

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Hagyományos terápiás lehetőségek új szemszögből a szívizomban

dr. Szőke Kitti

Témavezető: Dr. Lekli István



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2022

Hagyományos terápiás lehetőségek új szemszögből a szívizomban

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

Írta: dr. Szőke Kitti okleveles gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Lekli István, PharmD, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Pósa Anikó, PhD
Dr. Kertész Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Pósa Anikó, PhD
Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
Dr. Kertész Attila, PhD
Dr. Csiki Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, In Vitro Diagnosztikai Tömb
Előadóterem
2022. június 22. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	4
2. Anyagok és módszerek.....	8
3. Eredmények.....	16
4. Megbeszélés	20
5. Összefoglalás.....	25

1. Bevezetés és célkitűzés

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) által okozott elhalálozások az egyre korszerűbb és sikeresebb gyógyszer kezelés és invazív ellátások hatására javuló tendenciát mutatnak, de ennek ellenére még napjainkban is változatlanul vezető szerepet töltenek be a mortalitási statisztikában. A WHO adatai alapján 2019-ben körülbelül 17,9 millió ember halt meg a világon szív- és érrendszeri betegség következtében, amely a globális halálok 32 %-a. Ezen halálok, 85 %-a a sztróknak és szívinfarktusnak volt köszönhető. A Központi Statisztikai Hivatal (KSH) 2019 felmérése alapján a 18 évesnél idősebbek körében a legnagyobb egészségügyi probléma a magasvérnyomás-betegség. A magas vérnyomás kockázata az életkor növekedésével emelkedik. A keringési rendszer betegségei közül az iszkémiás szívbetegség szintén élen jár.

A szív- és érrendszeri betegségek kezelési költsége jelentősen megterheli az egészségügyi kiadásokat is, ezért fontos a megelőzés szerepének előtérbe helyezése. Ezen kétségteljes statisztikai adatok alapján fontosnak véljük az új prevenciós eljárások bevezetését és új, hatékonyabb, kedvezőbb mellékhatás profillal rendelkező gyógyszerek fejlesztését.

Az iszkémiás szívbetegség során a szívizom oxigén igénye és ellátása közötti arány felborul, amely a kontrakció és relaxáció zavarához, az előterhelés növekedéséhez, a diasztolés volumen és a végdiasztolés nyomás növekedéséhez vezet. Számos metabolikus változás történik az iszkémia és reperfúzió során, melyek következtében az aktív transzport folyamatok működése sérül és elégtelenné válik. A reaktív oxigén intermedierek és gyulladásos mediátorok termelődnek a sejtekben, amely arrithmiához, apoptotikus és nekrotikus elváltozások kialakulásához vezetnek. Az iszkémiás miokardium felépülése érdekében nélkülözhetetlen a csökkent keringésű miokardium területek vérrellátásának az időben történő javítása, illetve elzáródás esetén a keringés megindítása, a reperfúzió. Habár a reperfúzió nélkülözhetetlen a megfelelő keringés biztosításához, mégsem kockázatmentes, hiszen számolnunk kell azzal, hogy az iszkémiás szöveteket megnövekedett nyomású keringés terheli meg, amely reverzibilis és irreverzibilis károsodáshoz is vezethet.

A szabad gyökök olyan atomok vagy molekulák, amelyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Fiziológiai körülmények között kis mennyiségben termelődnek, amelyek nélkülözhetetlenek számos biokémiai folyamatokhoz. Azonban patológiai körülmények között a ROS mennyisége jelentősen megnő, amit az antioxidáns védelmi rendszer próbál eliminálni. A miokardiális iszkémiát követő reperfúzió a sejtek túlélésének feltétele, azonban paradox módon súlyos károsodásokat is okozhat. A reperfúzió kezdetén a

hirtelen reoxigenizáció és a mitokondriális légzési lánc károsodása nagymértékű ROS felszabaduláshoz vezet. Az antioxidáns rendszer elsődleges védelmi vonala az endogén enzimek és a fémkötő fehérjék. Az enzimek közé tartozik a szuperoxid diszmutázok (SOD), kataláz (KAT), glutation-transzferáz (GST) és a glutation peroxidázok. Azonban, ha túlzott mértékű a ROS termelődés vagy az antioxidáns rendszer kapacitása csökkent, felborul az egyensúly és oxidatív stressz alakul ki, amely során a proteinek, lipidek, szénhidrátok, nukleinsavak károsodnak. A ROS jelentős szerepet tölt be a szívkoszorúerek megbetegedésének (CAD) kialakulásában és progressziójában. A hemoxigenázok (HO) olyan mikroszómális, evolúciósan konzervált enzimek, amelyek a hem degradációjának sebesség meghatározó lépését katalizálják. A reakció végeredményeként biliverdin, szén-monoxid (CO) és szabad vas keletkezik. A biliverdin a biliverdin-reduktáz (BVR) segítségével bilirubinná alakul tovább, a vas pedig a ferritinhez kötődik

A HO-1 az endogén hemen kívül számtalan stimulusra és ágensre indukálódhat, amelyek oxidatív stresszt és patológiás állapotokat okoznak. Ilyen induktor például az iszkémia, glutation-deplécio, hipoxia, hiperoxia, endotoxinok, nehézfémek, ultraviola sugárzás, hipertermia, szulfhidril reagensek és a nitrogén-monoxid. A HO-1 ezáltal fontos szerepet tölt be az oxidatív stressz szembeni védekezésben és az aktivitásának fokozásával a sejtkárosodás mértéke csökkenthető. A hem lebontás során keletkező termékeknek köszönhető a HO protektív tulajdonságai, mint az antioxidáns, antiinflammatorikus és az antiapoptotikus tulajdonsága. Jelentős kardioprotektív hatással is rendelkezik a HO-1, amelyet számos kutatás bizonyít.

Az *Allium sativum*, hétköznapi nevén fokhagyma, az egyik legfontosabb zöldségnövény. Az emberi szervezetre gyakorolt jótékony hatásai több ezer éve ismertek, amelyeket számos tudományos kutatás támaszt alá. Gasztronómiai újdonságként egyre szélesebb körben elterjedt a friss fokhagyma fermentált változata, amely az eredeti fokhagyma számos tulajdonságát magában hordozza, de illatában, ízében és összetételében az újdonság erejével ható változások történnek. A friss fokhagyma egy természetes úton való öregedési folyamaton megy keresztül, amikor a fokhagyma fekete, puhább, zselés állagú és édesebb lesz. A fermentáció során a hő denaturálja az allicináz enzimet, amely így nem tudja a jellegzetes illatért felelős allicin kialakítani, valamint a Maillard reakció felelős a sötét színért és karamellizált ízért. A fekete fokhagyma összetételét tekintve eltér a fokhagymától, az antioxidáns tulajdonságú aktív vegyületek száma megnő.

A fokhagyma aktív összetevői a közel 33 organikus kén tartalmú vegyület, mint például diallil szulfid (DAS), diallil diszulfid (DADS), diallil triszulfid (DATS), cisz-ajoen, transz-

ajoen, S-allil-cisztein (SAC) és S-allil-cisztein-szulfoxid (alliin). Továbbá néhány enzimet is tartalmaz, mint például az allináz, peroxidáz, mirozináz enzimek. Az ép fokhagyma gerezdben nincs jelen a fokhagyma jellegzetes illatáért felelős alllicin (diallyl-tioszulfínát), amely számos terápiás hatásért felelős. Az ép fokhagymában fizikailag elkülönítve található az alliin és allináz enzim, amelyek a fokhagyma gerezd összevágásával, törésével kapcsolatba kerülnek és az enzim hatására kialakul az alllicin. A fokhagyma gyógyászati értéke igen jelentős, a farmakológiai kutatások az antimikrobiális tulajdonságaira fókuszáltak eleinte. Számos tanulmány bizonyítja, hogy jelentős antioxidáns és gyulladásgátló hatással is rendelkezik a fokhagyma. A fokhagyma kivonat a SOD, GPX and CAT antioxidáns enzimek aktivitását növeli. Továbbá a fokhagyma fogyasztása szerepet játszhat a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésében és kezelésében. A fokhagyma kardioprotektív hatása háttérében az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátló hatás, NO biohasznosulás javítása, H₂S produkció fokozása és az antioxidáns hatása áll. A fokhagymafogyasztás csökkenti többek között, az ateroszklerózis, magas vérnyomás, diabetes, hiperlipidémia és a miokardiális infarktus kockázatát. A fokhagyma vérnyomás csökkentő hatása egyrészt az antiaterogén hatásával másrészt a vazodilatációt okozó hatásával magyarázható. Utóbbi hatás feltehetőleg az endogén NO-szintézis fokozásával alakul ki. A fokhagyma jelentős antihiperlipidémiás hatással is rendelkezik, amit számos humán és állatkísérlet támaszt alá. Az alllicin a koleszterinszintézis sebesség meghatározó lépését katalizáló enzim, a HMGCoA reduktáz potens gátlójának bizonyult

