

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kozma Mariann

***Az *Allium ursinum* terápiás hatásainak
vizsgálata diszlipidémiában és
pulmonális artériás hipertóniában***

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2018.**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az *Allium ursinum* terápiás hatásainak vizsgálata diszlipidémiában és pulmonális artériás hipertóniában

Dr. Kozma Mariann

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2018.**

Egy homokszemben lásd meg a világot,
Egy vadvirágban a fénylő eget,
Egy órában az örökkévalót,
S tartsd tenyeredben a végtelent.

(William Blake - Weöres Sándor fordítása)

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Hiperkoleszterinémia	6
2.1.1. Az ateroszklerotikus léziók csoportosítása szövettani megjelenésük alapján	7
2.1.2. Lipid metabolizmus szerepe ateroszklerózisban.....	8
2.1.3. A hemoxigenáz 1 (HO-1) szerepe az ateroszklerózisban	11
2.2. Pulmonális artériás hipertónia.....	13
2.2.1. A PAH epidemiológiája, osztályozása	13
2.2.2. A PAH patofiziológiája, diagnosztikája	15
2.2.3. A PAH szövettana.....	19
2.2.4. A PAH patogenezise	20
2.2.5. PAH gyógyszeres kezelése.....	23
2.2.6. Monokrotalin indukálta PAH modell	27
2.3. Az <i>Allium ursinum</i> jellemzése.....	28
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1. Etikai irányelvek.....	30
3.2. Kísérleti elrendezés	30
3.2.1. Hiperkoleszterinémiás nyúl modell (HC modell)	30
3.2.2. Pulmonális artériás hipertenzív patkány modell (PAH modell).....	30
3.3. Minta liofilizálása és bioanalitika.....	31
3.3.1. HPLC.....	31
3.3.2. MALDI-TOF MS.....	32
3.4. Transztorakális echokardiográfia	32
3.5. Szérum paraméterek mérése.....	34
3.6. Izolált „dolgozó- szív”	35
3.7. Szövettan.....	36
3.7.1. Ateroszklerotikus léziók analízise HC modellben	36
3.7.2. A szívizom és tüdő minták szövettani és morfológiai analízise PAH modellben	36
3.8. Fehérje izolálás miokardiumból, illetve tüdőszövetből	37
3.9. Western blot.....	38

3.10. Statisztikai analízis	38
4. EREDMÉNYEK	39
4.1. Bioanalitika.....	39
4.1.1. A minta tömegspektrometriai (MS) és HPLC vizsgálata	39
4.2. Transztorakális echokardiográfia	41
4.2.1. HC modell eredményei	41
4.2.2. PAH modell eredményei.....	42
4.3. Izolált „dolgozó-szív” eredmények	43
4.3.1. HC modell	43
4.3.2. PAH modell ex vivo szívfunkciós eredményei	45
4.4. Western blot	46
4.4.1. HC modell	46
4.4.2. PAH modell	47
4.5. Szövettan.....	48
4.5.1. HC modell szövettani analízis	48
4.5.2. PAH modell mikroszkópikus morfológiája	49
4.6. A HC modell szerológiai eredményei	51
5. MEGBESZÉLÉS	52
6. ÖSSZEFOGLALÁS	60
Summary	61
7. IRODALOMJEGYZÉK	62
8. TÁRGYSZAVAK	78
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79

Rövidítések jegyzéke

2,5-DHB	2,5-dihidroxi-benzoészav
AoP	aortic pressure, aortanyomás
ApoA	apolipoprotein A-I
ApoB	apolipoprotein B
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bicinchoninsav
CAT	kataláz
CD36	cluster of differentiation 36, scavenger receptor szupercsalád
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CK	kreatin-kináz
CO	cardiac output, keringési perctérfogat
COXIII	citokróm c oxidáz III
COXIV	citokróm c oxidáz IV
CRP	C-reaktív fehérje
DecT	deceleration time of E wave, E hullám decelerációs ideje
ECL	enhanced chemiluminescence, megnövelt kemilumineszcencia
ECM	extracellular matrix; extracelluláris mátrix
ED	external diameter, külső átmérő
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EF	ejection fraction, ejekciós frakció
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintetáz
ERA	endotelin receptor antagonist
ESD	end-systolic diameter, végszisztolés átmérő
Fe	vas
FS	fractional shortening, frakcionált rövidülés
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GOT	glutamát-oxálacetát-transzamináz
GPCR	G protein-coupled receptors, G fehérje-kapcsolt receptorok
GSH-Px	glutathion-peroxidáz
HDL	high-density lipoprotein, magas sűrűségű lipoprotein
HE	hematoxylin-eosin
HO-1	hemoxygenáz-1
HPLC	high performance liquid chromatography nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HR	heart rate, szívfrekvencia
HRP	horseradish peroxidase, tormaperoxidáz
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humán köldökszinórból izolált primér endoteliális sejt kultúra
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1, intracelluláris adhézións molekula 1
ISZB	isztkémias szívbetegek
LDH	laktát-dehidrogenáz
LDL	low-density lipoprotein, alacsony sűrűségű lipoprotein
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, mátrix segített lézer deszorpcións ionizációs repülési idő tömegspektrometria

MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MAPSE	mitral annular plane systolic excursion, mitrális billentyű annulusának szisztolés kitérése
MDA	malondialdehid
MWT	medial wall thickness, mediális falvastagság
NaCl	nátrium-klorid
NCEP	National Cholesterol Education Program, Nemzeti Koleszterin Oktatási Program
NOX4	NADPH oxidase 4, NADPH oxidáz 4
NO	nitrogén monoxid
ns	nanosecundum
PAH	pulmonális artériás hipertónia
PCWP	pulmonary capillary wedge pressure; tüdő kapillaris éknyomás
PDE5A	foszfodiészteráz-5A
PGI2	prostaglandin I2, prosztaciklin
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PKG	protein kináz G
PLAX	parasternal long axis, paraszternális hossz tengelyi metszet
PMSF	fenil-metil-szulfonilfluorid
PVR	Pulmonary vascular resistance, pulmonális ér ellenállás
ROS	reactive oxygen species, reaktív oxigén gyökök
RSD	relative standard deviation, relatív standard szórás
S'	peak systolic velocity, szisztolés csúcssebesség
SAX	parasternal short axis, paraszternális rövidtengelyi metszet
SDS	sodium dodecyl sulfate, nátrium-dodecil-szulfát
sGC	szolubilis guanilát-cikláz enzim
SMC	smooth muscle cells, simaizomsejtek
SOD1	szuperoxid dizmutáz 1
SR-B1	scavenger receptor class B 1
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor, szelektív szerotonin visszavételt gátló
SV	stroke volume, verőtér fogat
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion, trikuspidális billentyű annulusának szisztolés kitérése
TBS	tris(hidroximetil)-aminometán pufferelt só oldat
TBS-T	tris pufferelt só oldat Tween 20-al
TC	totál koleszterin
TG	triglicerid
TNF α	tumor necrosis factor alpha, tumor nekrozis faktor alfa
TVI	tissue velocity imaging, szöveti sebesség leképezése
VCAM- 1	vascular cell adhesion Molecule-1, vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WGLL	wild garlic leaves lyophilisate, medvehagyma levél liofilizátuma

1. Bevezetés és célkitűzések

A szív- és érrendszeri megbetegedések és az általuk okozott halálozás primer, familiáris eredetű rizikófaktorainak előfordulása egyenlőre még nem befolyásolható, viszont az olyan szekunder kockázati tényezők, mint a magasvérnyomás-betegség, a zsíryanycsere-zavar, a cukorbetegség, az elhízás, a dohányzás és az alkoholizmus, valamint az elégtelen táplálkozás és a mozgásszegény életmód, jelentős mértékben visszاسzoríthatóak terápia vagy életmód változtatás segítségével. Az 1. táblázatban a KSH által rendelkezésünkre bocsátott legfrissebb adatok láthatóak gyakori halálokok szerint rangsorolva a magyar lakosság körében, kiemelve a szív- és érrendszeri betegségeket [1]. Az itt feltüntetett adatok alapján elmondhatjuk, hogy a születéskor várható élettartam az elmúlt években 2001 és 2015 között 68,2-ről 72,3 évre emelkedett, továbbá a szív- és érrendszeri betegségek okozta halandóság csökkenése jelentős, években számítható mértékkel járult hozzá a várható élettartam meghosszabbodásához, melyben a megelőző és gyógyító medicina együttesen meghatározó szerepet játszott. A magasvérnyomás-betegség, a diszlipidémia és a cukorbetegség korszerű komplex farmakoterápiája, a már kialakult szívkoszorúér-betegségek, pangásos szívelégtelenség, ritmuszavarok gyógyszeres terápiája jelentősen csökkentette a halandóságot. A folyamatosan javuló tendenciát mutató értékeink sajnos még mindig messze elmaradnak az Európai Unió átlagát tekintve, ahol ugyanis a születéskor várható átlagos élettartam 77,9 év (2. táblázat) [2]. Annak ellenére, hogy az iszkémiás szívbetegségek miatti halálozási arány csökkent a legnagyobb mértékben a vezető halálokok közül, továbbra is magasan az élen jár Magyarországon és Európában is [3]. Bár jól tükrözi az intervenció sikerét, hogy a koszorúér betegség és stroke miatti halálozás az elmúlt évtizedben csökkent, a krónikus szívelégtelenség prevalenciája ennek következtében nagymértékben növekedett. A krónikus szívelégtelenség kezelése viszont jelentős népegészségügyi és gazdasági terhet jelent így az iparilag fejlett országokban.

Az előző gondolatsor alapján fontosnak tartom kiemelni, hogy a cerebro- és kardiovaszkuláris megbetegedések egyik leggyakoribb befolyásolható kockázati tényezője a diszlipidémia. A diszlipidémiára jellemző, hogy emelkedett LDL koleszterin, emelkedett triglicerid és csökkent HDL koleszterinszinttel jár együtt, melyek az idő előtti és progrediáló ateroszklerózis kialakulásának rizikótényezői. Számos tanulmány bizonyította, hogy a lipid státusz rendezésével önmagában is kedvezően befolyásolhatjuk az iszkémiás szívbetegségek (ISZB) és az egyéb vaszkuláris betegségek okozta halálozást, mind primer és szekunder prevenció keretében [4].

Halálozások a gyakoribb halálokok szerint (1990–)									
Év	Összesen	Ebből:							
		rosszindulatú daganatok	heveny szívizom-elhalás	egyéb ischaemiás szívbetegség	agyér-betegség	hőrgyhurut, tüdőfőtagulat és asztma	máj-betegségek	motoros jármű-balesetek	szándékos önártalom
1990	145 660	30 871	14 452	13 739	21 218	4 853	5 570	2 623	4 133
1991	144 813	31 407	14 569	14 300	20 898	4 498	5 992	2 330	3 993
1992	148 781	32 311	14 413	15 161	20 680	4 802	7 411	2 362	4 000
1993	150 244	32 201	14 991	15 953	20 396	4 893	8 525	1 806	3 694
1994	146 889	32 703	14 126	15 855	19 514	4 777	8 712	1 719	3 625
1995	145 431	32 941	14 630	16 112	19 814	4 629	8 589	1 750	3 369
1996	143 130	33 475	14 087	17 259	20 158	4 380	6 834	1 427	3 438
1997	139 434	33 458	13 238	17 660	18 884	3 994	6 810	1 456	3 214
1998	140 870	33 547	13 051	18 391	19 205	3 780	7 333	1 463	3 247
1999	143 210	33 821	12 416	19 073	19 286	4 356	7 279	1 407	3 328
2000	135 601	33 280	11 312	18 487	18 939	3 732	6 883	1 292	3 269
2001	132 183	33 318	10 948	19 014	18 821	3 166	6 457	1 352	2 979
2002	132 833	33 013	10 215	19 459	18 510	3 243	6 137	1 547	2 843
2003	135 823	33 530	10 160	21 287	18 626	3 929	6 255	1 457	2 801
2004	132 492	33 502	9 733	22 291	17 467	3 640	6 071	1 426	2 742
2005	135 732	30 615	10 247	26 646	15 557	4 849	5 525	1 269	2 621
2006	131 603	31 283	8 777	26 133	14 536	4 827	5 482	1 380	2 461
2007	132 938	31 686	8 376	25 138	14 524	5 127	5 603	1 328	2 450
2008	130 027	32 111	7 778	25 050	13 996	4 626	5 272	1 081	2 477
2009	130 414	32 536	7 709	25 477	14 145	4 734	5 080	924	2 461
2010	130 456	32 460	7 481	26 361	14 001	4 589	4 622	793	2 492
2011	128 795	32 670	7 085	26 145	13 369	4 843	4 176	742	2 422
2012	129 440	33 224	7 018	25 933	13 081	5 088	3 697	699	2 350
2013	126 778	32 748	6 519	25 585	12 828	5 291	3 324	661	2 093
2014	126 308	32 748	5 972	26 167	12 390	5 212	3 440	670	1 927
2015	131 697	32 792	6 028	26 979	12 500	6 266	3 306	734	1 870
2016	127 053	32 987	5 744	25 540	10 701	5 490	3 177	692	1 763

1. táblázat: Halálozási okok a gyakoribb halálokok szerint Magyarországon (1990-2016)(KSH adatbázis, 2016)

Születéskor várható átlagos élettartam (2001–2015)															
Ország	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Magyarország	68,2	68,3	68,4	68,7	68,7	69,2	69,4	70,0	70,3	70,7	71,2	71,6	72,2	72,3	72,3
Európai Unió–28	..	74,5	74,6	75,2	75,4	75,8	76,0	76,3	76,6	76,9	77,3	77,4	77,7	78,1	77,9
Euró-zóna–19	..	75,7	75,7	76,4	76,5	77,0	77,3	77,5	77,8	78,1	78,4	78,5	78,8	79,2	78,9

2. táblázat: Születéskor várható élettartam (2001-2015) Európában és Magyarországon (KSH adatbázis, 2016)

Célkitűzések

Annak ellenére, hogy *Allium sativum* és *Allium ursinum* közeli rokonságban állnak, az utóbbiról elérhető tudományos ismeretanyag jóval szerényebb. Az a pár in vitro illetve in vivo eredmény, melyben összemérik fiziológiás hatásaikat azonban, bizakodásra ad okot. Érdeemesnek láttuk tehát a rendelkezésünkre bocsátott növényi levél liofilizátumának hatásait komplexen vizsgálni különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben:

A) Iszkémia/reperfúziós károsodást szenvedett, magas koleszterin tartalmú diétán tartott, hiperkoleszterinémiás új-zélandi nyúl modellen (HC modell).

B) Monokrotalin indukálta, jobb kamrai diszfunkcióval társuló pulmonális artériás hipertóniában szenvedő Sprague Dawley patkánymodellen (PAH modell)

Mindkét vizsgálat során célunk volt a felmerülő funkciós változások molekuláris szinten történő tisztázása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Hiperkoleszterinémia

2.1.1. Ateroszklerózis, mint multifaktoriális jelenség

Az ateroszklerózis egy olyan multifaktoriális betegség, mely a genetikai és környezeti faktorok közreműködésével megteremtette modern kultúránk egyedülálló és egyben leghatalmasabb betegségét, valamint halálloki tényezőjét. Annak ellenére, hogy férfiakban magasabb a hajlam rá, a rossz étkezési szokások, dohányzás valamint a gyakorta mentális stresszel járó életmód hatására, nőknél egyre inkább növekvő tendenciát mutat [4].

Jean Lobstein használta először az „atherosclerosis” kifejezést, 1829-ben [5], a kifejezés görög eredetű, melyben a 'sclerosis' a megkeményedést, míg az 'athere' kifejezés *kását* jelent, ezzel utalva a lipidek akkumulációjára. Ezt követően pár évvel két, egyaránt patológiai tanulmányokkal foglalkozó iskola egymástól függetlenül írta le a betegség folyamán artériákban lejátszódó celluláris immunválaszt, így született meg a kétféle teória. Az egyik oldalról, Rudolf Virchow azt feltételezte, hogy kezdeti szerepe lehet az aorta celluláris konglomerátumainak, ezáltal hangsúlyozva a celluláris patológia kritikus szerepét az ateroszklerózisban. Ezzel szemben Carl von Rokitansky kutatási eredményei arra utaltak, hogy az érfal egy korai sérülése vezet mechanikai károsodáshoz, ezáltal a bejutó toxinok endoteliális diszfunkciót, majd gyulladást okoznak [6]. Két évszázaddal később Mayerl és munkatársai, Rokitansky megmaradt humán mintáiból T sejt akkumulációt fedezett fel, kifejezetten a korai léziók területéről, ezzel rávilágítva a limfociták eszenciális szerepére az ateroszklerózis folyamatában [5]. Az 1970-es évekre a „sérülés hatására kiváltott válasz- modell” vált elfogadottá [7]. Ennek ellenére számos napjainkban megjelenő publikáció hangsúlyozza a krónikus gyulladásos válaszreakció immun-komponensének jelentőségét [8]. Azonban az, hogy hogyan és miért károsodik egyidejűleg az endotél funkció, a lipid metabolizmus és a lipid retenció egyensúlya, továbbra sem tisztázott teljes mértékben.

