszerint az α -MSH kezelés szignifikánsan csökkenti az iszkémia/reperfúzió indukálta infarktusz területének méretét, növeli a CO és SV nagyságát, ezáltal további bizonyítékul szolgálnak a hormon kardioprotektív hatásainak igazolásához. Jelen tanulmány első fázisa, valamint korábbi közlemények demonstrálták, hogy a melanokortinok védelmet nyújtanak a nyújtott időtartamú miokardiális iszkémia/reperfúzió által okozott szövetkárosodással szemben, a HO-1, JAK/ERK/STAT szignalizáció aktiválásán keresztül, valamint a pro-inflammatorikus TNF- α , pro-inflammatorikus/pro-apoptotikus pJNK faktor expressziójának csökkentése révén, illetve a nervus vagus által mediált kolinerg és anti-inflammatorikus útvonal aktiválásával. A kardiomiocita kontrakciós teljesítmény adatainak elemzése javult aktin-miozin kölcsönhatást, illetve a magasabb aktív feszülésre való hajlandóságot mutatott – ami fejlettebb kardiomiocita mechanikai teljesítményre enged következtetni, mely hozzájárulhat az α -MSH globális kardiális kontraktilitásra gyakorolt jótékony hatásához. Ezzel ellentétben úgy tűnik, hogy az α -MSH-nak nincs hatása a kontraktilis apparátus Ca-érzékenységére. Sőt, mi több, az is kiderült, hogy az α -MSH semmilyen káros hatást nem gyakorol a cerebrális vaszkuláris simaizomra. Pontosan, nem változtatta meg a KCl, szerotonin, illetve angiotenzin-II-re adott választ, ami az α -MSH általi stimulációra adott vaszkuláris válasz hiányára utal.

Korábbi tanulmányokkal összhangban, az egyik legfőbb hipotézis, ami a hormon protektív hatását magyarázhatja, az az immunmoduláns, anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonsága. Ezek a jelenségek a jelen kutatás megtervezésének egyik legfőbb alapjául szolgáltak, mely terv magában foglalta a NADPH oxidáz enzim aktivitásának mérését. Mindazonáltal a kutatás lényeges limitáló tényezője, hogy a hormon antioxidáns kapacitását csupán a NADPH oxidáz aktivitásmérésével igazoltuk. A hormon jótékony hatásainak tisztázására szolgáló további lehetséges mechanizmusok intenzív kutatások tárgyát képezik.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kimutattuk, hogy az α -MSH kezelés szignifikánsan javította az iszkémia/reperfúziót elszenvedett szívizom EF-ját, FS-ét, CF-ját és AF-ját, ezáltal összefüggésbe hozható az izolált „dolgozó szív” modell során tapasztalt javult szívfunkcióval illetve, hogy ezen változások háttérében jelentős szerep jut a HO-1 antioxidáns rendszer aktivitásának, melyet az α -MSH kezelés képes volt fokozni.
2. Bebizonyítottuk, hogy az α -MSH kezelés – valószínűsíthetően a HO-1 indukción keresztül, gátolja az aritmiás események kialakulását a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoporthoz képest. A hormonkezeléssel párhuzamosan alkalmazott SnPP a kamrai aritmiákra való hajlamot fokozta, ami arra utal, hogy a HO-1 ebben a vonatkozásban kardioprotektív hatású.
3. Kimutatásra került, hogy az α -MSH előkezelés képes csökkenteni az iszkémia/reperfúzió-idukált infarktus területének méretét, mely hatásnak az egyik leglényegesebb mechanika alapja a HO-1 citoprotektív képességében rejlik, hiszen az enzim SnPP általi gátlása megakadályozta az I/R által okozott infarktus területének csökkentését nemcsak az α -MSH-kezelt szívekben, hanem a kontroll állatokban is.
4. Kiemelendő eredményünk, hogy a hosszú távú α -MSH kezelés csökkentette a diabéteszben megfigyelhető bal kamra hipertrofiát, illetve szignifikánsan javította a diabéteszes állatok szisztolés (frakcionális rövidülés, ejekciós frakció, verőtérfogat és perctérfogat), valamint diasztolés (mitrális billentyű decelerációs idő, MAPSE, MPI) szívfunkcióját.

Kutatásunk eredményei azt sugallják, hogy az α -MSH kezelés mind egészséges miokardiumban, mind pedig a diabétesz által károsított szívizomszövetben jelentős protektív szereppel bír, mely kiterjed a szisztolés és diasztolés funkciókra egyaránt, normál, illetve iszkémia/reperfúziós körülmények között is. A hormon által megemelt HO-1 expresszió, illetve miokardiális enzimaktivitás fokozódás arra utal, hogy az α -MSH kezelés képes serkenteni a szívizom antioxidáns kapacitását, ami tovább hangsúlyozza a terápiás alkalmazásának lehetőségét, tekintve, hogy számos patológiás folyamatban a krónikus gyulladáshoz vezető reakciók állnak a szívizomkárosodás háttérében. Összességében eredményeink felvetik az α -MSH kezelés humán kardiológiai gyakorlatba kerülésének lehetőségét. Mindazonáltal a hormon jótékony hatásainak további lehetséges mechanizmusai intenzív kutatások tárgyát képezik.