Az iszkémiás szívbetegségek báziskezelésének fontos eleme a trombocita aggregációt gátlók. A trombocita aggregációt gátló gyógyszerek egyik legrégebb óta ismert és legfontosabb képviselője az acetilszalicilsav (ASA). Az ASA-t alkalmazzák az akut kezelések során, mint például akut miokardiális infarktus (MI), stabil és instabil angina pectoris során, artériás érsebészeti beavatkozások után (pl. PTCA, CABG). Továbbá különböző társbetegségek kardiovaszkuláris szövődményeinek csökkentésére is használják. Multicentrikus, randomizált vizsgálat, ISIS-II igazolta, hogy az azonnal adott 162,5 mg aszpirin csökkenti a mortalitást az akut miokardiális infarktust követően. A PCI-CURE tanulmány szerint már a kis dózisú (≤ 100 mg) aszpirin is hatásos a perkután koronária intervenciót követően. Az aszpirin hatását úgy fejtí ki, hogy acetilálja a ciklooxygenáz enzimet, így az enzim irreverzibilisen bénul. Az aszpirin alkalmazásának korlátja a gyakran és már kis dózisban is jelentkező mellékhatásai, mint például: gyomorfekély, -vérzés. A nyálkahártya károsodás háttérében többféle mechanizmus áll. Egyrészt a csökkent prosztaglandin szintézis miatt alakulhat ki, ugyanis a prosztaglandin E₂

és I_2 gátolja a gyomorsav-elválasztást, serkenti a gyomor mucustermelését és szerepe van a mikrocirkuláció fenntartásában is. Másrészt, az acetilszalicilsav lokális, irritatív hatása is hozzájárul a nyálkahártya károsodásához. A gyógyszerkutatás során az egyik fő cél ezen mellékhatások csökkentése. Mindezek vezettek el a hibrid aszpirinek kidolgozásához, mivel a nitrogén-monoxid (NO) és/ vagy a kénhidrogén (H_2S) felszabadulásával csökkenthetőek a mellékhatások. A hibrid aszpirin csoport olyan acetilszalicilsav kovalens konjugátum, amelyek NO és/ vagy H_2S kibocsátó csoportot tartalmaz. A NO egy fontos mediátor és neurotranszmitter szereppel bíró gáz halmazállapotú molekula a szervezetben, fiziológiás értágító, amely szerepet játszik az arteriolák és a kis artériák bazális tónusának beállításában is. A sejtekben a NO argininből keletkezik a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) hatására. A szervezetben a NO szabadon diffundál és a célsejtekhez érve aktiválja a guanilát cikláz enzimét, amely hatására emelkedik a cGMP- szint. Gátolja a trombociták aggregációját és adhézióját is. Ezen kívül fontos szerepet tölt be a gastrointesztinális nyálkahártya károsodás védelmében is. Egyrészt gátolja a gyulladásos mediátorok felszabadulását a hízósejtekből, másrészt serkenti a mucos szekréciót. Továbbá kedvezően hat a már kialakult fekélyekre is. A NO -t felszabadító hibrid aszpirinek gátolhatják a ciklooxygenáz-1 (COX-1) inhibíciója miatt kialakuló gyomorfekélyt is. Kezdetben elsősorban nitrátészter tartalmú hibrid aszpirineket szintetizáltak. Azonban a nitrátok alkalmazásának egyik legnagyobb korlátja a nitráttolerancia kialakulása, amely leggyakrabban a tartós és/vagy nagy dózisú kezelés során alakul ki. Előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek a nitrátokhoz hasonló szerkezetű, újabb antianginás szerek, mint például a molszidomin, amelynél sokkal ritkább a toleranciakialakulása. Ilyen NO-t felszabadító aszpirin hibrid vegyület az ERJ-500 is, amelyet a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészkémia Tanszék munkatársai szintetizáltak. Az ERJ-500 egy olyan aszpirin-észterszármazék, melyben a karboxilcsoporthoz a vízdékonyságot fokozó tetraetilenglikol láncsal csatlakozó linszidomin molekularészlet található, amely a molszidomin aktív hatású metabolitja.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Módszerek I. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív-és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban

2.1.1. Kísérleti állatok

A kísérleteink első részét hím Sprague-Dawley (SD) patkányokon végeztük. Az állatoknak szabad hozzáférést biztosítottunk a standard rágszáló táphoz (R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) és a vízhez. Az állatok 12 órás sötét-fény periódusú környezetben voltak tartva, amelynek a hőmérséklete $25 \pm 2^\circ\text{C}$ és relatív páratartalma $55 \pm 5\%$ volt. A kezelések megkezdése előtt egy hétig akklimatizálódtak a patkányok. Az állatok kezelését és a kísérleti elrendezését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DEMAB) engedélyezte. (Magyarország. UD etikai engedély száma: 3/2012/DE MÁB). Kísérletünk során a DEMAB irányelveit tartottuk szem előtt az Európai Unió és a „Principles of Laboratory Animal Care” valamint a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban.

2.1.2. Kezelési protokoll

A patkányok kezdeti testtömege 575 ± 45 g volt. Az állatokat véletlenszerűen 3 csoportra osztottuk, minden csoportban 9 patkány volt. Az első csoport a kontroll csoport volt, amely állatok vivőanyagot, 2%-os (m/m %) hidroxietil-cellulóz oldatot, kaptak gyomorszondán keresztül. A második csoport patkányai 300 mg/ttkg fokhagyma őrléménnyel szuszpenzió formájában kezeltük szintén gyomorszondán keresztül. A harmadik csoport állatai pedig 300 mg/ttkg fekete fokhagyma kivonat tartalmú szuszpenziót kaptak. A kezelések 4 héten keresztül történtek, minden nap. A testtömegeket a kísérlet kezdetén és a végén mértük.

2.1.3. Fekete fokhagyma előállítása:

A fokhagymát gerezdjeire szedtük és a külső héjától teljesen megfosztottuk. A megtisztított fokhagyma gerezdeket szuvidálásra alkalmas vákuum tasakokba zártuk vákuumcsomagoló gép segítségével. Ezt követően 3 héten keresztül 75°C -on szárítószekrényben érleltük.

2.1.4. GC-MS analízis

A fokhagyma és a fekete fokhagyma összetételének vizsgálatát SPME-GC-MS módszerrel végeztük. A SPME mintaelőkészítés manuálisan történt, az egyes mintákat összevágást és összetörést követően egy szeptummal rendelkező headspace-be helyeztük. Az extrakciót kézi eszközzel végeztük a szeptumon keresztül, amihez $85\ \mu\text{m}$ -es poliakrilát szálát

alkalmaztunk. Az extrakciós idő 1 óra, az extrakciós hőmérséklet pedig 50°C volt. Az egyes komponenseket GC-MS módszerrel azonosítottuk, egy Hewlett-Packard gyártmányú 5890 Series II típusú gázkromatográf – 5971A típusú tömegspektrométeren. A mintát HP-5 állófázisú kapilláris oszlopra vittük fel (25 m x 0,25 mm x 0,25µm). A vivőgáz hélium (1 mL/perc, 40°C) volt és állandó volt az injektor nyomás. Az elemzési hőmérséklet a következő volt: 55°C kiindulási hőmérséklet 2 percig, majd 20°C/perc melegítéssel 200°C vég hőmérséklet eléréséig. A teljes elemzési idő 27 perc volt. Az injektor hőmérséklete 200°C volt, töltet nélküli szilanizált linert alkalmaztunk. A transzfer line hőmérséklete 280°C volt. Az ionizációs energia 70 eV, a tömegtartomány 10-500 AMU volt. A GC-MS vezérlése, az adatgyűjtés és az eredmények kiértékelése Hewlett-Packard GC-MS Chemstation rev.3 program segítségével történt. A komponenseket a tömegspektrumok felhasználásával, Nist98 és Wiley adatbázisok segítségével azonosítottuk.