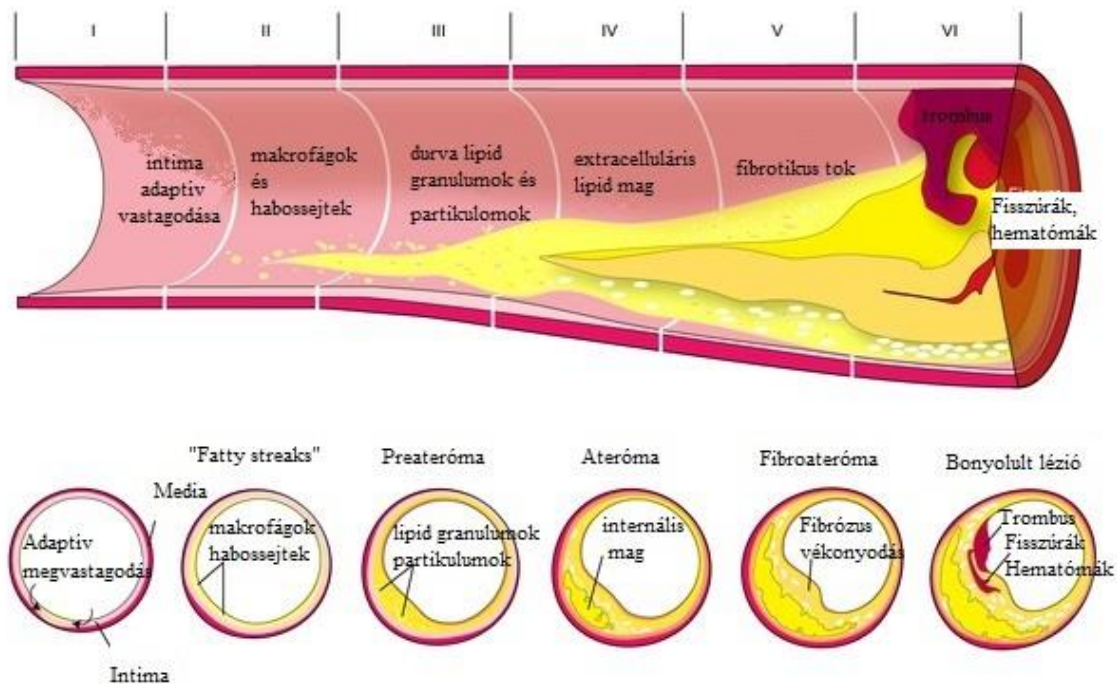
Számos általános vagy szisztémás tényező szerepet játszik a betegség előrehaladtában, mégis elmondhatjuk, hogy rendszerint a keringés csupán bizonyos szakaszai érintettek. A léziók növekedése a betegség korai fázisában abluminálisan zajlik, a kór progressziójával egyidejűleg később viszont rendkívül változatosan nyilvánulhat meg: a teljes megszűnéstől, a gyors leváláson át, a köztes nyugalmi időszakokig [9]. Az ateroszklerózis gyakran az élet egészen korai szakaszában megjelenik, egyes kutatások megállapították, hogy a maternális hiperkoleszterinémia terhesség során gyakran jár együtt zsíros plakkok kialakulásával a

magzatban [10]. A zsíros plakkok először az aortában jelennek meg, majd a koronáriákon, végül a harmadik időszakra már az agyi artériákat is elérhetik. Fokális kialakulás jellemző a léziókra, hajlamosabbak elágazódásokban kialakulni, valamint a kisebb erek görbületeiben és proximális szakaszaiban [11]. Különböző klinikai manifesztációi lehetnek a betegségeknek, melyek az érintett vaszkulátúra típusától függenek. A koronáriákban kialakuló léziók miokardiális iszkémiához vagy infarktushoz vezetnek. Ha viszont arteriális vazospazmussal jár együtt, a koronáriákban kialakult kisebb lézió akár halált is okozhat. Valójában sok esetben már önmagukban is akut miokardiális infarktushoz vezethetnek az érgörcsök. Hasonlóképpen a cerebrális keringésben kialakuló iszkémiás károsodás hatására *stroke* alakulhat ki, mely a perifériás keringés elzáródásával jár együtt. A zsigeri keringésben kialakult léziók a belek infarktuszát idézhetik elő, míg a renális artériás léziók is iszkémiát, ezáltal a vese parenchima sejtjeinek károsodását okozzák, így vezetve urémiához és végül veseelégtelenséghez. A vese gyakori helyszíne a tromboembólia jelenségének, ugyanis a vese artériák ateroszklerotizálódása az egyik leggyakoribb kiváltója a hipertenzió kialakulásának, mely önmagában is rizikófaktor a ateroszklerózisnak. A trombusok és a hemorrágia kialakulása az ateroszklerotikus plakkokban tovább csökkentik az erek lumenének méretét. A tromboembólia jelensége gyakorlatilag az instabil plakkok ruptúrájának következménye, így okozván akut koronária szindrómát és *instabil anginát* [12].

2.1.2. Az ateroszklerotikus léziók csoportosítása szövettani megjelenésük alapján

Az ateroszklerotikus léziókból szövettani megjelenésük alapján hat fő csoportot különböztetünk meg (*1. ábra*). Az I. csoportba tartozók aterogén lipoproteinek és infiltrálódott mononukleáris leukocitákat tartalmaznak. Az intimán olyan adaptív változások figyelhetők meg, mint annak megvastagodása. Ez a típus a legtöbb emberben már születéskor megfigyelhető. A II. csoportnál már a makrofágok és habos sejtek, a simaizomsejtekkel (SMC) együtt képeznek réteget, mely beszívárog a médiából az intimába, ez az elváltozás egyedülálló jellemzője a betegségnek, itt a teljes léziókat már *fatty streak-nek* nevezzük. A III. csoport tulajdonképpen egy átmenet a II és IV. típus között, melyben már durva lipid granulomok és partikulumok vannak szétszóródva, megakadályozva ezzel a simaizomsejt integritását. A IV. típus valójában a tipikus ateróma, mely hatalmas extracelluláris lipid maggal és abluminálisan növekvő ateroszklerotikus lézióval rendelkezik. Az V. típus a nagy extracelluláris lipid magon kívül egy fejlődő fibrotikus tokkal is rendelkezik. Itt már jelentős kollagén és SMC növekedés figyelhető meg. Az V. típust további két, Vb és Vc altípusra különítjük, ahol az Vc altípusban több rostos kötőszövet, kevesebb lipid található, kalcium viszont egyáltalán nem. A VI. típusú

léziók ruptúrált ateroszklerotikus plakkok, melyeket físszúrák és hematómák kialakulása követ az arteriális lumenben. Amint a trombogén lipid mag kapcsolatba kerül a vérárammal, trombózt, valamint vérlemezke aggregációt vált ki [13].



1. ábra: Ateroszklerotikus léziók szövettani osztályozása (adaptált forrás:[14])

2.1.3. Lipid metabolizmus szerepe ateroszklerózisban

Trigliceridek, koleszterin és lipoproteinek érintettek a koszorúér-betegségekben, kifejezetten az ateroszklerózisban [13, 15]. Már 1987-ben a csökkent koncentrációjú magas sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein, HDL) és a megnövekedett triglicerid mennyiséget tették felelőssé az ateroszklerotikus léziók kialakulásáért [16]. A Nemzeti Koleszterin Oktatási Program (National Cholesterol Education Program, NCEP) ajánlása az 1 mmol/L alatti HDL plazma koncentráció betegeket sorolja a koszorúér beteg rizikó csoportba. Az Egyesült Királyságban egy nagy, két vizsgáló helyen végzett, *Collaborative Heart Disease* nevű *cohort* tanulmányban megállapították, hogy a triglicerid koncentráció meghatározásával nagyobb valószínűséggel lehet megjósolni a koszorúér-betegségeket [17]. Mindkét vizsgálat során, egymástól függetlenül, azt az eredményt kapták, hogy a 2,25 mmol/L-es triglicerid koncentráció és az öt feletti LDL/HDL arány ötszörösére növelte a nem kívánt

kardiovaszkuláris események kockázatát, különösen metabolikus szindrómában és inzulin rezisztenciában szenvedő betegeknél.

Ahogy korábban említettük, a HDL-nek kulcsfontosságú szerep jut az ateroszklerózis patogenezisében, ugyanis köztudottan reverz transzport funkciót végez az LDL-lel szemben. Protektív szerepe a sejtfelszíni HDL receptorok által mediált, mely új útvonalat kínál az ateroszklerózis indukálta kardiovaszkuláris megbetegedések kezelése terén. A CD36 fehérje szupercsalád tagja, az SR-B1, egy jól definiált HDL felszíni receptor, mely szelektív HDL koleszterin felvételt közvetít. Kísérleti eredmények azt sugallják, hogy az SR-B1 gén transzfer a plazma HDL szintjének emelésével képes megváltoztatni az aterogén folyamatot. A HDL azáltal is képes ellensúlyozni az LDL proaterogén aktivitását, hogy az arteriális intima területéről mobilizálja a koleszterin molekulát a májhoz, segítve annak az epén keresztüli ürülését. Egyes tanulmányok a HDL-t, mint az oxidált LDL akceptor, transzporter és inaktíváló „ügynökként” is értelmezik. További „nem-lipid” eredetű funkciókkal rendelkeznek: a) gátolja a monociták adhézióját és migrációját az arteriális intimába; b) stimulálja a sejtek javító és proliferáló folyamatait; c) megőrzi az endotél-függő aktivitást; d) megelőzi a trombózist [18]. Újabb tanulmányok a plazma koleszterin-észter fehérje fontosságát is hangsúlyozzák a lipoproteinek metabolizmusa kapcsán. A koleszterin-észter fehérje egy 70,000-74,000 dalton molekula méretű, hidrofób glikoprotein, mely számos szervben, többek között a szívben is szintetizálódik, funkcióját tekintve fokozza a monociták differenciálódását makrofágokká. Alapvetően elmondhatjuk róla, hogy egy jelentős szereppel bíró fehérje a koleszterin reverz transzportjában, mely a plazma HDL koleszterin koncentrációját és a HDL partikulumok méretét szabályozza. A familiáris hipoalfa-lipoproteinémiával diagnosztizált betegeknél is koleszterin-észter transzfer fehérje hiányt állapítottak meg [19].

A lipoprotein lipáz és a máj lipáz enzimjei a neutrális lipázok családjába tartozó enzimek, melyek szintén jelentős szereppel bírnak a lipoprotein metabolizmusa során. Az intravaszkuláris lipoprotein lipáz enzim az endotélsejtbe ágyazva található, szívizomban és vázizomban szintetizálódik főként, mely szövetek a zsírszövetben található zsírsavakat hasznosítják energiatermelés szempontjából. A lipoprotein lipáz tehát lipidek hidrolízisét katalizálja különböző típusú lipoproteinekben, mint a kilomikronokban és nagyon alacsony denzitású lipoproteinekben (very low density lipoprotein, VLDL), kisebb méretű remnantokká alakítva azokat, melyek gyorsan eliminálódnak a véráramból [20]. Másrészt, a máj lipáz, mely a májsejtekben szintetizálódik és választódik ki, befolyásolja a HDL metabolizmusát. Mivel a máj lipáz szubsztrátjai a trigliceridben gazdag partikulumok, így a β -VLDL felhalmozódása is a máj lipáz hiányára vezethető vissza. Így elmondhatjuk, hogy az említett két

lipáz hiányának nagyfokú jelentősége van az ateroszklerózis kialakulásában. Kutatások bizonyítják, hogy terápiásan módosított máj lipáz szint, növelte az LDL denzitását, így kedvezően befolyásolta a koszorúér-betegségek progresszióját [21]. A posztprandiális lipémia szintén jól korrelál a koszorúér-betegségek progressziójával, a táplálkozás által bevitt magas triglicerid koncentráció miatt. Egy tanulmányban fokozott mennyiségű aterogén kilomikron és kis denzitású LDL partikulum, valamint csökkent koncentrációjú HDL volt megfigyelhető zsírdús táplálkozást követően, mely a VII. koaguláns faktor aktiválása révén fokozta a trombózis kockázatát [22]. Az erek falában az ateroszklerotikus léziók kialakulásának kezdeti szakaszában kulcsfontosságú szereppel bír az oxidáció következtében visszamaradt LDL koleszterin. Az oxidált LDL elősegíti a monociták és limfociták toborzását, illetve retencióját (valamint makrofágokká történő differenciálódását), továbbá fokozza a különböző növekedési faktorok és citokinek termelését [23]. Az LDL oxidációjának hatására az apolipoproteinek, a koleszterin, a foszfolipidekkel észterifikálódott vagy koleszterin-észterként megtalálható telítetlen zsírsavak gyakran módosulnak. Az úgynevezett lipid peroxidok béta-hasításának köszönhetően olyan aldehid végtermékek képződnek, mint például a malondialdehid (MDA) vagy α -hidroxil- 2,3- nonenál és 4-hidroxil-2,3-alkenál. Ezek a lipid metabolitok aktívak lehetnek biológiailag, akár citotoxikus és mutagén hatással is rendelkezhetnek. Az említett aldehidek közül talán a metastabil MDA mediált oxidatív stressz fokozó, károsító hatásai a legismertebbek molekuláris szinten. Humán aorta szubendoteliális terében is kimutatták a jelenlétét [24]. Tehát az MDA, mint a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjából származó szekunder produktum szintje tájékoztatást ad az oxidatív stressz mértékéről. Ma már ez a vizsgálat rutinszerűen végezhető és diagnosztikai értékű iszkémiás, illetve ateroszklerotikus megbetegedések esetén egyaránt [25, 26]. Az említett oxidált LDL nem csupán a káros aldehid metabolitok, hanem a reaktív oxigén származékok (ROS) képződését is nagymértékben fokozza. A leggyakoribb szabadgyököknek számító reaktív oxigén intermedierek többsége a mitokondriális légzési lánc egyes lépéseiben keletkezik. A légzési lánc során az oxigén számos egy elektronos redukción megy át a mitokondriális elektrontranszport lánc IV-es komplexe, a citokróm c oxidáz (COX) által. A COX-nak, azaz a terminális oxidáció egyik legfontosabb antioxidáns komplexének kapacitás-csökkenése fokozza az elektron kiszivárgását az elektrontranszport-láncban, ahol így - molekuláris oxigén jelenléte mellett - ROS sokasága képződik. Saját kutatócsoportunk is beszámolt egy korábbi közleményében az ateroszklerózis következtében kialakult COX funkcióromlásról [27]. E folyamat során képződnek az említett származékok, melyek közül elsőként említendő a szuperoxid-anion gyök ($\cdot\text{O}_2^-$)[28]. A szuperoxid anion gyök meglehetősen magas oxidatív

potenciállal rendelkezik (standard oxigén/szuperoxid pár redox potenciálja -0,137 V), könnyen kijuthat a rendszerből, oxidatív stresszt, sejthalált okozva [29]. Élettani körülmények között a védekező rendszer fő tagjai, a kataláz (CAT), a glutation-peroxidáz (GSH-Px) és a szuperoxid-diszmutáz (SOD) eliminálják a szabadgyököket. A SOD hidrogén-peroxiddá alakítja az O_2^- -t, ezáltal eliminálva a rendszerből, a glutation-peroxidáz és kataláz enzimek pedig ártalmatlan H_2O -t és O_2 -t termelnek belőle [30](2. ábra).