Nyilvántartási szám: DEENK/271/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szokol Miklós
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Vecsernyés, M., **Szokol, M.**, Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Fülöp, G. Á., Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Alpha-MSH induces vasodilatation and exerts cardioprotection via the heme-oxygenase pathway in rat hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.227
2. **Szokol, M.**, Priksz, D., Bombicz, M., Varga, B., Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Csípő, T., Pósa, A., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Long term osmotic mini pump treatment with alpha-MSH improves myocardial function in Zucker Diabetic Fatty rats.
Molecules. 22 (10), 1-18, 2017.
IF: 3.098

További közlemények

3. Pápai, G., Csató, G., Rácz, I., Szabó, G. T., Bárány, T., Rácz, Á., **Szokol, M.**, Sármán, B., Édes, I., F., Czuriga, D., Kolozsvári, R., Édes, I.: The transtelephonic electrocardiogram-based triage is an independent predictor of decreased hospital mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention.
J. Telemed. Telecare. 26 (4), 216-222, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1357633X18814335>
IF: 2.616 (2019)
4. Kracsó, B., Kertész, A. B., Vajda, G., Vajda, C., Jenei, C., Rácz, I., Szerafin, T., **Szokol, M.**, Balogh, Á., Csanádi, Z., Bódi, A.: Nehéz helyzetben a HEART Team: valve-in-valve implantáció?
Cardiol. Hung. 48 (1), 31-35, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2018.48.1.31>





5. Gulácsi-Bárdos, P., **Szokol, M.**, Lódi, M., Czuriga, D., Czuriga, I., Édes, I., Nagy, A. C., Sármán, B.: Ischaemiás szívbetegség és tumoros betegségek együttes előfordulása: kérdések és problémák.
Orvosi Hetilap. 158 (43), 1691-1697, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30897>
IF: 0.322
6. Pápai, G., Rácz, I., Szilágyi, S., **Szokol, M.**, Mártai, I., Gorove, L., Göndöcs, Z., Tóth, G., Hegedűs, J., Muzsik, B., Édes, I.: Ezt a beteget elvesztettük volna...
Cardiol. Hung. 41, 3-5, 2011.
7. Nagy, Z., **Szokol, M.**, Péterffy, Á.: Direct ostioplasty of the left main coronary artery using the right internal thoracic artery as patch material.
Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. 20 (6), 1233-1234, 2001.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)00992-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940(01)00992-7)
IF: 1.676
8. Péterffy, Á., Horváth, G., Tamás, C., Bodnár, F., **Szokol, M.**, Vaszily, M.: Szívűtétek Jehova tanúinál.
Orv. Hetil. 141 (18), 959-961, 2000.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,939

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,325**

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

Debrecen, 2020.09.29.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Juhász Béla egyetemi docensnek, hogy PhD hallgatójává fogadott, közös munkánk során véget nem érően támogatott és mindemellett barátságával is megajándékozott.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Szilvássy Zoltán Intézetvezetőnek a lehetőséget, hogy PhD munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetnél végezhettem.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Csanádi Zoltánnak és Prof. Dr. Édes Istvánnak, a Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika jelenlegi és korábbi vezetőjének, akik lehetővé tették, hogy az általuk vezetett Klinika munkatársaként gyakorolhassam hivatásom és termékeny táptalajt biztosítottak mind a betegellátás, mind a tudományos munka magas színvonalú végzésére.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kurucz Andreának, aki számtalan szakmai észrevételével jelentősen hozzájárult munkám létrejöttéhez.

Külön köszönöm Dr. Lampé Nórának önzetlen és kitartó baráti támogatását tanulmányom során.

Továbbá köszönettel tartozom a Farmakológia Intézet és a Kardiológia Intézet minden munkatársának, akik előmozdították jelen dolgozatom megszületését.

Végtelen köszönet családom minden egyes tagjának, töretlen belém vettet hitéért, melyre bizton támaszkodhatok a mindennapok során.

Külön köszönet:

Édesapámnak, Dr. Szokol Miklósnak, aki gondoskodó szeretete mellett, már gyermekkoromban is követendő szakmai utat mutatott.

Édesanyámnak, Hargitay Borbálának, aki féltő és odaadó szeretetével, kimeríthetetlen energiájával támogatott életem során.

Feleségemnek, Szokol Lillának és kisfiamnak, Szokol Miklósnak, hogy mindig erőt meríthetek belőlük, és hogy teljessé tették az életemet.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében. Ezen felül az értekezés a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 számú „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” projekt keretében az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával és a Tématerületikiválósági program 2019, ED_18-1-2019-0028 valósult meg.