2.1.5. Izolált dolgozó szív preparátum, szívfunkciós paraméterek:

A 4 hetes kezelési periódus végén, 24 órával az utolsó kezelést követően az állatokat intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitál (60mg/ttkg) injekcióval altattuk el, valamint antikoagulánsként intravénásan heparint (1000 U/kg) kaptak. Az anesztézia alatt torakotómiát végeztünk, izoláltuk a szívet, majd jéghideg módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe (KHB) (tartalma: 118 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, és 5,0 mM glükóz) helyeztük. Ezt követően az aortán át kanüláltuk a szívet és 5 percen keresztül nem dolgozó módban, módosított KHB pufferrel perfundáltuk 100 vízcentiméter nyomás mellett azért, hogy kimossuk a vért a vaszkulaturából. A puffert a kísérlet időtartama alatt karbogen gázzal (95% O₂ és 5% CO₂) buborékolattuk és 37°C-on tartottuk. A pulmonáris vénát kanüláltuk az 5 perces mosási szakasz alatt, majd a készüléket átkapcsoltuk dolgozó módba 10 percre. Dolgozó mód során az aortás beáramlást elzártuk, a vena pulmonáris felől perfundáltuk a szívet 17 vízcentiméteres nyomással. A 10 perces dolgozó módot követően regisztráltuk az alapértékeket. A teljes kísérlet időtartama alatt az aortanyomást egy nyomásmérő segítségével mértük. (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia), amelyet minden kísérlet előtt kalibráltunk. A szívfrekvenciát (HR) és az aorta nyomás idő szerinti első deriváltja (AOdP/dT) a folyamatosan rögzített aortanyomásból számolta a szoftver. A koronária áramlást (CF) a koronáriákból kiáramló folyadék 1 percig tartó összegyűjtésével mértük. Az aorta kiáramlást (AF) az utóterhelés után 1 perc alatt mért visszacsöpögő puffer mennyiségével adtuk meg. A perctérfogatot (CO) az AF és a CF összegeként, a verőtérfogatot (SV) pedig a CO és a HR hányadosaként határoztuk meg. A

verőtérfogat változást úgy számoltuk, hogy az SV reperfúzió utáni értékét elosztottuk a hozzátartozó alapértékkel, majd szoroztuk 100-zal. Az alapértékek rögzítését követően 30 perc globál iszkémiát váltottunk ki, amit 120 perc reperfúzió követett. A fatális kimenetelű kamrai fibrillációk elkerülése érdekében a reperfúzió első 10 perces szakaszát Langendorff módban indítottuk el. A szívfunkciós értékeket rögzítettük 30, 60 és 120 perc reperfúzió után.

2.1.6. Infarktusos terület meghatározása:

A miokardiumot ért infarktusos terület meghatározásához TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) festést végeztünk. TTC festés során az élő sejtekben lévő dehidrogenázok hatására a TTC molekula redukálódik. Az enzimatikusan aktív sejteknél az átalakulás során így a sárga színű, vízben oldható TTC festék vörös színű, vízben oldhatatlan trifenil-formazán csapadékká alakul át. Azonban az elhalt sejtek nem képesek redukálni a TTC festéket, így ezen sejteknél nem figyelhető meg a színváltozás. Az iszkémia/reperfúziót követően 50 ml 1%-os trifenil-tetrazólium-klorid oldattal perfundáltuk a szíveket. Ezt követően -70°C-on fagyasztottuk, majd a kamrai szövetet transzverzálisan 1-2 mm-es szeletekre vágtuk az apico-bazális axisra merőlegesen. Szkennelést követően lemértük a tömegüket. A veszélyeztetett és az infarktusos zóna területének nagyságát Fiji planimetriás szoftverrel határoztuk meg. Az egész "risk" zónához hasonlítottuk az infarktusos terület nagyságát és ezek arányának a szeletek tömegéhez viszonyított értékeit ábrázoltuk a grafikonon.

2.1.7. Vér paraméterek

A 4 hetes kezelést követően, az állatok altatása után a bal oldali juguláris vénából vért gyűjtöttünk a vérparaméterek meghatározása érdekében. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézete végezte. Az alábbi paraméter értékeket vizsgálták: alanin aminosztransferáz (ALT), alkalikus foszfatáz (ALP), aszpartát aminosztransferáz (ASTL), összkoleszterin (CHO), alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL), triglicerid (TRIG, nagy sűrűségű lipoprotein (HDL), laktát dehidrogenáz (LDH), C-reaktív protein (CRP), and kreatin-kináz-myoglobin (CK-MB).

2.1.8. Fehérje izolálás

A fehérje izolálást során a szívszövet bal kamrájából kb. 300 mg-ot használtunk fel. A homogenizáló puffer összetétele a következő volt: 25mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM ortovanadát, 10mMNaF, 10 mM pirofoszfát, 10 mMokadánsav, 0,5 mM EDTA, 1mM PMSF, 1x proteáz inhibitor koktél, majd polytron homogenizátorral jégen tartva a mintát

homogenizáltuk. A homogenizáló oldat valamennyi összetevője a Sigma Aldrich-tól származott. Ezt követően 2000 rpm-en 4°C-on 10 percig centrifugáltuk mintákat. A felülúszót átpipettáztuk egy új Eppendorff csőbe és 10000 rpm-en 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót, amely a citoszolikus frakciót tartalmazta egy új csőbe tettük át. A fehérjék koncentrációjának meghatározásához BCA Protein Assay Kit-et (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) használtunk. Standardként marha szérum albumint (BSA) használtunk. A mintákhoz Laemmli puffert adtunk és 10 percig 98°C-on denaturáltuk.

2.1.9. Western blot analízis

A Western blot analízist a Chemidoc Touch Imaging System protokollja alapján végeztük. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását a 12 % TGX Stain-Free gélen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük. A mintákból 100 µg-ot vittünk fel minden zsebbe. A fehérjék elválasztását követően a gél-t aktiváltuk, UV fénnel exponáltuk, amely hatására a gél trihalo csoportjai kovalensen kapcsolódtak a fehérjék triptofán oldalláncaihoz. Majd a fehérjéket transzferáltuk a gélről PVDF membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A blottolás 120 V- os feszültségen 60 percen keresztül folyt. A membránra átranzferált fehérjéket a Chemidoc készülék segítségével digitalizáltuk, így rögzítettük a teljes fehérje mennyiséget az egyes mintákban. A membrán szabad kötőhelyeinek telítése (blokkolása) 5%-os (m/V %) sovány tejpörrel történt 1 órán keresztül, majd mostuk a membránt TBST oldattal 3x10 percig. A membránokat ezt követően primer antitesttel (HO-1 1/500, Abcam, Cambridge, UK; iNOS- 1:1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4°C-on. A következő napon, háromszori 10 perces TBST-vel történő mosást követően 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel (1/2000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). Végül 3x10 perces TBST-s mosást követően a membránokat Clarify Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével exponáltuk Chemidoc digital imagers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékben. Az eredmények kiértékelése Image Lab Szoftverrel történt. Az egyes fehérjéket a teljes fehérje mennyiségére normalizáltuk.

2.1.10. Statisztikai elemzés

A kapott adatokat a számtani átlag és a középérték standard hibájával (SEM) adtuk meg. A statisztikai adatok elemzését GraphPad Prism 7 szoftverrel (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA) végeztük. Egy utas ANOVA tesztet néztük az eltéréseket, majd Kruskal–

Wallis vagy Dunnett próbát végeztünk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p kisebb volt, mint 0,05.

2.2. Módszerek II. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata

2.2.1. In vitro kísérletek:

2.2.1.1. Oxidatív stabilitás:

Kémiai Fenton reakció:

Fenton reakciót Jurva és munkatársai által leírt módon végeztük kisebb módosításokkal. A vizsgálandó vegyületünkből 400 μL 2,5 mM-os oldatot elegyítettünk 50 μL 20 mM-os FeCl_3 oldattal, 50 μL 20 mM-os EDTA- Na_2 oldattal és 500 μL 10 mM-os aszkorbinsav oldattal. Ezt követően a reakciót 1 μL 30%-os H_2O_2 hozzáadásával indítottuk el. Az oldatot 1 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. A kísérlet során vakként ERJ-500-at nem tartalmazó oldatot használtunk. A kontrollként használt minta nem tartalmazott H_2O_2 -t. Az oldatokból 1 óra kevertetés után mintát vettünk, amit off-line elemeztünk egy ESI ionforrással és fecskendőpumpával felszerelt API2000 triplet kvadrupól tömegspektrométerrel (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). A tömegspektrumot m/z 100-500 tartományban, pozitív módban vettük fel Analyst 1.5.1. Szoftver (AB SCIEX, Concord, ON, Canada) segítségével.