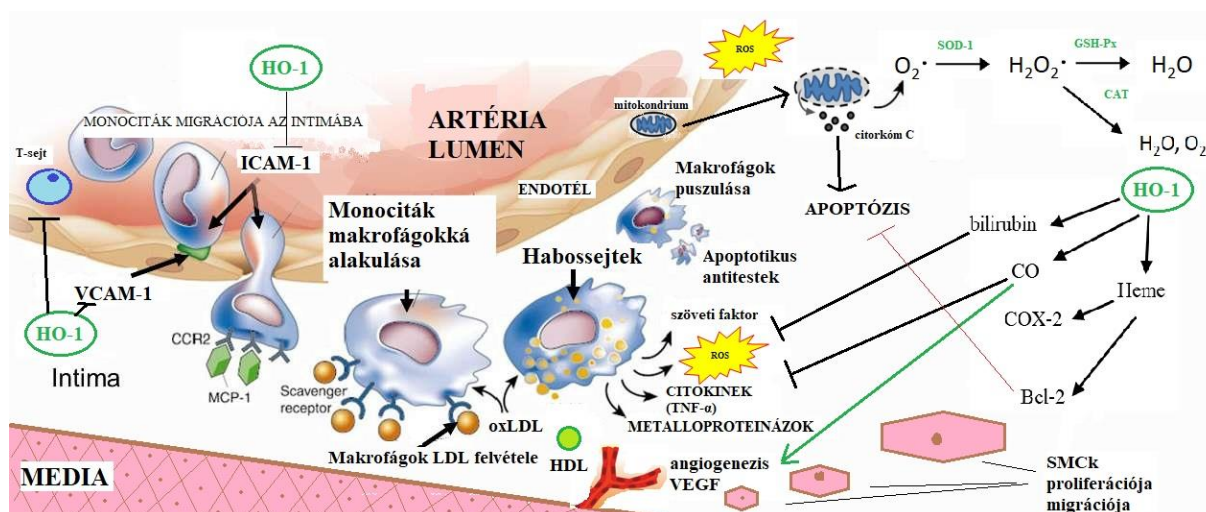
A korábban említett monocitáknak is, az ateroszklerózis minden fázisában tetten érhető szerepe van. Kiemelt jelentőségű az ateroszklerózis kezdeti szakaszának vélt endotél diszfunkció során. Az endotél sérülése sokak szerint mechanikai eredetű, melyet nagy valószínűséggel az érszűkület következtében kialakult megváltozott áramlási viszonyok okoznak [31]. Az endotél diszfunkcióként emlegetett gyulladásos reakció pedig maga a válasz a sérülésre. Az endoteliális sejtek olyan felületaktív adhéziós molekulákat kezdenek el termelni, mint a vaszkuláris sejtadhéziós molekula (VCAM-1), mely a monocitákat és T-limfocitákat képes megkötni. A monociták és T-limfociták vaszkuláris migrációját szabályozó molekulák (mint pl.: a vérlemezke-endotél adhéziós molekula), összehangoltan működnek a kemotaktikus anyagokkal, amelyeket az endotél és a monociták termelnek, és amelyek mintegy „becsalogatják” a monocitákat és a T-sejteket az artériába [32]. Éppen ezért itt érdemes megjegyezni, hogy több kutatás is szoros összefüggést talált az endotél diszfunkció és a magas C-reaktív fehérjének (CRP) szintje között [33, 34]. A CRP az egyik legérzékenyebb és legspecifikusabb pozitív akut fázis fehérje. Szintje emelkedett gyulladásos megbetegedések, infekciók, szövetkárosodás és nekrosis, továbbá malignus megbetegedések során. Akut miokardiális infarktus esetében a 24-48. órában emelkedik meg, és magas szintje 1-2 héten keresztül is fent állhat. Permanens emelkedése egyértelműen szövetkárosodásra utal, mely eredmény diagnosztikai, de nem differenciál diagnosztikai értékű ateroszklerózis megállapításánál, tehát a kiegészítő vizsgálatok elengedhetetlenek [35]. Ennek ellenére muszáj megjegyezni, hogy a CRP a kardiovaszkuláris rizikót becslő Reynold score-ba kerülését követően szignifikánsan javította a tradicionális rizikófaktorokon alapuló kockázatbecslést.

2.1.4. A hemoxigenáz 1 (HO-1) szerepe az ateroszklerózisban

A HO-1 fokozott expressziója figyelhető meg az endotélben, az ateroszklerózis korai szakaszában [36], mely valószínűleg egy fajta sejtszintű válasz a lipidperoxidációs termékek megjelenésére. Számos kísérleti eredmény taglalja az oxidált LDL citotoxikus hatásával szembeni HO-1 nyújtotta védelem kialakulását ateroszklerotikus körülmények között [37]. Egy japán kutató csoport HO-1 deficiens betegeit vizsgálva tapasztalta, hogy HO-1 hiányában az

endotél sejtek sokkal érzékenyebben reagálnak az oxidatív stresszre [38]. Ezek alapján kijelenthetjük a HO-1 enzimről, hogy az olyan pleiotróp hatásai mellett, mint az angiogenezis- és sejtproliferáció-indukáló, antiapoptotikus és antioxidáns hatás, gyulladáscsökkentő aktivitással is bír. Míg az antioxidáns tulajdonság a biliverdin/bilirubin képződésének tudható be, addig a gyulladáscsökkentésért a szén-monoxid képződése a felelős [39]. Mindkét metabolit, ekvimoláris mennyiségű vassal együtt a HO-1 által katalizált Hem degradációjakor képződik. A vas többnyire az újabb Hem szintézisében használdik fel, a biliverdin a biliverdin-reduktáz enzim által bilirubinná alakul, míg a maradék szén-monoxid a keringő hemoglobinhoz kötődik és a légzéssel távozik a szervezetből. Fiziológiásan a hemoxigenázok legfontosabb feladata az előregedett vörösvértestekből származó Hem reciklizációja [40]. Bizonyított tény, hogy a HO-1 aktivációja és az általa megemelkedett szöveti szén-monoxid számos gyulladásos mediátor - mint a TNF- α , IL-6, IL-1 β - szintjét csökkenti, valamint növeli az antiinflammatorikus hatású IL-10 expresszióját [41]. A HO-1 gyulladáscsökkentő hatását támasztják alá további kutatások, melyekben kimutatták, hogy a kobalt-protoporfirin IX (CoPP) indukálta megnövekedett HO-1 expresszió csökkentette a T-sejt differenciálódást, valamint csökkentette a VCAM és ICAM sejtadhéziós molekulák elválását [42-44]. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a jól szabályozott enzimműködés, a megfelelő mennyiségű HO-1, bilirubin és szén-monoxid rendkívül kedvező hatású lehet iszkémia vagy akár atheroszklerózis által károsított szövetek túlélésében, kardiovaszkuláris kórképekben [45]. Ezáltal vitathatatlan, hogy HO-1 enzim indukcióját kiváltó terápia értékes összetevője lehet a kardiovaszkuláris megbetegedések komplex farmakológiájának, így nem meglepő, hogy napjainkban ez egy rendkívül kutatott területnek számít. Egyre több természetes eredetű jelölt HO-1 indukáló tulajdonságára derül fény. A teljesség igénye nélkül megemlítve párat, ilyen például a zöld tea (*Camellia sinensis*), a fekete áfonya (*Vaccinium myrtillus*), a meggy (*Prunus cerasus*) és a borszőlő (*Vitis vinifera*). Tulajdonképpen a flavonoidokról, illetve a flavonoidokban gazdag növények többségéről gyakran megállapított tény, hogy fokozzák a HO-1 enzim expresszióját [46, 47]. Érdeemes megemlíteni a HO-1 és az endotél diszfunkciója kapcsán, hogy a gyulladásos válaszreakció során később az endotél sejtekből és a makrofágokból vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) is expresszálódik, mely segíti a makrofágok működését, ezáltal fokozva a gyulladásos folyamatot [48]. A VEGF gyakran a sejtek hipoxiáját követően is felszabadul, tirozin kináz receptorhoz kötve angiogenezist indukál [49]. Akut miokardiális infarktus (AMI) után is megfigyelhető ez a neovaszkularizáció iszkémiás szívizomszöveten [50]. Tudományos publikációk bizonyítják, hogy a HO-1 által termelt szén-monoxidnak

jelentős szerepe van a VEGF indukálta angiogenezisben, ezáltal a neovaszkularizáció következtében létrejövő szöveti túlélésben [51, 52] (2. ábra).



2. ábra: A HO-1 hatása az ateroszklerózis patogenezisére (adaptált forrás: [31])

2.2. Pulmonális artériás hipertónia

2.2.1. A PAH epidemiológiája, osztályozása

Primer pulmonális hipertóniáról azokban az állapotokban beszélhetünk, amikor a szív katéterezése során mért pulmonális artériás középnyomás (mPAP) meghaladja a 25 Hgmm-t, miközben a pulmonális artériás éknyomás (PCWP) normális (PCWP < 15 Hgmm) [53]. Utóbbi kitétel azért fontos, mert magas PCWP esetén más morbus áll a diagnosztikai eredmény hátterében.

A PAH egy sajátos vaszkulopátiával járó, kóros és progresszív betegség entitást jelöl. Önálló létszerűségét példázza, hogy a pulmonális hipertóniákat (PH) érintő, jelenleg is érvényben lévő, egészségügyi világszervezet (World Health Organization, WHO) által készített klinikai klasszifikációjában, melyben etiológia és patofiziológia alapján 5 fő csoportot különböztetnek meg, önálló csoportot képvisel. A további négy csoport a *bal szívfél rendellenesség okozta PH*; *tüdőbetegség és/vagy hipoxia okozta PH*; *krónikus tromboembóliás PH* valamint a *tisztázatlan és multifaktoriális eredetű PH*. Megjegyzendő, hogy a PAH-nak van idiopátiás, örökölhető, toxin vagy gyógyszer indukálta, továbbá egyéb kockázati tényezőkhöz köthető formája is, de alapvetően mindegyikre hasonló patológia, hemodinamikai változások, klinikai manifesztációk, ezáltal gyakorlatilag azonos terápiás módok jellemzőek, ezáltal indokolt az azonos csoportba történő besorolásuk. Az aktuális klasszifikációt, mely a 2013-as *5th World Symposium on PH* kongresszuson került bemutatásra, nem csak a klinikum használja, hanem az amerikai és európai gyógyszerhatóság (FDA és EMA) is, a pulmonális hipertóniák kezelésére elfogadott új gyógyszerjelöltek indikációs területei kapcsán [54].

A PAH klasszifikációja az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) szerint:

1. Pulmonális artériás hipertónia (PAH)
 - 1.1. Idiopátiás PAH (IPAH)
 - 1.2. Örökölhető PAH (Heritable Pulmonary arterial Hypertension, HPAH)
 - a) BMPR2 mutáció
 - b) ALK-1, ENG, SMAD9, KCNK3 mutáció
 - c) Ismeretlen eredetű mutáció
 - 1.3. Gyógyszer és toxin indukálta PAH
 - 1.4. Más betegséghez asszociált PAH (APAH)
 - a) Kötőszöveti betegség (Connective-tissue disease, CTD)
 - b) HIV fertőzés
 - c) Portális hipertónia
 - d) Kongenitális vitium
 - e) *Schistosomiasis*
- 1'. Pulmonális venookluzív betegség és/vagy pulmonális kapilláris hemangiomatózis
- 1''. Újszülöttek perzisztens pulmonális hipertóniája
2. Pulmonális hipertónia bal szívfél elégtelenség következtében
 - a) Szisztolés diszfunkció
 - b) Diasztolés diszfunkció
 - c) Billentyű elégtelenség
 - d) Kongenitális/ szerzett bal kamrai beáramlási/ kiáramlás obstrukció és kardiomiopátia
3. Pulmonális hipertónia tüdőbetegség és/vagy hipoxia miatt
 - a) Krónikus obstruktív tüdőbetegség
 - b) Intersticiális tüdőbetegség
 - c) Egyéb tüdőbetegségek kevert restriktív és obstruktív képpel
 - d) Alvási *apnoe*
 - e) Alveoláris hipoventillációval járó megbetegedések
 - f) Krónikus magassági betegség
 - g) Fejlődési rendellenességek
4. Krónikus tromboembóliás pulmonális hipertónia
5. PH tisztázatlan és/vagy multifaktoriális mechanizmussal
 - a) Hematológiai betegségek: myeloproliferatív betegségek, splenectomia
 - b) Szisztémás betegségek: szarkoidózis, pulmonális Langerhans sejt hisztiocitózis, lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatózis, vaszkulitisz
 - c) Metabolikus betegségek: Gaucher-kór, glikogéntárolási betegségek, pajzsmirigy betegségek

- d) Egyéb: tumoros obstrukció, fibrotizáló mediasztinitisz, Dialízis kezelést igénylő krónikus veseelégtelenség

A pulmonális artériás hipertónia egy ritka, viszont malignus jellegű betegség, mely a mai napig gyógyíthatatlan. Kialakulása gyakran észrevehetetlen, így az első diagnóziskor a beteg már rendkívül előrehaladott állapotban lehet. A tünetek megjelenésétől a diagnózis felállításáig eltelt idő az elmúlt kb. 15 évben szinte semmit sem változott, általában meghaladhatja az egy évet is [55]. Mivel a betegség epidemiológiája csak részben feltárt, így szegényes a rendelkezésünkre álló prospektív vizsgálatok tára, a legtöbb adat országos regiszterekből származik. Bár a fejlett ipari országokban a betegség ritkának mondható, az utóbbi években növekedni látszik a felismert esetek száma. Franciaországban a PAH prevalenciáját 15 beteg/millió főre becsülték, ezen belül az IPAH esetek száma 5,9/millió fő [56]. Az Egyesült Királyságban és Írországból 6,6/millió volt a becsült HPAH+IPAH előfordulás a 21. század elején [57]. Az elmúlt évtizedben publikált magyar adatok szerint a betegség incidenciája 1-2/millió lakos/év [58]. A feldolgozott tanulmányok alapján megállapíthatjuk, hogy a betegek átlagéletkora 50-53, enyhe női dominanciával, valamint az 5 éven belüli mortalitási ráta 40-43 %-os. A diagnózis felállítása utáni várható élettartam terápia nélkül nagyjából 2,8 évre becsülhető [59]. A *National Institutes of Health Registry* adatai szerint francia és amerikai regiszterek alapján az 1980-ban megállapított 48 %-os túlélési arány ma 67 %-ra emelkedett, köszönhetően az elmúlt másfél évtizedben született jelentős eredményeknek PAH terápiájában, valamint a sok új forgalomba került gyógyszernek [60, 61].

A helyzet kifejezetten rosszabb azokban a fejlődő országokban, ahol gyakori a HIV- és *Schistosoma*-fertőzés – mint potenciális PAH asszociált betegségek - előfordulása. Legfrissebb adatok alapján a világ 36,7 millió *schistosomiasis* fertőzöttjéből 25,5 millió él Afrika szub-szaharai régiójában, ezeken a területeken az utóbbi évtizedekben a PAH betegpopulációja változatlanul 0,5 % körülire tehető [62, 63].

A *schistosomiasis* nemcsak a PAH betegségek legnépesebb alcsoportja, hanem a több mint 200 milliós fertőzött populációnak köszönhetően, a világ harmadik leggyakoribb parazita-infekciója [64]. Az érintett betegek jelentős száma, valamint azok magas 5 éven belüli mortalitása miatt nem győzzük kihangsúlyozni, hogy milyen nagy szükség van a PAH terápiájának fejlesztésére.

2.2.2. A PAH patofiziológiája, diagnosztikája

A PAH-ra jellemző a pulmonális artériák progresszíven növekvő érellenálása. Mivel a pulmonális artériás középnyomás arányos a perctérfogat (cardiac output, CO) és a pulmonális érellenálás szorzatával, így a vaszkuláris rezisztencia (PVR) progresszív PAH-hoz vezet. A

PVR növekedése jobb kamra túlterheléséhez vezet, mivel a jobb kamra térfogata nagyobb, ám izomtömege csekélyebb a bal kamráéhoz képest, jóval érzékenyebb a fokozott nyomásterhelésre. Ez azt jelenti, hogy jóval korábban megjelennek a jobb kamrában a PAH indukálta adaptációs folyamatok, a Frank-Starling mechanizmus, valamint a kamrai izom hipertrófiája, mint a balban [65]. A szívizom hipertrófia kezdetben fokozza a kamrai kontraktilitást, ám a perzisztensen magas nyomás, a jobb kamrai végdiasztolés és végszisztolés nyomást, valamint a kamrai térfogatot is fokozza. Trikuszipidális regurgitáció alakul ki az annulus dilatáció és a *chordae tendinae* feszülése miatt, mely a pitvar tágulatát, a jobb kamra volumenterhelését és a CO csökkenését eredményezi [66]. A jobb kamra progresszív hipertrófiája előbb diasztolés majd szisztolés elégtelenséghez vezet. A hipertrófiára jellemző, hogy a szívizomsejtek növekedését a kapilláris vaszkulátúra fejlődése képtelen követni, tehát képtelen kiszolgálni a kamra megnövekedett oxigén igényét, így iszkémiás károsodás lép fel. A megnövekedett pulmonális artériás közép nyomás (mPAP) és a jobb kamra nyomásterhelése hatására csökken a bal kamra-aorta nyomásgrádiense, így az artéria koronária dextra-n keresztüli szisztolés, majd diasztolés áramlás is csökken, így fokozva az iszkémiás károsodást. A maladaptáció végül fokozódó szöveti elhalást eredményez, mely dekompenzált jobbszívfél-elégtelenséghez (*cor pulmonale*) vezet [67]. Mivel abnormális mértékben csökken a jobbszívfél-elégtelenség hatására a bal kamra volumenterhelése, bal kamrai csökkent CO-t idéz elő. A felborult jobb illetve bal kamrai nyomásgrádiens, az interventrikuláris szeptum-ot (IVS) szisztolében ellapítja, diasztolében beboltoítja a bal kamra irányába, így csökkentve a bal kamra diasztolés térfogatát [68]. Ez a jelenség jól látható a szív 2D rövid tengelyű, papilláris izom magasságában készített echokardiográfiás felvételéről: a jobb kamra klasszikus félhold alakja eltűnik, fordított „D”-t, a bal kamrából viszont egy normál „D”-betűt formálva [69]. A folyamat eredményeképpen szisztémiás hipoxia lép fel, mely *circulus vitiosus*ként tovább gyűrűzve, komolyabb szívelégtelenségen át korai halálhoz vezet.