Szintetikus porfirin rendszer:

A kísérletet Johansson és munkatársai által leírt módon végeztük kisebb módosításokkal. A kísérlethez 50 μL 10 mM-os ERJ-500 oldatot használtunk. Vizsgálati anyagunk oldatát elegyítettük 35 μL acetonitrillel (ACN), 315 μL 100 mM-os hangyasav oldattal, 50 μL 10 mM-os Fe(III) mezo-tetra(4-szulfonatofenil)porfin-klorid oldattal és 50 μL 30 %-os H_2O_2 -al, majd 37 °C-on rázattuk 30 percig 700 fordulat/perccel ThermoMixer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) használatával. Az off-line LC-MS analízist (Kinetex XB-C18 2,6 μm kolonna, 0,1% hangyasavval elegyített ACN és 0,1% hangyasav eluensek, gradiens elúció) LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) lineáris ioncsapda analizátorral és ESI ionforrással szerelt tömegspektrométerrel végeztük pozitív módban.

2.2.1.2. A sejtek életképességének vizsgálata MTT assay-vel

Az ERJ-500 vegyület toxicitását kolorimetriás MTT módszerrel vizsgáltuk H9c2 sejtvonalon. A H9c2 kardiomiocita sejtvonal az ATCC-től (CRL-1446, LGC Standard GmbH Wesel, Németország) származott. Az életképes sejtek mitokondriális dehidrogenázai a sárga

színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot (MTT) lila színű formazán kristályokká redukálják, amelyek szolubilis formája fotometriásan mérhető. A lila szín erőssége az életképes sejtek arányával korrelál. A vizsgálathoz a sejteket 96 lyukú TPP plate-re szélesztettük, lyukanként 3000 db-ot. A kísérleteket 24 óra elteltével, a sejtek letapadását követően kezdtük el. A sejteket 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM koncentrációjú ERJ-500-al, valamint 100 µM molszidominnal, 100 µM aszpirinnel kezeltük. Pozitív kontrollként 1 %-os H₂O₂ kezelést alkalmaztunk. A sejteket a kezelést követően 24 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. Majd hozzáadtunk 20 µl sárga színű 5 mg/ml koncentrációjú PBS-ben oldott MTT oldatot, amivel 3,5 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően eltávolítottuk a sejtekről az oldatot és 200 µl izopropilalkohollal oldottuk fel a képződött formazán kristályokat, amellyel 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően az abszorbanciát mértük 570 nm-en és 690 nm-en a plate olvasó (FLUOstar Optima, BMG Labtech) segítségével. Az 570 nm-en mért érték az oldott formazán abszorpciós maximuma. A 690 nm-en mért érték a háttér értéket adta meg, amelyet korrigálásképpen kivontunk az 570 nm-en mért értékből. Az így kapott értékeket hasonlítottuk a kezletlen kontroll csoportéhoz.

2.2.1.3. Hemolitikus aktivitás mérés

A hemolízis teszthez elvégzéséhez Sprage Dawley patkányok vérért használtuk. A vért K₃EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekbe (BD, Plymouth, UK) vettük le. A vér alakos elemeinek elválasztásához 2500 g-n 10 percig centrifugáltuk a koagulált vért, majd háromszor mostuk PBS-el és végül szuszpendáltuk az oldatban. Az ERJ-500-at különböző koncentrációban PBS-ben oldottuk: 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM ERJ-500, valamint 100 µM MOL és ugyanilyen koncentrációjú ASA oldatot készítettünk. Az oldatokhoz 5x10⁷ számú erythrocytát adtunk, majd, 37°C-on 10 percig inkubáltuk, végül 5000 g-n centrifugáltuk. A felülúszóból mértük a hemolízist követően kiszabadult hemoglobin abszorbanciáját 540nm-en a FLUOstar OPTIMA Microplate Reader-el. A kontroll kísérletként az eritrocitákat duplán desztillált vízzel kevertük össze. A hemolízis százalékát a mintákat tartalmazó oldatok felülúszójából mért hemoglobin és a vizet tartalmazó oldat felülúszójából mért hemoglobin abszorbancia hányadosaként határoztuk meg és ábrázoltuk a koncentráció függvényében

2.2.2. Ex vivo kísérletek:

2.2.2.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket nőstény Sprague Dawley (SD) patkányokon végeztük. Az állatokoknak szabad hozzáférést *ad libitum* biztosítottunk a standard rágszáló táphoz (R/M-Z+H, ssniff

Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) és a vízhez. Az állatok 12 órás sötét-fény periódusú környezetben voltak tartva, amelynek a hőmérséklete 25 ± 2 °C és relatív páratartalma $55\% \pm 5\%$ volt. Az állatok kezelését és a kísérleti elrendezését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DEMAB) engedélyezte. Kísérletünk során a DEMAB irányelveit tartottuk szem előtt az Európai Unió és a „Principles of Laboratory Animal Care” valamint a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban.

Az állatkísérleti engedély száma 13/2017/DEMAB–Új vazoaktív hatóanyag vizsgálata.

2.2.2.2. Langendorff szívizoláció, izolált dolgozó mód

A 2.1.5. Izolált dolgozó szív preparátum, szívfunkciós paraméterek című fejezetben leírtak szerint történt néhány módosítással. Az ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásait nőstény SD patkányokon tanulmányoztuk. A patkányok testtömege 248 ± 6 g volt. Az 5 perces átmosási periódus követően Langendorff módban 10 percen keresztül adagoltuk az ERJ-500-at tartalmazó puffert, amit egy 10 perces kimosási szakasz követett, majd ismét 10 percig az ERJ-500-at tartalmazó puffer áramlott át a szíven. A kísérlet során $100\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, illetve $1\mu\text{M}$ -os koncentrációkban tartalmazta a puffertartály az ERJ-500-at.

Ezt követően izolált dolgozó módban is vizsgáltuk az ERJ-500 hatásait. A kontroll csoport 6 állatot, míg a kezelt csoport 11 állatot tartalmazott. Az előzőekben ismertetett szívizolációt követően a „nemdolgozó” módból „dolgozó” módba állítottuk át a készüléket. Dolgozó mód során elzárjuk az aorta felőli perfúziós oldat beáramlási lehetőségét és megnyitjuk a pulmonális véna felől. Ezzel lehetőséget biztosítunk a szívnek, hogy az aorta irányából a kontrakció következtében ki tudja pumpálni az egy összehúzódásra eső verőtérfogatot. A dolgozó módba való átkapcsolást egy 10 perces kimosási periódus követett. Majd regisztráltuk az alap dolgozó szív. A kezelt csoportban az ERJ-500 vegyületet a KHB pufferhez adtuk hozzá $100\mu\text{M}$ koncentrációban 5 percig, majd ismét mértük a szívfunkciós értékeket. Majd 30 perc globál iszkémiát váltottunk ki, amit 90 perc reperfúzió. A fatális kimenetelű kamrai fibrillációk elkerülése érdekében a reperfúzió első 10 perces szakaszát Langendorff módban indítottuk el.

2.2.2.3. TTC festés

A 2.1.6. Infarktusos terület meghatározása című fejezetben leírtak szerint történt.

4.2.2.4. Statisztikai elemzés:

Az eredményeink kiértékelése során számtani átlagot és középérték standard hibáját adtuk meg. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai elemzéshez és az eredmények ábrázolásához GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Az egyes oszlopok az átlagot, míg a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelentik. A statisztikai analízishez t-tesztet vagy egy- és kétutas variancia-analízist (ANOVA) majd ezt követően Tukey poszt tesztet végeztünk.

3. Eredmények

3.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív-és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban

3.1.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma komponenseinek vizsgálata:

A kén tartalmú komponensek mindkét fokhagyma készítményben. A mérési eredmény alapján elmondható, hogy a kén tartalmú vegyületek száma és mennyisége nagyobb a fekete fokhagymában, mint a fokhagymában. A fekete fokhagymában nem volt detektálható az allicin. A fekete fokhagyma öregedési folyamata során, Maillard reakció ment végbe, melyet a 2-acetil-1-pirrolin keletkezése támaszt alá.

3.1.2. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a testtömegre

A kísérleti állatok kiindulási testtömegében nem volt jelentős eltérés. A 4 hetes kezelési periódust követően nem tapasztaltunk jelentős változást a fokhagyma, illetve a fekete fokhagyma kezelést kapó állatok és a kontroll csoport állatainak testtömegeiben.

3.1.3. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása vérparaméterekre:

A 4 hetes kezelést követően a vena jugulárisból vért vettünk és különböző szérumban paramétereket mértünk. A kezelés hatására nem tapasztaltunk lényeges változást a legtöbb paraméterben. Azonban az LDL szintjében emelkedést mértünk a kezelések hatására.

3.1.4. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a szívfunkciókra

Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a fokhagyma és a fekete fokhagyma hatását 4 hetes kezelést követően az izolált szíveket 30 perces iszkémiának és 120 perces reperfúzióknak vetettük alá. A preiszkémiai szívfunkciós értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást az egyes csoportok között. Azonban az iszkémiát követő reperfúzió során jelentős változást regisztráltunk a szívfunkciók értékében. A reperfúzió során a koronária áramlás a kezelt állatoknál magasabb volt, mint a kontroll csoportnál. A kezeletlen állatoknál az áramló puffer mennyisége folyamatosan csökkent a reperfúzió 120. percéig, azonban a kezelt csoportokban az iszkémia előtti értékhez képest csökkent, de ezt követően a reperfúzió során nem változott lényegesen. A szívfrekvencia nem változott lényegesen a kísérlet során. A kontroll csoportnál $283,8 \pm 14,8$ ütés/perc, a fokhagymával kezelt csoportnál $284,4 \pm 26,1$ ütés/perc, míg a fekete fokhagymával kezelt esetében $292,4 \pm 30,4$ ütés/perc volt. A kezeletlen és a fokhagymával kezelt állatoknál a tendencia a reperfúzió során is megmaradt. A fekete fokhagymával kezelt állatoknál a szívfrekvencia a reperfúzió végére kis mértékben növekedett ($303,8 \pm 44,1$

ütés/perc), azonban nem volt jelentős a változás. A perctérfogat szignifikánsan magasabb volt a kezelt állatok esetében a reperfúzió 30., 60. és 120. percénél, mint a kezeletlen csoporté. Iszkémia előtt mindhárom csoport perctérfogat értéke közel azonos volt. Az aorta kiáramlás jelentősen emelkedett a kezelt csoportokban, szám szerint a fokhagyma kezelést követően $24,1 \pm 4,6$ ml, fekete fokhagyma kezelést követően $22,7 \pm 3,8$ ml-re nőtt, amíg a kontroll csoportban $4,3 \pm 2,0$ ml volt.

3.1.5. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása az infarktusos területre:

A fokhagyma és a fekete fokhagyma kardioprotektív hatásának vizsgálatához az I/R-t követően TTC festést alkalmaztunk, amellyel megnéztük az élő és az elhalt szívszövet arányát. A kontroll csoportnál az infarktusos terület $27,5 \pm 8,4\%$ -nak adódott. A fokhagymával és a fekete fokhagymával kezelt csoportokban azonban szignifikánsan alacsonyabb volt az elhalt területek aránya. A fokhagyma kezelés $5,9 \pm 2,0\%$ -ra csökkentette, míg a fekete fokhagyma kezelés $6,2 \pm 1,2$ -re csökkentette az elhalt szívszövet arányát.

3.1.6. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a HO-1 és az iNOS expressziós szintjére:

Kísérletünk során kíváncsiak voltunk, hogy a fokhagyma és a fekete fokhagyma iszkémia/reperfúziót követő kardioprotektív hatásának molekuláris mechanizmusára, ezért vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a kezelés a HO-1 és az iNOS fehérje szintjét. Az I/R-t megelőzően a kezelt csoportokban növekedett a HO-1 expressziós szintje. Az I/R-t követően azonban HO-1 expressziós szintje szignifikánsan növekedett mindkét fokhagymával kezelt csoportban. Az iNOS expressziós szintjében nem tapasztaltunk különbséget az I/R-t megelőzően az egyes csoportokban. Az I/R-t követően szignifikánsan csökkent az iNOS szintje a kontroll és a fokhagymával kezelt csoportban. Azonban a fekete fokhagyma kezelés képes volt ezt a csökkenést megelőzni az I/R-t követően.

3.2. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata H9c2 sejtvonalon és patkánymodellen

3.2.1. Oxidatív stabilitás

Fenton reakció: A kontroll és a H_2O_2 -t is tartalmazó minta kromatogramjai nem térnek el egymástól számottevően.

Szintetikus porfirin rendszer: A kontroll és a vizsgált minta kromatogramjai nem térnek el egymástól számottevően. Egyéb csúcs nem jelent meg a kontroll mintához képest. Az oxidatív stabilitási vizsgálatok alapján stabilnak bizonyult az ERJ-500 vegyület.

3.2.2. ERJ-500 molekula hatása a sejtek életképességére

MTT teszt:

A különböző koncentrációjú ERJ- 500 kezelések, valamint a két alkotóelemének, az aszpirinnek és molszidominnak hatását a sejtek életképességére MTT assay segítségével vizsgáltuk. Kontrollként kezeletlen csoportot, pozitív kontrollként pedig 1%-os H_2O_2 -dal kezelt csoportot alkalmaztunk. A kontroll csoporttal összehasonlítva kismértékű csökkenés figyelhető meg minden kezelt csoportban. Azonban szignifikánsan magasabb a sejtek túlélése a citotoxikus H_2O_2 -al összehasonlítva. A különböző koncentrációjú ERJ-500 oldatokat valamint, az aszpirin és a molszidomin oldatokat összehasonlítva nincs jelentős különbség a sejtek életképességében. Ezen eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk használt koncentrációkban az ERJ-500 ugyanolyan biztonságos molekula, mint az aszpirin és a molszidomin.

Hemolitikus aktivitás:

Az ERJ-500 hemolitikus aktivitását SD patkány véreből izolált vörösvérsejteken vizsgáltuk. Pozitív kontrollként desztillált vizet alkalmaztunk, amely 100%-os hemolízist okoz. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a hemolízis szignifikánsan alacsonyabb volt az alkalmazott különböző koncentrációjú ERJ-500 kezelések (100nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M), az aszpirin (100 μ M) és a molszidomin (100 μ M) kezelések során. Az egyes csoportok között nem tapasztaltunk jelentősebb eltérést. Ezen eredményeink megerősítik az MTT assay eredményeit, miszerint az alkalmazott koncentrációkban az ERJ-500 molekula biztonságosan alkalmazható.

3.2.3. ERJ- 500 molekula hatása a koronária erekre:

Az ERJ-500-at különböző koncentrációkban oldottuk a perfúziós tartályban 1 μ M és 100 μ M koncentrációs tartományban. A Langendorff perfúzió során az ERJ-500 vegyület az alkalmazott koncentrációkban nem okozott kamrai tachikardiát vagy kamrai fibrillációt. Továbbá a kontroll csoporttal összehasonlítva nem változtatta meg szignifikánsan a szívfrekvenciát. A koronária átáramlás azonban szignifikánsan megnőtt a kezelt csoportokban. A kimosási periódus alatt azonban folyamatosan csökkent majd az újabb ERJ-500 tartalmú puffer hozzáadását követően ismét növekedett a koronária átáramlás értéke. Langendorff perfúzió során a koronária átáramlást a szívfrekvencia, a perfúziós nyomás és a koronáriák

átmérője határozza meg. Kísérleteink során a perfúziós nyomás állandó volt, illetve a szívfrekvencia nem változott meg szignifikánsan, ezért a koronária átáramlás növekedés a koronária erek relaxációjának köszönhető.