Ahogy korábban említettük, a betegség kezdetben tünetszegény, nincs korai patognómikus jele a PAH-nak, a jelentkező tünetek már a progresszív jobb szívfél-elégtelenség következményei. A diszpnoé az elsőként érzékelhető tünet, mely kezdetben csak fizikai aktivitásra, később már nyugalomban is fellép. A betegség előrehaladásával fokozatosan mutatkoznak meg a jobbszívfél-elégtelenség olyan jelei, mint a tág juguláris vénák, hepatjuguláris reflux, hepatomegália, ascites és végtagödéma. A csökkent keringési perctérfogat hatására kiszélesedő arterio-venosus oxigénkoncentráció-különbség késői jele már a cianózis [70].

A PAH diagnosztikája egy multidiszciplináris csapat együttműködését igénylő feladat, mely kizárásos elven működik. Különösen fontos a PAH-os betegek családtagjainak szisztematikus

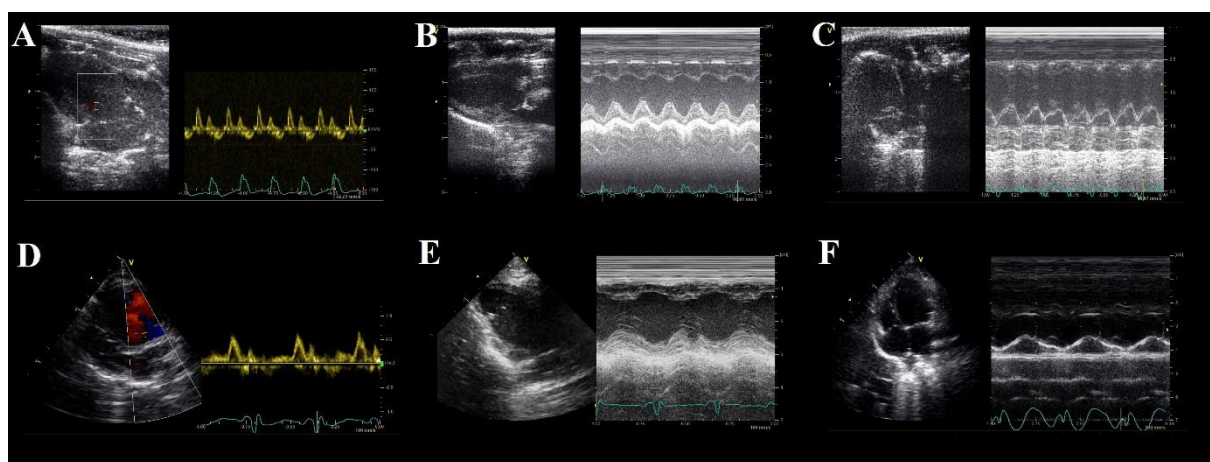
vizsgálata a familiáris halmozódás miatt, valamint például az olyan magasabb rizikócsoportha tartozó betegeké, akik scleroderma spectrumba tartozó kórképben szenvednek [71-73].

PAH diagnosztikájára használt legbiztosabb eljárás a klinikumban a jobbszívfél invazív katéterezése, mellyel a pulmonális artériák szisztolés, diasztolés és középnyomása mellett a pitvari és kamrai nyomás is mérhető, melyből a CO, PVR és a tüdő kapilláris éknyomás (PCWP) kalkulálható. A módszer relevanciáját, illetve megbízhatóságát támasztja alá, hogy a betegek mortalitása jól korrelál a módszerrel mérhető hemodinamikai paraméterekkel, elsősorban a jobb pitvari nyomással, a CO-tal és mPAP-sal. A módszer előnye, hogy a katéterezés során pulmonális angiográfia is végezhető, hátránya, hogy invazivitása minden esetben kockázati tényező [74].

Természetesen még számos hasznos diagnosztikus képalkotó (tüdőcisztoográfia, high-res CT és mellkas röntgen, transztorakális echokardiográfia (TTE)), valamint funkcionális (terheléses EKG és légzésfunkció) eszköz áll rendelkezésünkre a diagnózis felállításában. Az asszociált kórképek felderítésében rendkívül hasznos a kardiális MRI, mely egyaránt számít képalkotó, illetve funkcionális eszköznek, továbbá elvitathatatlan értékűek a vérvizsgálatok (antitestek és vérgáz analízis) eredményei is [75]. A TTE előnye a katéterezéssel szemben, hogy noninvazív, így biztonságos, ezért széles körben elterjedt eljárás. Az echokardiográfia (M-mód, 2D és Doppler) a strukturális és funkcionális kardiális státusz megítélésében nélkülözhetetlen. A vizsgálat információt nyújt a szív méretéről, a szívüregek tágasságáról, a kamrafal vastagságáról, a szívbillentyűk állapotáról, továbbá a perikardiális tér, pitvari és kamrai sövény, nagyerek (aorta, *vena cava inferior*, pulmonális kiáramlási pálya) anatómiai jellemzőiről (3. ábra). Ezáltal lehetővé teszi számos, a PAH-hoz hasonló tünetekkel járó patológiás állapotok, mint a kardiomiopátiák, bal kamra diszfunkció, billentyű rendellenességek kizárását, illetve informálhat esetleges szívfejlődési zavarokról [76]. A jobb kamra vizsgálatát (kifejezetten experimentális körülmények tekintetében) nehezíti a kamra vékony és trabekulált fala, retroszternális helyzete, valamint frontális síkban félhold alakú struktúrája, tehát elmondhatjuk, hogy a jobb szívfél állapotának felmérése TTE eljárás segítségével nagyfokú gyakorlatot igényel. Ennek ellenére az elmúlt évtizedekben, különböző predikciós értékkel ugyan, de egyes TTE segítségével meghatározott paraméterek képesek a jobb szívfél szisztolés és diasztolés funkciójának kvantitatív elemzésére. Ilyen például a trikuszipidális annuluson végzett vizsgálat (tricuspidal annular plane systolic excursion, TAPSE), a frakcionált terület változás (fractional area change, FAC), valamint a jobb kamra méretét és funkcióját meghatározó Tei index [77]. A PAH echokardiográfiás vizsgálatával kapcsolatban muszáj megjegyeznünk, hogy a pulmonális keringés állapotáról kapott eredmények kettős indirekt következtetésen alapulnak.

Gyakori jelenség, hogy bár a számított jobb kamrai szisztolés nyomás jó korrelációt mutat az invazív módon mért nyomás értékkel, kifejezetten normális nyomásérték tartományokban, azonban egyénenként nagy eltérést mutathat, valamint kóros esetekben jelentősen romlik a korreláció mértéke, így álpozitív és álnegatív eredményekre egyaránt számíthatunk [71, 78].

Összességében azért elmondhatjuk, hogy a szívultrahang pótolhatatlan a PAH diagnosztikájában, valamint a betegség terápiájának nyomon követésében. Ennek megfelelően a laboratóriumi állatokon végzett kísérletekben is egyre gyakrabban alkalmazott módszer. Az sem elhanyagolható tény, hogy egy *in vivo*, non-invazív, valamint rutinszerűen végrehajtható, ám kellő szakképesítést igénylő eljárásról beszélünk, mely teljes mértékben támogatja az állatkísérletek etikai elveit [79].



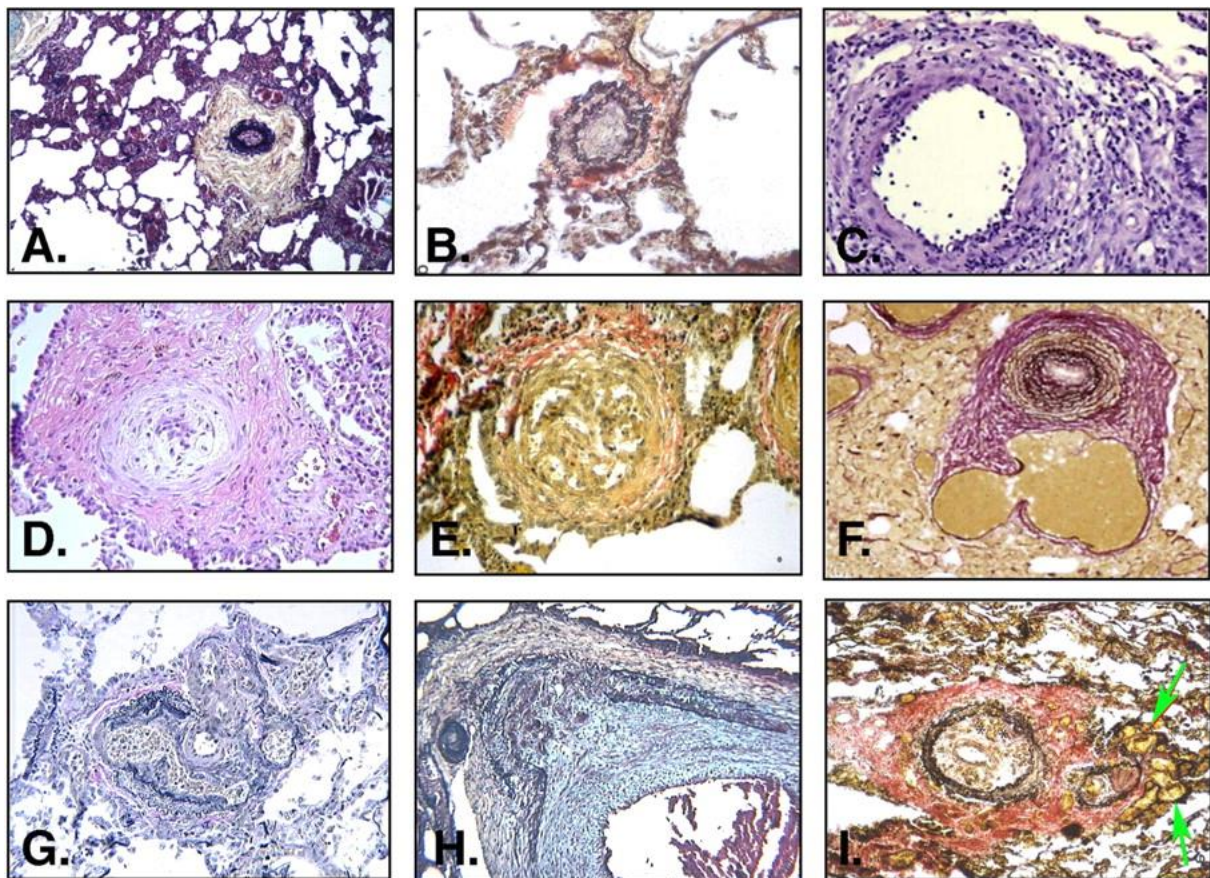
3. ábra: Reprezentatív képek kisállat szívultrahangról. A) apikális háromüregű metszet, Doppler-mód, mitrális E és A beáramlási csúcshullámok (patkány); B) Paraszternális hossz tengelyi metszet (parasternal long axis, PLAX) M-mód felvétel, bal kamra (patkány); C) apikális négyüregű metszet, M-mód, TAPSE (patkány); D) apikális háromüregű metszet, Doppler-mód, mitrális E és A beáramlási csúcshullámok (nyúl); E) PLAX M-mód felvétel, bal kamra (nyúl); F) apikális négyüregű metszet, M-mód, TAPSE (nyúl). (Forrás: saját felvétel, Vivid E9 echokardiográf készülék használatával).

2.2.3. A PAH szövettana

A PAH betegektől vett minták tipikus hisztológiai elváltozásai a következők:

- A) Tunica media hipertrófia: Gyakori minden egyéb pulmonális hipertóniában, beleértve a PAH alcsoportjait is. Előfordulhat intima léziókkal társulva vagy önállóan. A media megvastagodását a SMC térfogat növekedése, hipertrófiája, fokozott proliferációja, valamint hiperpláziája okozza. Az artériák muszkularizálódásának hátterében pedig a periciták SMC-é történő átalakulása, szaporodása áll. Gyakran társul a *tunica adventitia* megvastagodásával is, mely oka a fibroblasztok osztódása és fokozott extracelluláris mátrix (ECM) termelése. Amennyiben a media megvastagodás izoláltan észlelhető, az a betegség egy korai fázisára enged következtetni, melyet „visszafordítható stádiumnak” tartanak (4. ábra/A).
- B) Nem-lamináris intima léziók: A *tunica intima* fibrotikus megvastagodása szintén gyakori jelenség PAH során, mely érintheti az artéria lumenét koncentrikusan és excentrikusan egyaránt. Ennek a fibrotikus megvastagodásnak a hátterében az ide vándorló fibroblasztok és miofibroblasztok proliferációja, illetve a fokozott kollagén termelés áll. Az excentrikus léziók gyakran bizarr, több csatornás, nagy kiterjedésű fibrotikus léziókat hoznak létre, az intimába beépülő *in situ* trombotizáció után (4. ábra/A).
- C) Lamináris intima léziók: Rendkívül jellemző szövettani jelensége lehet a PAH-nak, mely morfológiailag szembetűnő intimális megvastagodást és fibrózist mutat, tipikusan a 100-200 µm-es átmérőjű artériákon. Az angolszász szakirodalom használja találóan az „onion-skin” elnevezést, ugyanis szövettani képe alapján, a koncentrikus laminaként egymásra épülő fibrotikus rétegek sokaságának köszönhetően, valóban hasonlít egy félbevágott hagymára. IPA-ban és kötőszöveti betegségekhez társuló PAH-ban tipikus az „onion-skin” léziók jelensége (4. ábra/D).
- D) Komplex léziók: A plexiform, dilatációs és az arteritis léziók egyaránt ebbe a csoportba tartoznak, bár a legjellegzetesebbek és leglátványosabbak a plexiform típusúak (4. ábra/G-H). A kifejezett endotél proliferáció következtében létrejött, sinusoid jellegű kapilláris fonat, mely a kis artériák lumenét obstruálja, SMC-ből és kollagénből álló mátrixba van beágyazva. A plexiform léziók önállóan is megtalálhatóak, valamint a mögöttük lévő érszakaszból kifejlődhet dilatációs (4. ábra/F) vagy angiomatoid lézió (4. ábra/I) is, mely lényegében egy tekervényes, vénaszerűen elvékonyodott falú

artériás érképződmény. Az artériák fibrinoid nekrozisával társuló polimorfonukleáris arteritis az előbbi kettővel szemben ritka, a PAH-ra nem jellemző jelenség [80-82].



4. ábra: PAH-os betegek patológiai leleteinek festett szövettani metszetei WHO csoportosítása szerinti 1.1-1.3. A: tunica intima, media és adventitia rétegek megvastagodása a pulmonális artéria izomzatának, B: újonnan muskularizálódott artéria elzáródással, C: fokális pulmonális arteritisz, D: koncentrikus intima megvastagodása („onion skin”), lézió az artériában, E: trombotizált pulmonális artéria izom rekanalizációja, F: egy dilatatív lézió, mely feltehetően egy kiszélesedett, elvékonyodott falú artéria, közvetlenül a mediálisan és adventitialisan megvastagodott fő artéria mellett fekszik, G: előrehaladott plexiform lézió; H: fejlődő plexiform lézió; I: angiomatoid lézió; a nyilak „véna-szerű” csatornákat jelölnek (adaptált forrás: [80]).

2.2.4. A PAH patogenezeise

Annak ellenére, hogy az elmúlt évek kutatásai nagymértékben hozzájárultak a PAH patogenezisének megértéséhez, számos részlet vár még mindig tisztázásra. A betegség patogenezisében szerepet játszó jelátviteli folyamatokra ható, új gyógyszerek felfedezése tükrözi a területen tett jelentős előrelépéseket.

Az mindenesetre kétségtelen, hogy a magas PVR háttérében a pulmonális artériák lumenének obstrukciója áll. Elsősorban az 1000 µm átmérőjű kis, disztális artériák, arteriolák érintettek. A PVR növekedéséért három fő tényező tehető felelőssé: a) abnormális vazokonstrikció, mely

endotél funkció csökkenéssel és média proliferációval jár; b) a vaszkuláris struktúra változása, mely remodellinget, neomuszkularizációt, valamint plexiform léziókat kialakító folyamatokat foglal magába; c) valamint *in situ* trombózis [83]. Mindhárom jelenségben központi tényező az endotél sejtek abnormális válaszüreakciója a pulmonális vaszkulaturát ért károsodásokra, vagyis az endotél diszfunkció. Nagy valószínűséggel a patológias folyamat megindításában elsődleges szerepe van a pulmonális artériák vazokonstrikciónak. A kalcium csatorna blokkolót szedő betegek jó prognózisa is ezt az elméletet támasztja alá [84]. Provokáló tényezők, a pulmonális artériák vazokonstrikciónak kiváltó hipoxémia, mechanikai hatás, vagy egyéb biokémiai faktorok (ROS, HIV fertőzés, egyéb immunológiai folyamatok) egyaránt lehetnek. A kóros vazokonstrikciónak a vazodilatatív (nitrogén-monoxid, prosztaciklin) és vazokonstriktív (endotelin-1, tromboxán A, szerotonin, angiotenzin konvertáló enzim) mediátorok közötti egyensúly felborulása okozza, illetve a proinflammatorikus mitogén és trombogén mechanizmusok kerülnek előtérbe. Ennek ellenére a jelenséget elindító tényező, illetve a folyamatban szerepet játszó faktorok teljes részletességgel még mindig nem ismertek. A terápiás szerek megértése szempontjából is érdemes röviden áttekinteni az ismert jelátviteli útvonalakat, melyek diszregulálódnak (5. ábra):

NO/cGMP útvonal

A nitrogén-monoxid (NO) az erek simaizomsejtjeiben termelődik különböző ingerek hatására L-argininből az endoteliális nitrogén monoxid szintetáz (eNOS) enzim hatására. A NO jól ismert vazodilatátor tulajdonsága mellett, vérlemezke aggregációt gátló hatású, illetve az érfali SMC-k anti-proliferatív ágense. Képződésének helyéről képes átdiffundálni a környező SMC-be, ahol is aktiválja a szolubilis guanilát-cikláz enzimet (sGC), mely hatására ciklikus guanozil monofoszfát (cGMP) képződik. A cGMP egy másodlagos hírvivő molekula, mely a protein kináz G (PKG) aktiválása révén, különböző mechanizmusok aktiválásával simaizom relaxációt, azaz vazodilatációt okoz. A foszfodiészteráz enzim (PDE) a cGMP hasítása révén, csökkenti annak hatását. A PDE egy enzim szupercsalád, melynek jelenleg 12 típusát különböztetjük meg emlősökben. A PDE5 típus egyes humán szövetekben, mint a simaizom, szívizom és vérlemezke, magasabb expressziót mutat [85]. Ezt alátámasztják azok a jóval korábbi felfedezések, melyekben megállapították, hogy PAH-ban szenvedő betegek tüdejében kórosan magas argináz szinteket és csökkent NOS szintet, valamint túlexpresszált PDE5 enzim jelenlétét tapasztalták [86-88].

Prosztaciklin útvonal

A prosztaciklin az endotél sejtekben termelődő prosztanoid családba tartozó vegyület, mely a prosztaglandin I₂ (PGI₂) néven is ismert. Ez is, mint a többi rokon vegyület, arachidonsavból

keletkezik, viszont a ciklooxygenáz enzim hatására képződött prosztaglandin H₂ közttermékből, prosztaciklin szintáz enzim katalizálja termelődését. Az arachidonsav membrán foszfolipidekből történő felszabadulása pedig foszfolipáz A₂ (PLA₂) hatására zajlik. Hatását tekintve hasonló tulajdonságokkal jellemezhető, mint a NO, ugyanis erős vazodilatátor, anti-trombotikus a vérlemezkék aktiválódásának gátlása révén, valamint anti-proliferatív. Az említett protektív hatását a vaszkulaturára és a vérlemezkékre a sejtfelszíni receptorához (IP receptor) kötődve fejt ki, mely receptor G-fehérje kapcsolt receptor család tagja (GPCR). Az IP receptor aktiválja az adenilát ciklázt, mely az ATP-t a másodlagos hírvívő szereppel bíró cAMP-vé konvertálja. A cAMP biológiai hatása szövetfüggő, mely hatás a protein kináz A (PKA) által mediált. A SMC-ben a cAMP relaxációt fokoz és vérlemezke proliferációt gátol kalciumszintet szabályozó útvonalakhoz kapcsolódva [89-91].

Endotelin-1 útvonal

Nevéből is adódik, hogy ezt a molekulát is az endotél sejtek termelik, mely endotelin peptid izoforma erőteljes vazokonstriktor és proliferatív hatással bír az érfalban lévő SMC-ekre. A négyféle endotelin receptor közül az endotelin A receptorhoz (ET_AR) és az endotelin B receptorhoz (ET_BR) kötődik elsősorban. Az ET_AR jelentős mértékben expresszálódik a vaszkuláris SMC-k felszínén, receptorhoz kötődő ligandja az intracelluláris kalcium szintjének növekedését indukálva vazokonstriktort, az érfalban pedig proliferációt indít mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalon keresztül. Az ET_BR az endotélsejtekben is expresszálódik, és a SMC-k felszínén is megtalálható, viszont az endotelin-1 hatása ellentétes az endoteliális ET_BR receptorhoz kötődve: fokozza a PGI₂ és NO hatását és az endotelin-1 molekulák degradációját, tehát relaxáló és anti-proliferatív [92]. Fiziológiás körülmények között az endoteliális ET_BR közvetítette endotelin-1 hatás érvényesül, viszont PAH-ban erősödik, illetve dominánsabbá válik az ET_AR-on keresztüli hatás, valószínűleg köszönhetően a betegség következtében emelkedett endotelin-1 koncentrációjának, és az ET_BR okkupanciának. Egyes tanulmányok szerint az endotelin-1 szintjének változása jól korrelál a pulmonális hipertenzió mértékével [93, 94].

„Egyéb tényezők”

Annak ellenére, hogy a fenti három jelátviteli útvonal felfedezése nagy áttörésnek számított mind általánosan, mind a terápiás lehetőségek szempontjából, napjainkra egyre tisztább, hogy csak egy kis szeletét képezik a PAH patogenezisében lejátszódó folyamatoknak. Egyes kutatások a K⁺ csatornák alul expresszáltságát mutatták ki PAH által érintett pulmonális érfali SMC-ben [95]. A K⁺ csatornák *down-regulációja* a kálium áram csökkenését okozza, mely depolarizációhoz, végül a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornák nyitásához, így magas intracelluláris

kalcium szinthez és vazokonstrikcióhoz vezet. Egyes tanulmányok megerősítették ezt a felfedezést, hogy K^+ csatorna blokkoló szerek (aminorex, fenfluramine, dexfenfluramine) fokozták a PAH kialakulásának rizikóját [96]. Az említett, azóta forgalomból kivont, anorexigén hatású szerek kapcsán később azt is megállapították, hogy hatásukra a vérlemezkékből szerotonin szabadul fel, illetve gátolják a szerotonin endotél és vérlemezkék általi visszavételét. A szerotoninról pedig köztudott, hogy neurotranszmitter szerepén túl egy rendkívül potens vazokonstriktor monoamin, stimulálja a trombocita aggregációt és mitogén a SMC-ekre nézve. A fent említett megállapítást mintegy megerősíti, hogy a terhesség alatt szedett szelektív szerotonin visszavételt gátló (SSRI) szedése rizikófaktor az újszülöttek perzisztáló pulmonális hipertóniája kapcsán, mely megbetegedés ugyan nem tartozik a klasszikus értelemben vett PAH csoportba, viszont szintén PH-val járó megbetegedés [97, 98]. Az antinukleáris antitestek, a rheumatoid faktor, az immunglobulinok és a komplement depozitumok jelenléte a pulmonális erek falában, az emelkedett szérum pro-inflammatorikus citokinek, mint az interleukin-1 (IL-1) és interleukin-6 (IL-6), a valamint különböző kemokinek, mint a fraktalkin, vagy a monocita kemoattraktáns fehérje (MCP-1) emelkedett szintje (a PAH bizonyos formáiban) viszont az immunológiai mechanizmusok jelentőségét sugallják a PAH kialakulásához vezető folyamatokban [99, 100]. Szövettani képek alapján úgy tűnik, hogy a pulmonális endotél sejtek maguk is termelnek ilyen kemokineket, illetve az említett plexiform léziókban is gyakran találni dendritikus-, immunsejteket, makrofágokat, B és T limfocitákat [101, 102].

2.2.5. PAH gyógyszeres kezelése

Továbbra sem áll rendelkezésünkre kuratív terápia, így a farmakoterápia jelenlegi célja a tünetek mérséklése, a terhelési tolerancia, a hemodinamikai viszonyok és lehetőség szerint a klinikai kimenetel lassítása, vagyis jobb életkilátás és életminőség biztosítása. Az idiopátiás PAH terápiájában a jobb szívfél elégtelenség alapterápiája (pl. pozitív inotróp szerek, diuretikumok, oxigén) mellett antikoaguláns terápia javasolt, az *in situ* trombózis lehetősége miatt. Mivel a jobb szívfél működése *preload*-függő, kellő kritikával kell kezelni a túlzott vízhajtást, mivel további perctérfogat (CO) csökkenéshez vezethet. Autoimmun kórképhez kapcsolt PAH-os betegek terápiájában az antikoaguláns kezelést egyénileg kell megfontolni a beteg vérzéskockázatának felmérését követően (pl.: szisztémás sclerosis: reflux oesophagitis). Az SLE-hoz és a miozitiszhez ritkán társuló PAH javulhat immunszuppresszív kezelésre [103]. A vazodilatátor tesztre reszponder esetekben kalciumcsatorna-blokkoló adása javasolt, viszont sok esetben késői adásnál non-reszponzió tapasztalható. Csak abban az esetben tekinthetjük a

kezelés hatását reszpondernek, ha a klinikai és hemodinamikai paramétereket tekintve hónapok után is kedvező. Szakirodalmi adatok szerint csupán az idiopátiás PAH-os betegek mintegy 7%-a reszponder hosszútávon is, az autoimmun betegséghez társuló PAH-os betegek aránya ettől is alacsonyabb [104].

A fent említett kezelési formák inkább szupportív terápiának minősülnek, a szereket pedig nem specifikus szerekként kategorizáljuk PAH kezelésében. A specifikus gyógyszerek az említett vazodilatatív-vazokonstriktor egyensúlyban szerepet játszó jelátviteli útvonalakba igyekeznek beavatkozni, melyek közül jelenleg négy nagyobb csoportot különböztetünk meg (5. ábra):

- Prosztanoidok és IP receptor agonisták
- Endotelin receptor antagonisták (ERA)
- Szolubilis guanilat-cikláz (sGC) stimulálók
- Foszfodiészteráz 5 (PDE5) gátlók

Prosztanoidok és IP receptor agonisták

Az ide tartozó gyógyszerek a prosztanoidok, melyek valójában szintetikus prosztaciklin analógok, valamint az egyetlen nem-prosztanoid típusú, IP receptor agonista a *selexipag*. A PAH-os betegek károsodott prosztaciklin útvonalát próbálják helyreállítani azáltal, hogy pótolják a csökkent endogén prosztaciklin szintjét, így pótolják annak vazodilatatív, anti-proliferatív és anti-trombotikus hatását [105-107]. Az első prosztanoid, amelyet PAH kezelése kapcsán 1980-ban bevezettek a terápiába, az *epoprostenol* volt. Instabil molekula, intravénás formában érhető el, javítja a fizikai terhelhetőséget és a túlélést IPAH esetén [106, 108-110]. Az *iloprost* stabilitása már jobb szobahőmérsékleten, inhalációs és intravénás módon egyaránt adható, világszerte széleskörben elfogadott szer PAH terápiáját tekintve. Több PH csoportba tartozó betegnél is alkalmazzák, ahol a WHO funkcionális csoport III vagy IV [111]. A *treprostinil*nek még jobb a stabilitása, hosszabb a féléletideje, adható inhalálva, intravénásan, szubkután infúziós pumpa segítségével és orálisan egyaránt [112-114]. A *selexipag*, ahogy korábban említettük, egy „kakukktójs”, ugyanis IP receptor agonista, orálisan is adható, metabolitja is farmakológiailag aktív, 2015 december óta van forgalomban az USA-ban [115].

Endotelin receptor antagonisták (ERA)

A jelenleg elérhető ERA-kat két fő csoportra különítjük el:

- A) a nem-szelektív, kettős hatású, endotelin A és B receptorokon egyaránt ható szerek, ilyen a *bosentan* és a *macitentan*. A *bosentan* javítja a hemodinamikát és a terhelési toleranciát, késlelteti a progressziót az I-es csoportba tartozó PAH-os betegeknél. WHO II, III és IV-es funkcionális csoportban egyaránt ajánlott. Az újabban felfedezett *macitentan*ra jellemző a magas szöveti penetráció, valamint egy 3-as fázisú

gyógyszervizsgálatban megállapították, hogy csökkentette a morbiditást és mortalitást 1-es csoportba tartozó PAH-ban [116-118].

- B) Szelektív endotelin A receptor antagonisták, mint az *ambrisentan* és *sitaxentan*, mely utóbbi potenciálisan halálos májtoxicitása miatt visszavonásra került. Bár az *ambrisentan*, randomizált, placebo-kontrollált vizsgálatokban mérsékelt és súlyos állapotú idiopátiás és kötőszöveti betegséghez társuló PAH-ban hatásosnak bizonyult, nem váltotta be szelektivitásával a hozzáfűzött reményeket, klinikai gyakorlatok nem igazolták hatékonyságát a nem-szelektív szerekkel szemben [119-122].

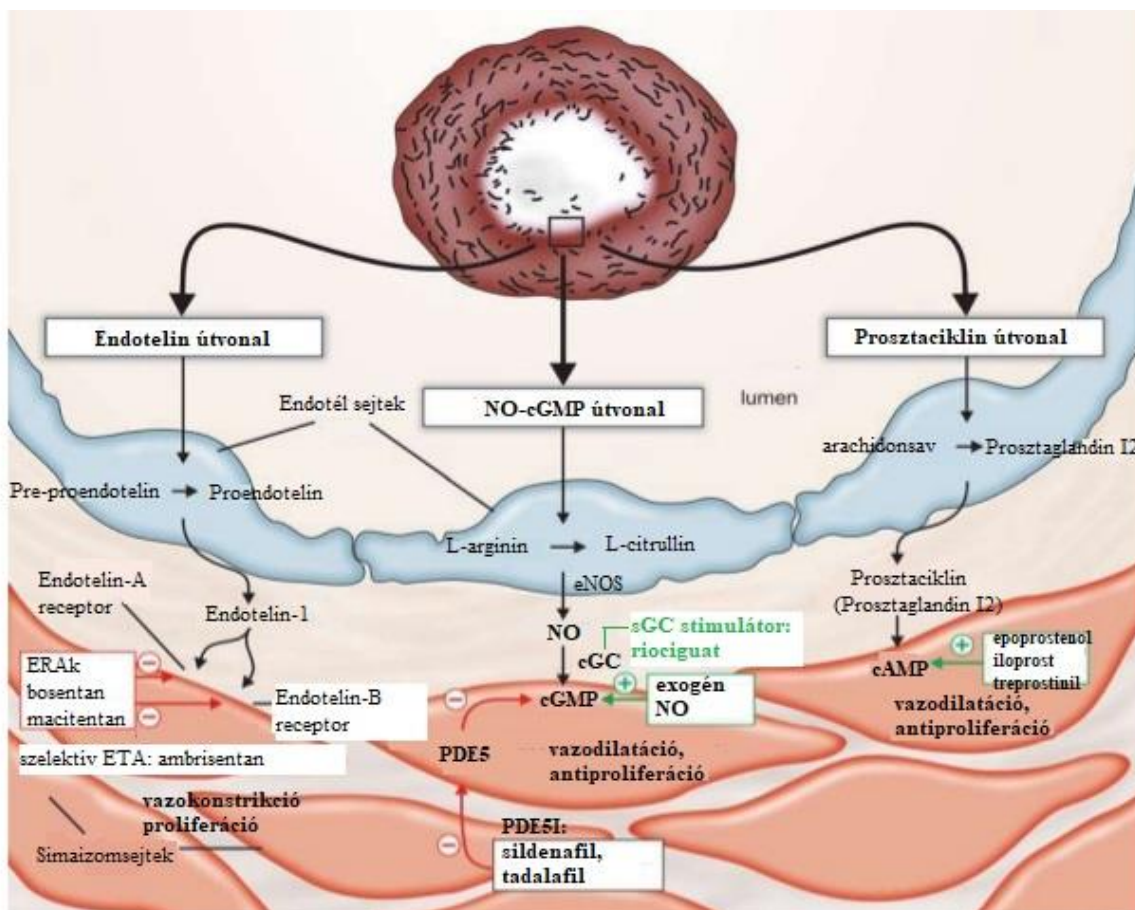
Szolubilis guanilát-cikláz (sGC) stimulálók

A sGC megtalálható a tüdőerek simaizomjában, a vérlemezkékben és a jobb kamrában is, mint intracelluláris enzim. Feladata jól ismert, NO hatására katalizálja a GTP cGMP-vé alakulását. A *riociguat*, az első és jelenleg egyetlen sGC stimulátor szer, melyet USA-ban 2013-ban törzskönyveztek, ma már Európa nagy részében is hivatalos, orálisan szedhető szer. Nitrátokkal és PDE gátlókkal kontraindikált az együttes adása, mivel ugyanazon a jelátviteli útvonalon keresztül hatnak, hatásuk összegződhet, súlyos szisztémás hipotenziót okozva a betegekben [115].