Az ERJ-500 molekula további vizsgálatait dolgozó módban végeztük el. Az előző mérési eredményeink alapján a 100 μ M-os kezelést találtuk a legpotensebbnek, ezért a továbbiakban csak ezt a kezelést alkalmaztuk. A kezelés a dolgozó módban hasonlóan az előzőekben végzett nem dolgozó módhoz, nem befolyásolta a szívfrekvenciát a kontroll csoporthoz hasonlítva. A koronária átáramlást a 100 μ M-os ERJ-500 kezelés ($23,67 \pm 1,05$ ml/perc) azonban szignifikánsan növelte a kontroll csoporttal összehasonlítva ($18,73 \pm 0,62$ ml/perc). A verőtérfogatértékében is szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az ERJ-500 kezelés hatására ($0,25 \pm 0,003$ ml) a kontroll csoporthoz képest ($0,21 \pm 0,01$ ml). Az aorta kiáramlás, aortanyomás és a perctérfogatban nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kezelés hatására a kontrollhoz képest.

3.2.4. Infarktusos terület meghatározása

Az infarktusos terület meghatározását a TTC festéssel vizsgáltuk. A 30 perces iszkémiát és 90 perces reperfúziót követően az élő szövetrészek pirosan festődnek, míg az elhalt részek nem festődnek. Az infarktusos területet az egész miokardiumra vonatkoztatva adtuk meg. A kontroll csoportban a nekrosis mértéke 18,20% volt, amíg az ERJ-500-zal kezelt csoportban az infarktusos terület 7,52%-volt. Eredményeink alapján elmondható, hogy az ERJ-500 vegyülettel perfundált szívekben az infarktusos terület % aránya szignifikánsan alacsonyabb volt.

4. Megbeszélés

A kardiovaszkuláris megbetegedések, különösen az iszkémiás szívbetegségek, mai napig világszerte vezetnek a halálozási statisztikákat, annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben jelentős javulás történt az egyre szélesebb körben elérhető modern gyógyszeres kezeléseknek, az egészségügyi technológia jelentős fejlődésének és a hatékonyabb preventív intézkedéseknek köszönhetően. A különböző terápiás és prevenciós stratégiák kidolgozása során egyre nagyobb igény merül fel újabb molekulák vagy növényi kivonatok előállítására, amelyekkel csökkenthetjük vagy megelőzhetjük a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulását.

Jelen tanulmány célja az volt, hogy olyan új lehetőségeket keressünk, amelyek segíthetnek a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésében és kezelésében. Munkánk során kettő, a fitoterápiában kiemelt helyen lévő, évezredek óta ismert és alkalmazott növény került a figyelmünk középpontjába, a fokhagyma és a fűzfakéreg. Ezen hagyományos fitoterapeutikumok újabb változatainak a hatásait tanulmányoztuk az iszkémiás sérülést követően patkánymodellen.

Kísérletünk első részében a fokhagyma régi-új változatának, a fekete fokhagymának a kardiovaszkuláris tulajdonságait vizsgáltuk. A fekete fokhagyma a fokhagyma egy fermentált változata, amely egy természetes úton való öregedésen megy keresztül. A fermentáció során a kemény, jellegzetesen csípős fehér gerezdek teljes átalakuláson mennek keresztül. A fekete fokhagyma puha, állaga krémes, fekete, aromás, és nem rendelkezik túl agresszív ízekkel. Az öregedési folyamat során, amikor a fokhagymát magasabb hőmérsékletnek (75°C) és páratartalomnak tesszük ki a γ -glutamil-cisztein csoportja tovább alakul S-allilmerkaptociszteinné (SAC), amely a fő vízzoldékony antioxidáns vegyülete a fekete fokhagymának. A folyamat során az alliin tovább alakul más kén tartalmú vegyületekké, amelyek további jelentős antioxidáns tulajdonsággal bírnak. A fokhagyma allicin tartalma, amelynek a jellegzetes íz és szag köszönhető, jelentősen lecsökken a fekete fokhagymában. Ezzel összhangban az általunk végzett mérések során mi is azt tapasztaltuk, hogy a fokhagymában jelenlévő allicin már nem található meg a fekete fokhagymában. A fekete fokhagyma sötétbarna, fekete szín kialakulásának hátterében a Maillard reakció áll, amely a cukrok és az aminosavak között megy végbe. A Maillard reakció során keletkező 2-acetil-1-pirrolin felelős a kialakuló sötét színért és a jellegzetes édeskes illatért. A 2-acetil-1-pirrolin a fokhagymában nem volt jelen, de a fermentációs folyamatot követően megjelent, mindez bizonyítja, hogy a Maillard-reakció is végbement az öregedési folyamat során. A fekete

fokhagyma összetételének vizsgálatát követően, kíváncsiak voltak arra, hogy vajon a fekete fokhagyma is megőrzi-e a fokhagyma kedvező kardiovaszkuláris tulajdonságait. Korábbi megállapításokból jól ismert a fokhagyma kardioprotektív hatása. Ezt bizonyítja Banerjee és munkatársai kutatása is, miszerint 125-500 mg/ttkg fokhagyma fogyasztás jelentősen csökkentette az I/R-t követő oxidatív károsodás mértékét. Eredményeinkből is egyértelműen látszik, hogy a fokhagyma kezelés és a fekete fokhagyma kezelés is jelentős kardioprotektív hatással bír az I/R-t követően, mivel a szívfunkciók szignifikánsan javultak és az infarktusos terület jelentősen csökkent. Azonban a vizsgálataink alapján nem találtunk jelentős különbséget a fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés között, tehát a fokhagyma öregedési folyamata nem növelte a fokhagyma kardioprotektív tulajdonságait. Korábbi tanulmányokban a fokhagyma és a fekete fokhagyma antioxidáns és antiinflammatorikus tulajdonságait hasonlították össze. Yi Yeong Jeong és kutatócsoportja azt tapasztalták, hogy a fekete fokhagyma kezelés csökkentette a prooxidáns H_2O_2 -al vagy LPS által indukált ROS termelést RAW264.7 sejteknél. Azonban a COX-2 és az 5-lipoxigenáz gátló hatás erősebb volt a fokhagyma kivonat tartalmú kezelés hatására, mint a fekete fokhagyma kezelést követően. A kutatók vizsgálatai alapján a háttérben a fekete fokhagyma nagyobb cukor tartalma állhat, amely gátolja az antiinflammatorikus hatást. Az antioxidáns tulajdonság tekintetében viszont Lee és munkatársai azt találták, hogy a fekete fokhagyma magasabb antioxidáns tulajdonsággal rendelkezik 2-es típusú diabéteszes patkány modellen, mivel a szuperoxid-diszmutáz, glutation peroxidáz és a kataláz aktivitás is jelentősebb mértékben nőtt a fekete fokhagyma kezelés hatására, mint a fokhagyma kezelést követően.

Az általunk végzett kísérletek során nem tapasztaltunk jelentős változást a testtömegben, illetve a vérparaméterek szintjében. Az értékek a fiziológiás tartományban maradtak. Ahhoz, hogy a kezelések lehetséges metabolikus hatását tanulmányozni tudjuk diabéteszes-, illetve ateroszklerózis állat modellen szükséges végezni a kísérletet. Ahhoz, hogy a fokhagyma kezelések kardioprotektív hatásának pontos mechanizmusát felderítsük a HO-1 és az iNOS expressziós szintjét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy fokhagyma kezelés növelte a HO-1 szintet iszkémia előtt. Azonban az I/R-t követően a fokhagyma és a fekete fokhagyma HO-1 expressziós szintje jelentősen emelkedett. A HO-1 enzim indukciója növeli a hem degradációt, mely során Fe^{2+} , endogén CO és biliverdin/bilirubin képződik. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során már bebizonyította, hogy bizonyos természetes hatóanyagok profilaktikus adagolása szignifikánsan csökkenti az I/R-t követő károsodást. Például a meggy-magbél szintén emelte a HO-1 expressziós szintjét a szívszövetben, ezáltal javította a