Foszfodiészteráz- 5 gátlók (PDE5I)

A PDE5I-k gátolják a cGMP lebomlását, ezáltal megnyújtják a NO közvetítette SMC-re gyakorolt vazodilatatív, anti-proliferatív hatást. Habár van olyan enzim, mely cAMP-t is és cGMP-t is bont, általában nagyobb affinitást mutatnak egyik, vagy másik irányba, az említett PDE5 is a cGMP irányába elkötelezett. A megnövekedett cGMP szint aktiválja a PKG fehérjét, mely foszforilálja a foszfolambánt (PLB), megszüntetve a szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum Ca-ATP-áz (SERCA) gátlását, melynek felszabadulásával megindul a Ca^{2+} -influx, csökken az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, elmarad az aktin-miozin komplex kialakulása, vagyis vazorelaxáció alakul ki. Az első PDE5I a *sildenafil* volt, amely kezdetben az erektilis diszfunkció kezelésére lett törzskönyveztve, majd számos sikeres klinikai vizsgálat hatására 2005-ben először az FDA majd az EMA is engedélyezte PAH indikációjában. Hatására a WHO funkcionális státusz is perzisztens javulást mutatott, a becsült 3 éves túlélés 79%-nak bizonyult, viszont egyéb típusú pulmonális hipertóniákban a sildenafil hatása egyelőre bizonytalan. A később kifejlesztett *tadalafil* szintén világszerte törzskönyvezték PAH indikációval is, valamint a *vardenafil*-ről is kimutatták, hogy placebo kontrollált, randomizált vizsgálatban javította a keringési perctérfogatot, csökkentette a pulmonális artériás nyomást, a pulmonális vaszkuláris rezisztenciát és a klinikai progresszió eseteit [123-125].

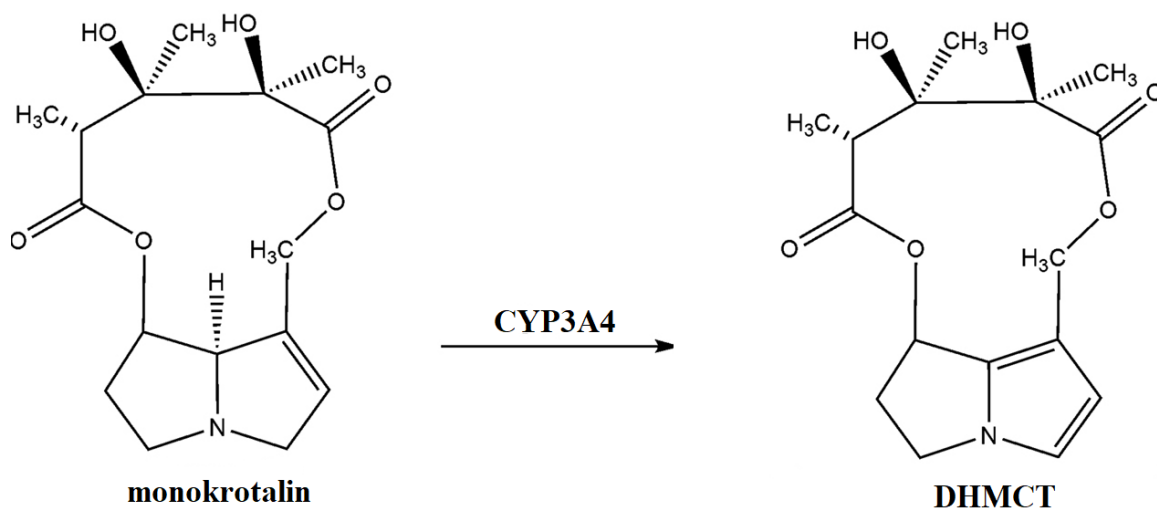
Az összes kezelési stratégia összevont hatásait tekintve egy tanulmány azt állapította meg, hogy összességében 39%-kal (2%-62%, $P=0,041$) csökkentették a halálozási arányt az összhalálozási arányhoz képest[126]. Ennek ellenére a vazodilatátor kezelés hatása a hosszútávú túlélésre PAH-ban kérdéses. Tehát elmondhatjuk, hogy továbbra is fennáll az igény egy újabb, hatékonyabb, esetleg összetettebb módon ható terápia kifejlesztésére.



5. ábra: A PAH patobiológiájában szerepet játszó főbb útvonalak és specifikus gyógyszereik (módosított forrás: [127])

2.2.6. Monokrotalin indukálta PAH modell

A monokrotalin-indukált PAH az egyik leggyakrabban alkalmazott állatmodell a témában, a betegség kezelésében elérhető gyógyszerek jelentős részét szintén tesztelték ezen a modellen, a humán vizsgálatokat megelőzően [128-130]. Maga a modell egy egyszerű, olcsó, könnyen kivitelezhető és rutinszerűen alkalmazott módszer a tüdő keringésére potenciális hatással bíró gyógyszer jelöltek, hatóanyagok tesztelésére. A monokrotalin a *Crotalaria spectabilis* növény magjából származó alkaloid, mely egy mérgező 11-szénatomos makrociklikus pirrolizidin származék. A hatóanyag önmagában egy prodrug, a májban lévő CYP3A4 enzim által végrehajtott oxidáció hatására válik aktív metabolittá, dehidromonokrotalinná (6. ábra). Az aktív metabolit hatására a pneumocitákban és a pulmonális endotél sejtekben megalocitózis jön létre, megnagyobbodik a Golgi-apparátus. Ennek hatására kompenzatórikus proliferációs és anti-apoptotikus útvonalak aktiválódnak, továbbá beindul a kaszpáz-3 útvonal is. A pulmonális vaszkuláris remodelling, valamint az emelkedett pulmonális artériás nyomás már 22 nappal az akut, szubkután beadott dózist követően detektálható patkányban [131]. Érdemes megjegyezni, hogy mivel a CYP3A4-re fajon belül is jellemző az interindividuális variabilitás, így az általa végzett hepatikus metabolizmus mértéke, tehát a monokrotalinra adott válasz nem csak fajonként, hanem egyedenként is eltérhet [80]. Jelentős különbség az MCT- indukálta PAH modell és a humán megbetegedések képe között, hogy míg a monokrotalin hatására a pulmonális artériák mediájának hipertrófiája figyelhető meg (lásd később, 10. ábra), addig a másik esetben endotel mediálta angio-obliteráció jellemző. Egyes kutatók a pulmonális vénák okklúzióját is kimutatták, továbbá a vaszkuláris elváltozások mellett perivaszkuláris ödémát, az alveoláris szeptum kiszélesedését, valamint az I-es típusú pneumociták degenerációját [132]. Jobb kamra (JK) hipertrófia és diszfunkció alakul ki relatíve gyorsan a kezelést követően, mely tünetek fontos faktorai a súlyos humán PH-nak [133]. Másrésztől későbbi kutatások jelentős máj-és vesekárosodást írtak le, pontosabban hepatikus veno-okklúziót, mely jelenség pedig egyértelműen nem asszociálható a humán PAH megbetegedéshez [132].



6. ábra: A monokrotalin aktív metabolittá, a dehidromonokrotalinná (DHMCT) alakulása a májban (módosított forrás: [134])

Összességében elmondhatjuk, hogy bár a MCT egzakt toxikológiai mechanizmusa továbbra sem tisztázott, valamint jelentős eltérések tapasztalhatóak az általa indukált kórállapot valamint a humán esetek között, mégis a modell gyulladásos kontextusában informatív, segítséget nyújthat a tüdőkárosodás és krónikus gyulladás szerepének felderítésében, pulmonális vaszkuláris megbetegedésekben [132, 135].

2.3. Az *Allium ursinum* jellemzése

Az Amaryllidaceae családba tartozó - hétköznapi nevén medvehagyma, latinul - *Allium ursinum* egyszikű, évelő növény, mely tőkonyácon álló, hófehér álernyős virágzattal rendelkezik. Jellemzően közép-európai elterjedésű faj, így hazánkban is nagy számban előfordul, főleg a nedves, árnyas erdőkben érzi jól magát, az enyhén savas talajt kedveli. Ember által fogyasztható, tavasszal gyűjthető, viszont gyakorta fordul elő mérgezéses eset, mert könnyen összetéveszthető a szintén májusban virágzó, hasonló területeket kedvelő gyöngyvirággal (*Convallaria majalis*), melynek convallatoxin nevű szívglikozidjai felelősek a nemkívánt hatásért. Ugyancsak gyakran összetévesztik az őszi kikericcsel is, hasonló küllemű levelei miatt, mely kolhicin tartalmánál fogva szintén toxikus hatásokkal rendelkezik [136-138]. Ismerős szagát kéntartalmú összetevőinek köszönheti, melyek kemotaxonómiai szempontból kiemelkedő jelentőségűek. Nagy mennyiségben tartalmaz S-alkil-L-cisztein-szulfoxidokat, amelyek illékony di-, tri-, és poliszulfidokká és tioszulfidokká hidroxilálódnak, létrehozván a növény karakterisztikus szagát és ízét [139]. A medvehagyma levelében és hagymájában

egyaránt jelentős mértékű antioxidáns hatással rendelkező polifenol származékokat, valamint szteroid szaponinokat is azonosítottak, illetve igazolták azok antimikrobiális, antifungális hatásait [140-145]. Érdekesség, hogy szignifikánsan magasabb ajoén és hússzoros mennyiségű adenozin koncentrációt mértek *Allium ursinum*ból, az *Allium sativum*hoz képest. Mindkét molekuláról ismert, hogy stabilizálják a vérnyomást, csökkentik a vérlemezke aggregációt, továbbá fokozzák a fiziológiás kontrollt a koleszterin metabolizmus fellett [146]. Valószínűleg a két növény kémiai összetételének összevetése során felmerült a hatásuk közötti különbségek vizsgálata is. Spontán hipertenzív (Okamoto törzs) patkányokban, azonos koncentrációban történő kezelést követően a medvehagyma szignifikánsan nagyobb vérnyomáscsökkenést, totál koleszterin csökkenést és HDL növekedést produkált [147]. A vérnyomáscsökkentő hatás nagy valószínűséggel összefüggésbe hozható a növény ACE-gátló (ACEI) tulajdonságával, ugyanis egy későbbi tanulmányban igazolták, hogy a medvehagyma-kezelést kapott patkányokban szignifikánsan alacsonyabb ACE aktivitást tapasztaltak [148]. Ezt a megállapítást *in vitro* tesztek is megerősítették, ahol a medvehagyma levelének vizes extraktuma jelentősen nagyobb ACEI aktivitást mutatott, mint a fokhagymáé. Szintén ebben a vizsgálatban kimutatták, hogy a fokhagyma 5-lipooxigenáz- (5-LO) és ciklooxygenáz-gátló tulajdonsága, ha kismértékben is, de erősebb, viszont vérlemezke aggregációt gátló tulajdonságuk között nem tapasztaltak szignifikáns különbséget [146]. Az antioxidáns és ACEI kapacitásával magyarázzák egy későbbi tanulmányban a medvehagyma iszkémia/reperfúziós károsodásokkal szemben kifejtett protektív hatását is [149]. Kutatásunk szempontjából érdemes azt is megjegyezni, hogy *in vitro* körülmények között módosított máj homogenizátumon vizsgálták a medvehagyma extraktum koleszterinszintézist gátló hatását, amely hasonlóan erélyesnek bizonyult, mint a fokhagymáé, mely hatásért a tiosulfátokat, ajoéneket és ditiéneket teszik felelőssé [150]. Fontos azt is megemlíteni, hogy az *Allium* nemzetség két tagjáról, az *Allium chienese*-ről és az *Allium cepa*-ról is PDE-gátló hatást igazoltak *in vitro*, mely hatásért szteroid szaponin tartalmukat teszik felelőssé [151, 152]. Érdekes felvetés tehát az *Allium ursinum* PDE-gátló hatásának vizsgálata, ugyanis a növény szintén szintetizál szteroid szaponinokat, ráadásul jelentős mennyiségben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Etikai irányelvek

Vizsgálataink során az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény és ennek végrehajtása tárgyában megjelent országos 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet, valamint az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve („on the protection of animals used for scientific purposes”) alapján jártunk el. A kísérletek elvégzését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével végeztük.

3.2. Kísérleti elrendezés

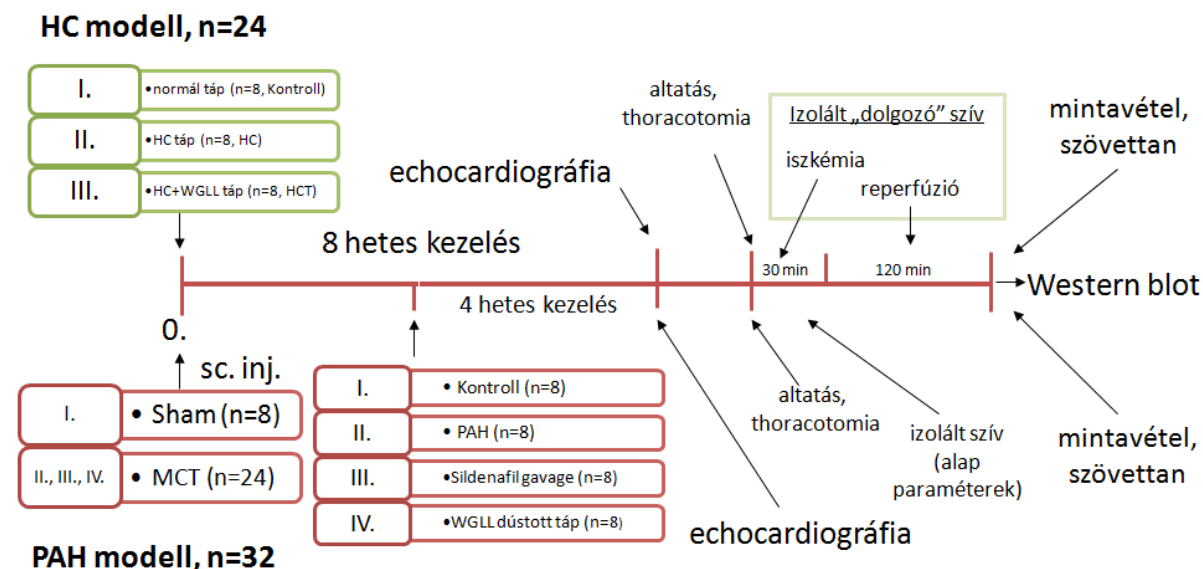
3.2.1. Hiperkoleszterinémias nyúl modell (HC modell)

Vizsgálatainkban a felnőtt, hím, 2,5-3 kg testsúlyú, New Zealand nyulakat 3 csoportra osztottuk (n=8). A kísérlet megkezdését az állatok megérkezését követő, 2 hetes adaptációs időszak előzte meg. Az első (Kontroll) csoportban az állatok normál, koleszterinmentes tápot fogyasztottak; a második, hiperkoleszterinémias csoport (HC) 2%-os koleszterinnel (Sigma-Aldrich) dúsított tápot (Gödöllő Ltd., Budapest, Magyarország); míg a harmadik csoport további 2 m/m% medvehagyma liofilizátummal dúsított, koleszterindús tápot kapott (WGLL) 8 héten keresztül [27, 149]. A medvehagymával dúsított táp előállítása a Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Karának, Gyógyszertechnológiai Tanszékének kísérleti üzemében történt (7. ábra).

3.2.2. Pulmonális artériás hipertenzív patkány modell (PAH modell)

A kísérletben ivarérett, hím Sprague Dawley patkányokat (Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, MA, USA) random módon négy csoportra osztottuk (n=8): Normál rágsálótáppal etetett, egészséges patkányok (Kontroll); normál táppal etetett, monokrotalin-kezelt (Sigma-Aldrich Co., LLC) állatok (PAH); 2 m/m% *Allium ursinum* liofilizátummal dúsított tápon tartott, monokrotalin-kezelt állatok (WGLL); normál táppal etetett és napi 25 mg/ttkg orális sildenafil (Sigma-Aldrich Co., LLC), valamint monokrotalin kezelésben részesült állatok (Sildenafil)[153]. A PAH-t egyetlen dózis monokrotalin-oldattal (DMSO puffer, Sigma-Aldrich Co. LLC) idéztük elő (60 mg/ttkg *subcutan*, az interscapuláris régióba) mindhárom beteg csoportban, a Kontroll csoport vivőanyagot kapott, az állatok terápiás kezelése 4 héttel a subcutan injekciózás után kezdődött [154]. Az összesen 8 hetes

kezelés során a medvehagyma liofilizátummal dúsított és a normál tápot is *ad libitum* vehették magukhoz az állatok. A sildenafil szuszpenzió adagolása orogasztrikus szondával történt, a szuszpenzió vivőanyagával a sildenafil-lal nem kezelt csoportok is szondázva voltak teljesen azonos módon (7. ábra).