szívfunkciós paramétereket és csökkentette az infarktusos területet. A HO-1 szint emelkedés egy védekezési mechanizmusnak tekinthető, amelyet számos káros stimulus, mint például az iszkémia, vagy a túlzott hem szint kiválthat. Issan és munkatársai is igazolták, hogy a kobalt-protoporfirin (CoPPiX) (HO-1 induktor) által indukált HO-1 protektív szerepet tölt be a H9c2 sejteknél a hypoxia/reoxigenáció során. A HO-1 expressziójának változása után kíváncsiak voltunk arra, hogy az iNOS expressziós szintje hogyan változik meg a kétféle fokhagyma kezelés hatására. Azt tapasztaltuk, hogy a kontroll csoportban és a fokhagyma kezelés hatására jelentős mértékben lecsökkent az iNOS expressziós szintje I/R-t követően. Azonban a fekete fokhagyma kezelés hatására, az iNOS kismértékű csökkenést mutatott, amely nem volt szignifikáns, tehát a fekete fokhagyma kezelés képes volt a jelentős mértékű iNOS csökkenést megakadályozni az I/R-t követően. Ez irányú eredményeinkkel jól korrelál A.L. García-Villalón és munkatársai által végzett kísérlet, mely szerint az 50 mg/ttkg fekete fokhagyma kezelés növelte az iNOS expressziós szintjét, valamint az eNOS szintjében is jelentős emelkedést tapasztaltak. Ezzel szemben az *in vivo* kísérletek során éppen ellenkezőleg tapasztalták, mivel az iNOS expresszió fokozása súlyosbította a miokardiális sérülést. Henri Doods tanulmányában a Na⁺/K⁺ pumpa gátló, sabiporid által mediált kardioprotektív hatás háttérében a csökkent iNOS expresszió állhat. További *in vivo* kísérletek támasztják alá, azt, hogy a megnövekedett iNOS aktivitás szerepet játszhat a regionális iszkémia során kialakuló kardiomiocita diszfunkciók kialakulásában. A szakirodalomból jól ismert, hogy a „Janus-arcú” NO és a NOS enzimek szerepe kettős, lehet, előnyös és ugyanakkor hátrányos is, amely függ a környezettől és a szövetkárosodás mértékétől is. Mindezen eredményeket együttevén és a szakirodalmat tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy az iNOS expresszió különbözősége a különböző kísérleti elrendezéseknek köszönhető. Tanulmányunkban „*ex vivo*” kísérlet során 30 perc iszchémiát és 120 perc reperfúziót alkalmaztunk, amíg más kísérletekben „*in vivo*” körülmények között 6-24 órás reperfúzió történt. Az általunk alkalmazott izolált dolgozó szív modell egy széles körben elterjedt, laboratóriumunkban is gyakran alkalmazott módszer, amely során az eredményeinket nem befolyásolja a hormonális és a vegetatív idegrendszer. Azonban az *in vivo* körülmények között ezen hatások nem zárhatóak ki.

Kutatásunk eredményeit összegezve elmondható, hogy a fokhagyma fermentációja során keletkező fekete fokhagyma összetétele megváltozik, de így is számos előnyös gyógyhatással rendelkező vegyületet tartalmaz, és nem csökken a fokhagyma jótékony hatása. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a fekete fokhagyma is kiemelt helyet érdemel az egészséges táplálkozásban. A fokhagyma kellemetlen mellékhatásai elkerülhetőek az édesebb

és puhább fekete fohagymával fogyasztásával, így akár preventív akár a kuratív használatára is nyitottabbak lehetnek az emberek. Azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a fekete fohagyma hatásait tanulmányozzuk különböző betegségekben, például célszerű lehet diabéteszes vagy ateroszklerotikus elváltozásokkal rendelkező állatmodelleken is megvizsgálni.

Munkánk második részében a Debreceni Egyetemen előállított új hibrid-aszpirin molekula farmakológiai tulajdonságait kívántuk vizsgálni. A miokardiális iszkémia bázisterápiájának fontos eleme a trombocita aggregációt gátló kezelés, kulcs szerepet játszik a recidív iszkémiás események megelőzésében is. A trombocita aggregációt gátló gyógyszerek egyik legrégebbi és legfontosabb képviselője az acetilszalicilsav. Alkalmazásának korlátja a már kis dózisban jelentkező gasztrointesztinális mellékhatások. A nitritek és nitrátok is hatékony antiiszkémiás szerek, patológiás körülmények között az erek tágításával a kollaterális keringést képesek fokozni. Azonban az alkalmazásának korlátja a napi többszöri és/ vagy folyamatos nitrát terápia során kialakuló nitrát tolerancia, amely a hatás csökkenésével vagy megszűnésével jár. Az általunk vizsgált ERJ-500 vegyület egyik alkotórésze az úgynevezett spontán NO-donor vegyület, a linszidomin, amely a molszidomin aktív metabolitja. Rudolph és Dirschinger vizsgálatai alapján a molszidomin alkalmazása során nem alakul ki tolerancia. Az oxidatív stabilitási esszék alapján az ERJ-500 vegyület az oxidációval szemben ellenálló volt. *In vitro* kísérleteink alapján továbbá megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M-os koncentrációkban a H9c2 sejtek életképességét kismértékben csökkentette, de szignifikánsan magasabb volt a sejtek életképessége a pozitív kontrollal összehasonlítva. A 100 μ M-os aszpirinnel és 100 μ M-os molszidomin kezeléssel összehasonlítva hasonlóan bizonyult a sejtek életképességére gyakorolt hatása, ezért ugyanolyan biztonságosnak mondható, mint a hasonló koncentrációban alkalmazott aszpirin és molszidomin. Eredményeink megerősítése céljából az új vegyület hemolitikus aktivitását is vizsgáltuk 100 nM-100 μ M-os koncentrációtartományban. Az ERJ-500 vizsgálata során a hemolizált sejtek aránya lényegesen alacsonyabb volt, mint a pozitív kontroll alkalmazása során. A 100 μ M-os aszpirin és 100 μ M-os molszidomin kezelés során is hasonlóan alacsony volt a hemolizált sejtek aránya. A fentiek alapján elmondható, hogy az ERJ-500 vegyület nem toxikus és nem okoz hemolízist, hasonlóan az ASA-hoz és MOL-hoz. *In vitro* vizsgálataink után kíváncsiak voltunk az új vegyület koronária erekre kifejtett hatásaira, amelyet *ex vivo* vizsgáltunk meg. Elsőként a Langendorff perfúziós rendszerben tanulmányoztuk az ERJ-500 kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait. Watanabe és munkatársai is leírják, hogy a

Langendorff perfúziós rendszer kiválóan alkalmas új vegyületek koronária erekre kifejtett hatásainak vizsgálatára. Munkánk során fontos megfigyelés volt, hogy a koronária áramlás jelentősen megnövekedett. A Langendorff perfúzió során a koronária áramlást a szívfrekvencia, perfúziós nyomás és az érátmérő befolyásolja. A megnövekedett koronária áramlás feltehetően a koronária erek dilatációjának köszönhető, mivel kísérletünk során a perfúziós nyomás állandó volt, a szívfrekvenciában pedig nem volt jelentős változás. Habár a NO koncentrációt nem mértük, az eredményeink azt a feltevést támogatják, hogy a koronária erek dilatációja az ERJ-500 vegyületből felszabaduló NO-nak köszönhető. Annál is inkább mivel az ERJ-500 jelenlétében nőtt a koronária áramlás, viszont a kimosást követően ez csökkent, majd amikor az ERJ-500-at ismét hozzáadtuk újból fokozódott a koronária áramlás. Ezt támasztja alá Andrieu és munkatársai kutatása miszerint, az aszpirin kis dózisban adva nem rendelkezik a vazodilatátor hatással a miokardiumban. Munkánk során a legpotensebbnek a 100 μ M-os kezelést találtuk, ezért az ERJ-500 hatásait ezen koncentrációban tovább vizsgáltuk dolgozó módban is. A koronária áramlás ezen kísérleteink során is jelentősen nagyobb volt a kezelés hatására. Továbbá, a verőtérfogatot is szignifikánsan magasabbnak találtuk az ERJ-500-al kezelt állatok esetén a kontroll csoporttal összehasonlítva. A perctérfogot és a szívfrekvencia hányadosaként meghatározott verőtérfogot értéke is szignifikáns emelkedést mutatott a kezelés hatására. Az izolált dolgozó szív készüléknél a szívre nehezedő elő és utóterhelés konstans a kísérlet során, ezért a mért paraméterek a szív kontrakciós erejétől függenek. Az ERJ-500 koronária áramlást fokozó hatását alátámasztja az a tény is, hogy az infarktusos terület is szignifikáns csökkenést mutatott az ERJ-500 kezelés hatására.