7. ábra. Vázlatos kísérleti elrendezés

3.3. Minta liofilizálása és bioanalitika

A gyorsfagyasztott *Allium ursinum* levelek (Toltelekgyar Kft., Zalakomár, Magyarország) az előre lehűtött Christ Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Németország) fagyasztva szárítóba kerültek, a készülék lezárását vákuumozás követte. A fagyasztva szárítás 0,120 millibar (mb) környezeti nyomású vákuumtérben, -50 °C-os kondenzátor hőmérsékleten és 35 °C saját hőmérsékleten zajlott, 24 órán keresztül. A fagyasztott levél, valamint a friss és a szárított növényi anyag aránya 5:6:1 volt [155].

3.3.1. HPLC

A HPLC analízis Waters 600 rendszeren történt (Waters Corporation, Milford, CT, USA). A rendszer összetevői: Waters M-600 gradiens pumpa, Waters M-2998 fotodiódasoros detektor, on-line gáztalanító és automatikus mintavevő, fordított fázisú Phenomenex Synergi 4 µm Hydro-RP 80Å (250 mm x 4.6 mm) kolonna (Phenomenex, Torrance, CA, USA). 25 °C-os kolonna hőmérséklet mellett a grádienselúció az alábbiak szerint zajlott: 0-15. perc: 100% „A” mozgófázis (víz + 0,1% foszforsav); 15-20. perc: a „B” mozgófázis (acetonnirtil) aránya fokozatosan 100%-ra emelkedett; 20-25. perc: állandó 100%-os „B” mozgófázis; 25-27. perc:

„A” fázis fokozatosan 100%-ra emelkedett; 27-45. perc: 100% „A” fázis. Az áramlási sebesség 0,75 ml/perc volt, az alliin detektálása 204 nm-en, 4,6 percnél történt. Az adatgyűjtés és értékelés Empower pro software (Milford, USA) segítségével történt. A kromatográfiás eljáráshoz használt acetonitril a Merck Kft-től (Darmstadt, Németország); alliin standard az LCG Standards vállalatától (Teddington, UK) került beszerzésre, valamint a mérésekhez használt víz tisztítása Millipore Direct-Q UV3 (Molsheim, France) tisztító berendezés segítségével történt. Az alliin standard törzsoldata metanollal készült, 4 °C-on volt tárolva. A kalibrációs tartomány 0,5/5 µg alliin/befecskendezés volt. Az alliin injektálása hat különböző térfogatban, hármas ismétlésszámban történt. Az alliin extrahálása 1 gramm liofilizátumból, 10 ml metanollal, szobahőmérsékleten, ultrahangos fürdőben történt, 3 percig. A membránszűrést (Acrodisc® GHP 13 mm, 0.45 µm, Waters Corporation, Milford, CT, USA) követően nyert 3 különböző minta hármas ismétlésszámmal volt vizsgálva [156].

3.3.2. MALDI-TOF MS

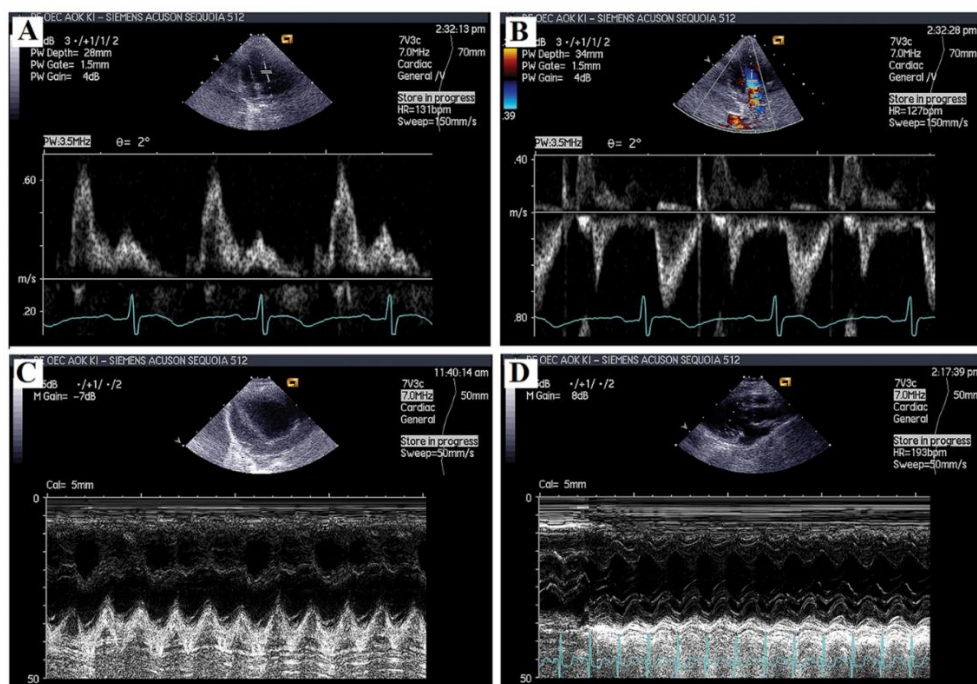
A liofilizátum összetételének MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálata egy 337 nm nitrogén lézerrel rendelkező Burken Biflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Németország) tömegspektrométeren történt, késleltetett extrakció és iontükör („reflectron” mód) alkalmazásával, pozitív ionizációs módban. A spektrumok felvétele 19 kV gyorsító- és 20 kV reflektorfeszültségen, 3 ns késleltetési idővel (kb.: 100 lézerimpulzus) és m/z : 995,31; 1157,36; 1319,41 Da tömegtartományban történt. A spektrumot 10 µl etanol:víz=1:1 elegyében oldott 2,5-DHB mátrix telített acetonitriles oldatával és 10 µl vízben oldott minta keverékéből nyertük, mely elegyből 0,5 µl-nyi mennyiség lett a mintatartó felületén szobahőmérsékleten megszárítva. A vegyületek azonosítása alapjául $[M+H]^+$ és a $[M+Na]^+$ fragmentációja által kapott csúcsokat vettük alapul. A MALDI-TOF MS eljárás limitációja, hogy nem képes a különböző konfigurációjú cukrok elkülönítésére (pl. glükóz vs. galaktóz), sem a cukor flavonoid aglikonra való kapcsolódási pontjának meghatározására, ezért valójában csupán hozzávetőleges azonosításra (putative identification, tentative identification) alkalmas. A számítások a Metabolomics Workbench Data adatbázisán alapultak [157, 158].

3.4. Transztorakális echokardiográfia

Az echokardiográfiás méréseket enyhe anesztézia alatt (nyúl, patkány: i.m. ketamin: 15 mg/ttkg, xylazin: 3 mg/ttkg;) a nyolcadik héten végeztük, mindkét kísérlet során. Az állatokat dorzális fekvő helyzetbe pozicionáltuk, a mellkasi régiót szőrtelenítettük. A képalkotó

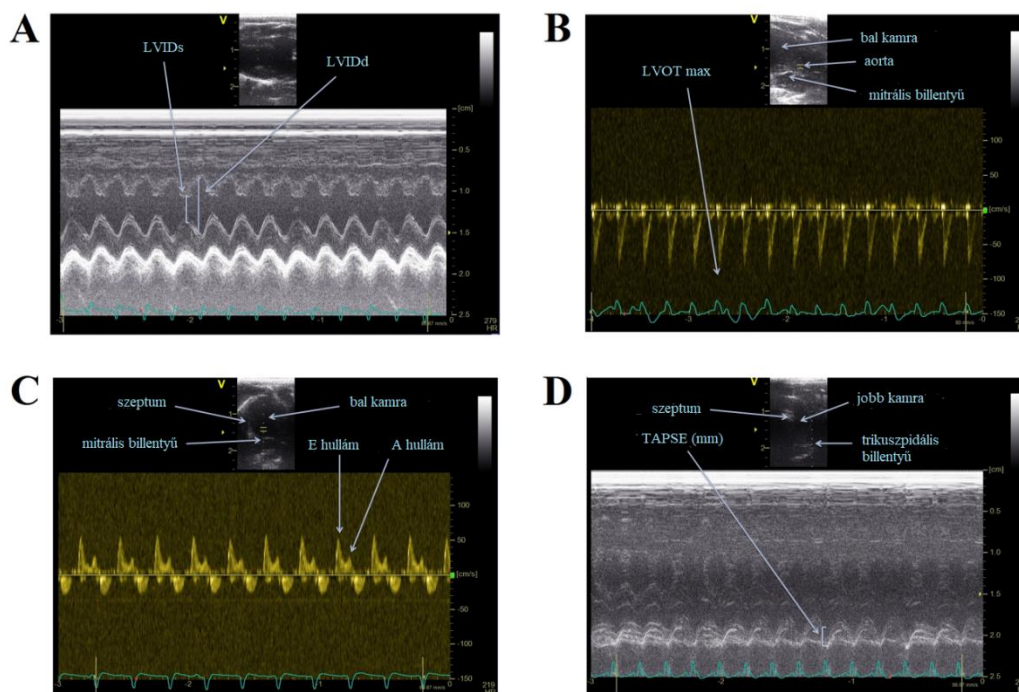
eljáráshoz az ateroszklerózis nyúl modell esetében Siemens Acuson 512 ultrahangot alkalmaztunk, 7 MHz-es 7V3c transzducerrel ellátva (8. ábra), a PAH patkánymodell esetében egy Vivid E9 echokardiográfot (GE Healthcare Inc.) használtunk rágcsálókra kifejlesztett transzducerrel (9. ábra). A vizsgálatokat digitális formában rögzítettük, későbbi időpontban kiértékeljük, mindegyik állatnál a vizsgált paraméterről származó adatot 5 egymás követő szív ciklus méréseinek számtani átlagolásával kaptuk meg.

Az ultrahangos vizsgálat során a humán vizsgálatoknak megfelelő standard metszeteket, véráram- és szöveti Doppler görbéket rögzítettük. Az eljárás során alkalmazott protokoll a következő volt: 2D paraszternális hossz tengelyi metszet (PLAX), 2D paraszternális rövidtengelyi metszet a papilláris izmok magasságában (SAX), bal kamra beáramlási pálya spektrális pulzatilis Doppler görbe, és mitrális annulus spektrális szöveti Doppler görbe, apikális metszetekből. Mértük a mitrális billentyű laterális annulusának sebességét szisztolében (lat S'), a bal kamrai beáramlás korai (E) és pitvari komponens (A) csúcssebességét, mely értékekből E/A arányt származtattunk. M-mode felvételből mértük a tricuspidális annulus síkjának szisztolés elmozdulását (TAPSE). Szintén M-mode felvételből mértük a bal kamra végszisztolés (LVESD) és végdiasztolés (LVEDD) átmérőit. A fenti adatokból számoltuk a frakcionált rövidülést (fractional shortening, FS) és a bal kamrai ejekciós frakciót (EF) az alábbi képletek segítségével: $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD * 100$; $EF = (LVEDD^2 - LVESD^2) / LVEDD^2 * 100$ [27, 159].



8. ábra: Reprezentatív kép TTE vizsgálatról nyúl modellen. A) Doppler felvétel, mitrális beáramlási sebesség; B) színes Doppler kép, bal kamrai csúcs kiáramlási sebesség; C) M-mód felvétel, jobb kamrai TAPSE;

tricuspidal annular plane systolic excursion= trikuszipidális annulus síkirányú szisztolés kitérése; D) M-mód felvétel, paraszternális hosszú tengelyi kép (PLAX) a bal kamráról. (Forrás: saját felvétel, Siemens Acuson 512 ultrahang készülékkel végezve; [160])



9. *ábra*: TTE reprezentatív felvételek patkány modellen. A) M-mód felvétel a bal kamráról; B) Pulsed-Wave (PW) Doppler mód, bal kamra kiáramlási sebességről; C) PW (Doppler) mód, mitrális beáramlási sebesség; D) M-mód, jobb kamra felvétel. Rövidítések: LVIDs: left ventricular internal diameter in systole= bal kamrai belső átmérő szisztolében; LVIDd: left ventricular internal diameter in diastole= bal kamrai belső átmérő diasztolében; LVOT max: maximal velocity of left ventricle outflow tract= bal kamra maximális kiáramlási sebessége; E hullám: korai mitrális telődési csúcssebesség; A hullám: késői (pitvari) mitrális telődési csúcssebesség; TAPSE: tricuspidal annular plane systolic excursion= trikuszipidális annulus síkirányú szisztolés kitérése. (Forrás: saját felvétel, Vivid E9 ultrahang készülékkel végezve (GE Healthcare, Little Chalfont, UK, [161])

3.5. Szérum paraméterek mérése

A 8. hét eltelte után a fülvenából nyert vért EDTA-K2 (BD Vacutainer, USA) 3 ml-es csövekbe gyűjtöttük és elemzésre küldtük (Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Laboratóriumi Medicina Intézet), ahol a következő paraméterek kerültek meghatározásra: apolipoprotein A-I (ApoA), apolipoprotein B (ApoB), alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL), magas sűrűségű lipoprotein (HDL), totál koleszterin (TC), triglicerid (TG), C reaktív fehérje (CRP), laktát-

dehidrogenáz (LDH), kreatin-kináz (CK) valamint glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) vagy másnéven aszpartát-aminotranszferáz (AST).

3.6. Izolált „dolgozó- szív”

A két kísérletben külön patkány-, illetve nyúl modellre kialakított apparátuson végeztük a szívfunkciós vizsgálatokat. A perfúziót megelőző műtét procedúrája hasonlóképpen zajlott, mely során a 8 hetes kezelés leteltével intravénás heparinnal történő antikoaguláció (1000 IU/kg) és intramuszkuláris ketamin/xylazin, 40/5 mg/kg (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Magyarország/ Nerfazin, Alpha-Vet, Magyarország) injekciót követően bilaterális thoracotomiát végeztünk az állatokon. A kimetszett szíveket jéghideg perfúziós oldatba helyeztük (4°C). A perfúziós oldat módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferoldat (pH=7,4) volt, melynek összetétele a következő: 118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,7 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₃; 0,36 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄, 10 mM glükóz. A perfúziós oldatot előzőleg karbogen gázzal telítettük, mely 95% O₂ és 5% CO₂ keveréke, megelőzve ezzel a CaCO₃ csapadék precipitációját.

Ezt követően az aortán keresztül kanüláltuk a szíveket és 10 percig retrográd perfundáltattuk módosított Krebs-Henseleit oldattal, nem dolgozó „Langendorff-módban”, ez idő alatt eltávolítottuk a vért, és a szív adaptálódott a megváltozott körülményekhez. A mosási periódus alatt kanüláltuk a pulmonális vénát, majd átkapcsoltuk a készüléket „dolgozó” módba: elzártuk a retrográd áramlást és a *vena pulmonalis* felől, anterográd irányba perfundáltattuk a szíveket. A megváltozott áramlás hatására az oldat egy része, egy, az áramlás mérésére alkalmas csőrendszerbe, másik része a koronáriákon keresztül a *sinus coronariusba*, majd a jobb pitvarból a jobb kamrába, innen a felvágott pulmonális artérián keresztül a szív alatt elhelyezett üvegtégelybe került - koronária átáramlás. A fent leírt rendszerben a bal pitvari nyomást (bal kamrai preload/előterhelés) 17 cm puffer oldat nyomására (1.7 KPa), az aorta nyomást (bal kamrai afterload/utóterhelés) 90 cm puffer oldat nyomásra (9 KPa) állítottuk be. Az aorta kiáramlást (AF) és a koronária átáramlás (CF) mértékét a szív által kipumpált, illetve a koronáriákról távozó folyadék 1 percig történő gyűjtésével mértük. A bal kamrai nyomást (AoP), az ebből kalkulált szívfrekvenciát (HR) a készülékhez kapcsolt kalibrált nyomásmérő és számítógépes rendszer segítségével határoztuk meg (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia). A perctérfogatot (CO) az AF és CF összegeként fejeztük ki, míg a verőtérfogatot (SV) a CO és a HR hányadosaként számszerűsítettük. Mindkét vizsgálat során az adaptációs idő leteltével, azaz 10 perc dolgozó mód után történt az alapértékek lemérése. A PAH vizsgálati

protokollban ezt követően a szíveket eltávolítottuk a rendszerről és további vizsgálatok elvégzéséhez készítettük elő a miokardiumot. Az ateroszklerotikus nyúl modell protokollja szerint, az aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, így globál iszkémiát hoztunk létre 30 percen keresztül. A perfúzió újraindításához megszüntettük az elzárásokat, ám a reperfúzió első 10 percében Langedorff perfúziót indítottuk, hogy elkerüljük a fatális kimenetelű kamrai fibrillációkat, ezt követően „dolgozó” módon perfundáltattuk a szíveket 110 percig, mely 50. és 110. percében (a teljes reperfúzió tekintetében 60. illetve 120. perc) a korábban felsorolt szívfunkciós adatok rögzítése történt. A reperfúzió lejártát követően, a miokardiumok előkészítése és tárolása hasonlóképpen zajlott a PAH protokollhoz [162, 163].