Eredményeinket összegezve, elmondható, hogy az újonnan szintetizált NO-t felszabadító ASA származék, az ERJ-500, farmakológiailag aktív szív-és érrendszeri hatásokkal rendelkező gyógyszermolekula, amely több hatástani támadásponton keresztül alkalmas az iszkémiás szívbetegségek kezelésére.

5. Összefoglalás

Munkánk első felében az évezredek óta ismert jótékony hatású fokhagyma öregedési folyamaton átesett változatát a fekete fokhagymát vizsgáltuk. A hosszú ideig, magas hőmérsékleten való érlelés során a fokhagyma összetétele mellett a külső jegyeiben, illatában és ízében is jelentős változások történnek. Kísérleteink során négy hétig tartó fokhagyma és fekete fokhagyma kivonatú kezelést alkalmaztunk. Az állatok testtömegében figyelemre méltó különbséget nem tapasztaltunk a csoportok között, továbbá a vér és lipid paramétereket se befolyásolta a kezelés jelentősen. A kezeléseket követően 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfüziónak vetettük alá az izolált szíveket. Az I/R-t követően szignifikánsan jobb szívfunkciókkal rendelkeztek a fokhagyma és fekete fokhagyma kezelést kapott állatokból izolált szívek és az infarktusos terület is csökken. Az egyik legfontosabb antioxidáns védekező rendszer, a HO-1 szintjében emelkedést tapasztaltunk a kezelések hatására, továbbá az iNOS szintje megtartott maradt a fekete fokhagyma kezelést követően. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a fokhagyma érlelése során végbemenő változások nem csökkentik a fokhagyma jótékony hatásait.

Valamint vizsgáltuk az egyetemünkön újonnan szintetizált nitrogén monoxidot (NO) felszabadító acetilszalicilsav származékot (ERJ-500). Az iszkémiás szívbetegségek terápiájában a trombocita aggregációt gátló gyógyszerek közül az egyik legjelentősebb vegyület az acetilszalicilsav. Azonban hosszú távú alkalmazásakor jelentkező mellékhatásai, a gyomorvérzés és gyomorfekély a nitrogén-monoxidnak (NO) köszönhetően jelentős mértékben csökkenthetők. Az MTT sejt életképességi assay és a hemolízis teszt alapján elmondható, hogy az ERJ-500 a sejtek életképességét nem befolyásolta jelentősen az általunk alkalmazott koncentrációban. Továbbá a Sprague Dawley patkányokból izolált szíveken *ex vivo* vizsgáltuk meg a molekula koronária erekre gyakorolt hatását a Langendorff módszer szerint és izolált dolgozó-szívpreparátumon. Dózis-hatás görbék alapján becsült farmakológiailag hatásos koncentrációtartományban megvizsgáltuk, hogy a molekulánk hogyan befolyásolja a szívizom iszkémia/reperfüzió-indukálta károsodásokra kifejtett hatásokat és azt tapasztaltuk, hogy a patkányszívek ereit koncentrációtól függő módon tágította. Az infarktusos területek nagyságát TTC festési módszer segítségével tanulmányoztuk, mely alapján megállapítható, hogy az infarktusos terület nagyságát szignifikánsan csökkentette 100 μ M ERJ-500. Eredményeink azt sugallják, hogy az új anyag értágító hatással rendelkezik, amely alkalmas lehet az iszkémiás szívbetegségek kezelésére és terápiájának kiegészítésére.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Tósaki Árpád Professzor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy a Gyógyszerhatástani Tanszéken végezhessem a kutatómunkámat. Bármikor fordulhattam hozzá gyakorlati vagy elméleti segítségért is.

Hálás köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Lekli Istvánnak, hogy még TDK hallgatóként lehetőséget adott, hogy a Gyógyszerhatástani Tanszéken végezhessem a kísérleti munkámat. Köszönöm, hogy munkámat végig figyelte és építő tanácsaira mindvégig számíthattam. Továbbá köszönöm, hogy szakmai felkészültségével és odafigyelésével egyengeti a pályafutásomat.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek és Professzor Úrnak, hogy mindvégig stabil anyagi háttérrel biztosítottak a kísérletek elvégzéséhez. Továbbá, köszönöm a lehetőséget, hogy a kutatási eredményeimet számos hazai és nemzetközi konferencián bemutathattam.

Köszönöm férjemnek, Dr. Czompa Attilának, hogy mindvégig önzetlenül támogatott és kitartásra ösztönzött, biztatása nélkül nem valósulhatott volna meg a munkám. Továbbá köszönöm az állatkísérletekben, publikációk és a disszertációban nyújtott segítségét és tanácsait.

Köszönöm Dr. Gyöngyösi Alexandrának, aki nem csak munkatárs, de barát is lett az évek során, a kísérletes munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatását. Értékes szakmai segítségére és tapasztalatára mindig számíthattam.

Ezen felül köszönöm a segítséget Dr. Czeglédi Andrásnak, dr. Fésüs Edinának, Dr. Bak Istvánnak, Kalmár Andreának, Füzesi Tibornak és minden jelenlegi és volt munkatársamnak.

Köszönetet mondok továbbá a Gyógyszerészi Kémia tanszék munkatársainak Prof. Dr. Borbás Anikó, Prof. Dr. Herczegh Pál, Dr. Herczeg Mihály, Dr. Csávás Magdolna és Róth Józsefnének az ERJ-500 vegyület szintéziséért és közös publikációink megjelenésében nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Prokisch Józsefnek és a DE MÉK, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet további munkatársainak a fekete fokhagyma előállítását és az elvégzett GC-MS méréseket.

Köszönöm Dr. Szabados-Fürjesi Péternek az oxidatív stabilitási vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Továbbá köszönöm tutoraimnak, Dr. Csávás Magdolnának és Prof. Dr. Bácskay Ildikónak a támogatásukat az évek során.

Hálával tartozom csodálatos lányaimnak a közös tanulásokért, a türelmükért és hogy a szeretetükkel végig erőt adtak.

Végül, de nem utolsó sorban óriási hálával tartozok Édesanyámnak, Édesapámnak és testvéremnek, Szőke Lászlónak, akik egész életemben támogatnak és segítenek, valamint férjem szüleinek.

Az értekezés elkészítését a GINOP- 2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt támogatta. A közölt munka az Európai Unió és az Európai Szociális Alap által támogatott EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 és a EFOP-3.6.1-16-2016-00022 projekt keretében valósult meg. További támogatások: „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj” NTP-NFTÖ-16, NTP-NFTÖ-18, NTP-NFTÖ-19.



Nyilvántartási szám: DEENK/84/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szőke Kitti

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szőke, K.**, Czompa, A., Lekli, I., Szabados-Fürjesi, P., Herczeg, M., Csávás, M., Borbás, A., Herczegh, P., Tósaki, Á.: A new, vasoactive hybrid aspirin containing nitrogen monoxide-releasing molsidomine moiety.
Eur. J. Pharm. Sci. 131, 159-166, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.020>
IF: 3.616
2. **Szőke, K.**, Czompa, A., Lekli, I., Szabados-Fürjesi, P., Herczeg, M., Csávás, M., Borbás, A., Herczegh, P., Tósaki, Á.: Dataset on structure, stability and myocardial effects of a new hybrid aspirin containing nitrogen monoxide-releasing molsidomine moiety.
Data brief. 25, 1-10, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2019.104146>
3. Czompa, A., **Szőke, K.**, Prokisch, J., Gyöngyösi, A., Bak, I., Balla, G., Tósaki, Á., Lekli, I.: Aged (Black) versus Raw Garlic against Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Complications.
Int. J. Mol. Sci. 19 (4), 1-13, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041017>
IF: 4.183





További közlemények

4. Gyöngyösi, A., **Szőke, K.**, Fenyvesi, F., Fejes, Z., Bekéné Debreceni, I., Nagy, B. J., Tósaki, Á., Lekli, I.: Inhibited autophagy may contribute to heme toxicity in cardiomyoblast cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 511 (4), 732-738, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.140>
IF: 2.985
5. Czompa, A., Gyöngyösi, A., **Szőke, K.**, Bak, I., Csépanyi, E., Haines, D. D., Tósaki, Á., Lekli, I.: Effects of Momordica charantia (Bitter Melon) on Ischemic Diabetic Myocardium.
Molecules. 22 (3), 488, 2017.
IF: 3.098

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,882

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,799**

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, 2022.02.16.