3.7. Szövettan

3.7.1. Ateroszklerotikus léziók analízise HC modellben

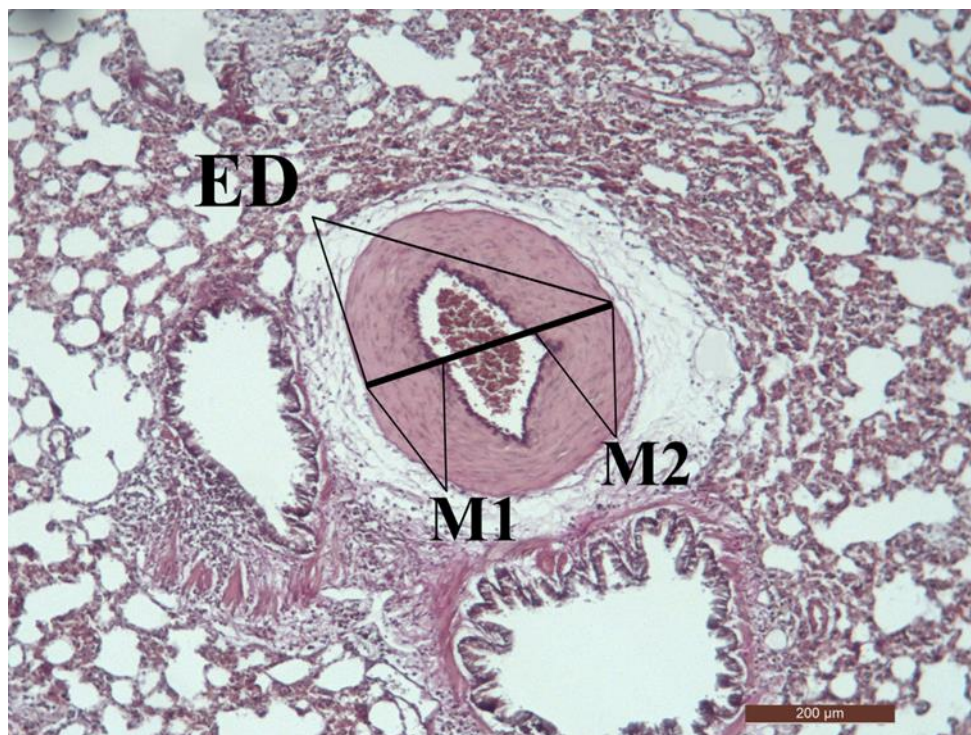
Az ateroszklerotikus plakkok területének kvantifikálására Oil Red O (ORO, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) festést alkalmaztunk [164]. A korábban preparált torakális aortákat OTC médiumba (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ágyaztuk. Kriosztát segítségével, 6 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket Superfrost Plus tárgylemezre helyeztünk (Daiggers, Vernon Hills, IL, USA). Az ateroszklerotikus elváltozást az aortaív (*arcus aortae*) területéről vett mintákból vizsgáltuk, melyeket három, egymástól 120 µm-es távolságra lévő területről metszettünk, négy-öt metszetet készítve mindhárom területről. Korábbi publikáció alapján a megfestődött plakkok területét mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország) és szoftveres morfometriával (Scion Corp., Torrance, CA, USA), a plakk/teljes terület hányadosával határoztuk meg. A szintén rutineljárasnak számító hematoxilin festéssel emeltük ki a sejtmagokat [165].

3.7.2. A szívizom és tüdő minták szövettani és morfometriai analízise PAH modellben

Az izolált dolgozó szív perfúzióját követően a szíveket transzverzális síkban, az apiko-bazális tengellyel párhuzamosan, az apextől számítva, kb. a szív mértani felénél elmetsettük, majd 24 órára 4 %-os pufferelt formalin oldatban, majd 70%-os alkoholban fixáltuk (pH=7.4), ezt követően paraffinba ágyaztuk. A paraffinos metszetekből 7 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd hematoxilin-eozin (HE) festést alkalmaztunk a szöveti struktúrák vizualizálására [166]. A jobb kamrai hipertrófiát (right ventricular hypertrophy; RVH) a szív teljes transzverzális metszetéből határoztuk meg, mely mértékét a jobb kamra/(bal kamra +

interventrikuláris szeptum (IVS)) arány segítségével határoztuk meg ($RHV = RV/(LV + IVS)$) [167].

A kimetszett tüdő részleteket szintén 4%-os formalinban fixáltuk, majd a paraffinba ágyazott mintákból rotátoros mikrotommal 5 μm vékony metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxin-eozin (HE) illetve Elastica van Gieson (EVG) néven ismert eljárások segítségével festettük [168]. A tüdő arteriálák falának megvastagodásának mértékét $\% MWT = (M1 + M2)/ED \times 100$ képlet segítségével határoztuk meg, amely lényege a következő: az állatok tüdő artériáiról készített metszetek digitális felvételein Scion Image (Scion Corporation / NIH / Bethesda ML, USA) szoftver segítségével mértük le a falvastagságot és a lumen átmérőt (10. ábra). Az így kapott értékeket egymással elosztva kaptuk a fal/lumen arányt, amelyet %-ban fejeztünk ki, ezáltal összehasonlítva az egyes csoportok között kapott értékek átlagát ($n=6$)[169].



10. ábra: Pulmonális artériák morфомetriai analízise patkány modellen, Elastica van Gieson festés, 100 x nagyítás (ED: external diameter; külső átmérője a tüdőartériának; M1 és M2: mediális fal vastagsága; forrás: saját felvétel).

3.8. Fehérje izolálás miokardiumból, illetve tüdőszövetből

A szív perfúziót, illetve a tüdőminták esetében közvetlenül a torakotómiát követően folyékony nitrogénben ($-196^{\circ}C$) lefagyasztottunk külön a bal kamrából és a szeptumból, külön a jobb kamrából, valamint a tüdőből vett mintákat, majd azokat $-70^{\circ}C$ -on tároltuk. A fehérjék

izolálásához mintánként 300 mg-ot elektromos diszpergáló eszköz segítségével (T 10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) az alábbi pufferben homogenizáltuk: Tris (25 mM), NaCl (25 mM), Na-ortovanadát (1 mM), NaF (10 mM), Na-pirofoszfát (10 mM), okadánsav (10 nM), EDTA (0,5 mM), PMSF (1 mM), proteáz inhibitor koktél, desztillált víz. A teljes fehérje koncentrációt a BCA-módszer segítségével határoztuk meg [170].

3.9. Western blot

A Laemmli pufferben oldott izolátumokat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtatuk 120 V feszültségen 90 percig, majd a géleket nitrocellulóz membránra *blottoltuk* további 90 percig, 100 V-on. A membránokat ezt követően 2 órán át blokkoltuk 5%-os alacsony zsírtartalmú tejporos TBS-T pufferben, majd a megfelelően kihígított antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A TBS-T puffer összetétele a következő volt: Tris(hidroximetil)-aminometán sósavval alkotott sója (Tris-HCl) (50 mM, pH=7,4), NaCl (150 mM) és Tween®-20 (0,05 %V/V). Az alábbi fehérjék expressziójának szintjét vizsgáltuk: hemoxigenáz-1 (HO-1; 1:1000 hígítási arányban), szuperoxid dizmutáz 1 (SOD1; 1:1000), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGF; 1:2000), citokróm c oxidáz III (COXIII; 1:1000), foszfodiészteráz-5A (PDE5A; 1:500), valamint konstitutív („háztartási”) génként: citokróm c oxidáz IV (COXIV; 1:2000), glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH; 1:5000). Másnap TBS-T pufferrel öblítettük le a primer antitesteket, majd további 90 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten kecske anti-nyúl HRP-konjugált (1:2000 hígítási arányban) másodlagos antitestet tartalmazó 1%-os alacsony zsírtartalmú tejporos TBS-T pufferoldatban. Újabb mosást követően az antigén-antitest komplex jelenlétét ECL (enhanced chemiluminescence) módszer segítségével tettük láthatóvá. Az előhívás röntgenfilmekre történt, majd a szkennelt képeken az immunpozitivitás pixeldenzitását Scion Image szoftver segítségével számszerűsítettük [170].

3.10. Statisztikai analízis

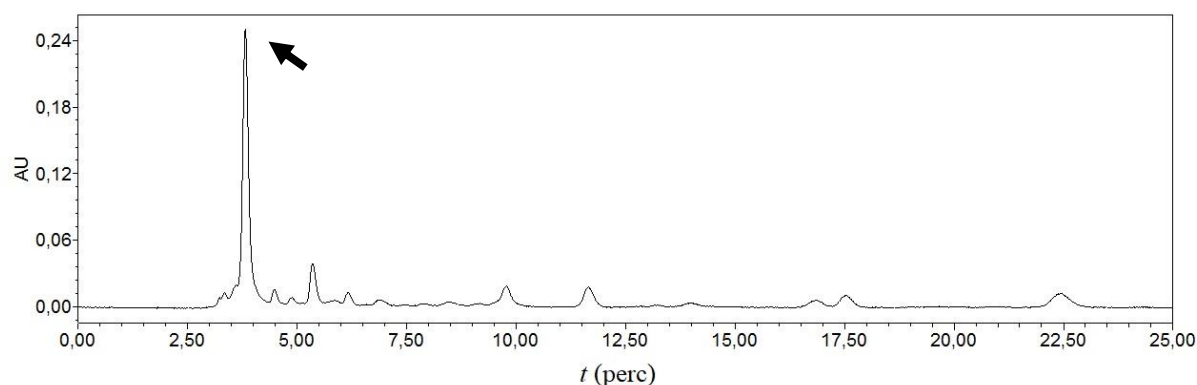
A kapott számadatok kielemezéséhez Graph Pad Prism 5.02 (Praph Pad Software Inc., USA) programot alkalmazva, a normál eloszlás vizsgálatát pedig D’Agostino-Pearson omnibus normalitás-teszttel végeztük el. Amennyiben normál eloszlásúnak bizonyultak a vizsgált értékek, egyutas ANOVA tesztet használtunk *posthoc* Bonferroni analízissel. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. Bioanalitika

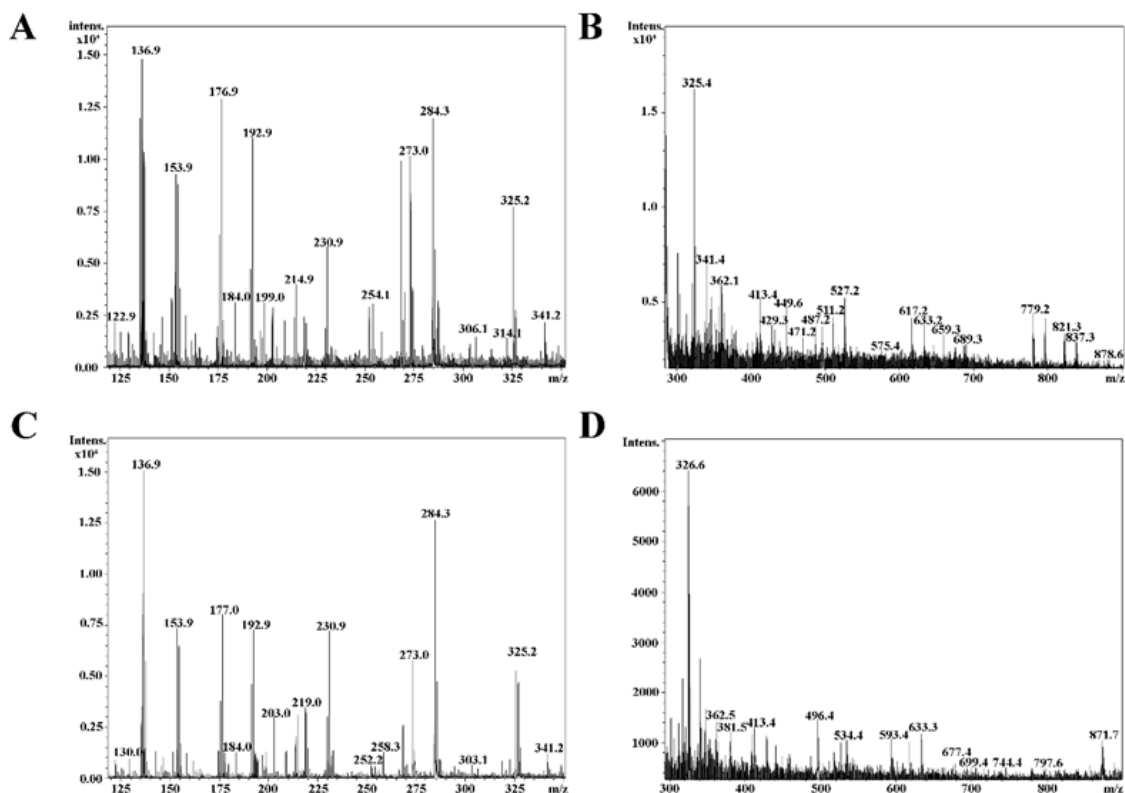
4.1.1. A minta tömegspektrometriai (MS) és HPLC vizsgálata

Az alliin a legtöbb *Allium* fajban előforduló, nem fehérje-természetű aminosav, mely az allináz enzim természetes szubsztrátja. A liofilizátum teljes alliin tartalmát HPLC segítségével határoztuk meg, mely szerint a levél alliin tartalma 0,261 m/m% (RSD=0,450%). A kísérlet során vizsgált anyag meghatározásához segített a már ismert, standard alliin csúcsaival való összevethetőség (11. ábra)



11. ábra: A medvehagyma levél liofilizátumának (WGLL) nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) spektrum analízise, 3,8 percnél megjelenő fő csúccsal (társszerző eredményei).

A tömegspektrometriai eljárás során a kálium és nátrium által kationizált kvázi molekula ionokat vizsgáltuk (12. ábra). Az $[M + K]^+$ és a $[M + Na]^+$ csúcsok tömege alapján a 3. táblázatban feltüntetett komponenseket tartalmazhatja a növény: kempferol-3-O-rutinozid (m/z 617,4 $[M + Na]^+$ és m/z 633,3 $[M + K]^+$); kvercitrin (m/z 471,2 $[M + Na]^+$ és m/z 487,2 $[M + K]^+$); juglanin (m/z 441,4 $[M + Na]^+$ and m/z 457,3 $[M + K]^+$); drakorubin (m/z 511,2 $[M + Na]^+$ és m/z 527,2 $[M + K]^+$); valamint blumeatin (m/z 325,2 $[M + Na]^+$, m/z 341,2 $[M + K]^+$ és m/z 303,1 $[M + H]^+$). A számításokat a kálium és nátrium adduktumok molekuláris tömege alapján végeztük. A pontos moláris tömegeket az alábbiak szerint kalkuláltuk: a mért m/z mínusz a moláris tömege a hozzáadott ionoknak, mely megfelel a komponensek moláris tömegének.



12. ábra: Tömegspektrometriai mérések eredményei. A WGLL-ből készített extraktum komponenseinek MALDI-TOF MS módszerrel kimutatott spektrumai, a mintafelvétel során 2,5-dihidroxibenzoesav (DHB) mátrixot alkalmaztunk. A-B) C18-as oszlop használata. A: kis molekulatömegű komponensek, B: nagyobb molekulatömegű komponensek. C-D) szilika S100-as oszlopon elválasztott WGLL extraktum, C: relatíve alacsonyabb molekulatömegű; D: magasabb molekulatömeg tartományba eső komponensek (társszerző eredményei).

Struktúra	PubChem CID	általános megnevezés	bevitt m/z	pontos m/z	Δ	Képlet	Ion
74640	24211973	Kaempferol-3-O-rutinozid	617,4	617,1472	0,2528	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ Na	[M + Na] ⁺
74640	24211973	Kaempferol-3-O-rutinozid	633,3	633,1212	0,1788	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ K	[M + K] ⁺
46189	5280459	Quercitrin	471,2	471,0898	0,1102	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ Na	[M + Na] ⁺
46189	5280459	Quercitrin	487,2	487,0637	0,1363	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ K	[M + K] ⁺
47726	5748554	Juglanin	441,4	441,0792	0,3208	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀ Na	[M + Na] ⁺
47726	5748554	Juglanin	457,3	457,0531	0,2469	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀ K	[M + K] ⁺
68247	160270	Drakorubin	527,2	527,1255	0,0745	C ₃₂ H ₂₄ O ₅ K	[M + K] ⁺
68247	160270	Drakorubin	511,2	511,1516	0,0484	C ₃₂ H ₂₄ O ₅ Na	[M + Na] ⁺
48987	11289628	Blumeatin	341,2	341,0422	0,1578	C ₁₆ H ₁₄ O ₆ K	[M + K] ⁺
48987	11289628	Blumeatin	325,2	325,0683	0,1317	C ₁₆ H ₁₄ O ₆ Na	[M + Na] ⁺

3. táblázat: A WGLL minta extraktumából nyert komponensek tömegspektrometriai analízise során mért és megállapított m/z értékek (társszerző eredményei).

4.2. Transztorakális echokardiográfia

Minden echokardiográfiás vizsgálat 20 perc alatt lezajlott, maradéktalanul visszatértek az altatásból, stabil keringéssel, szív-és légzésfrekvenciával. Mivel a TTE az első a metodikák sorában, amelyet állatokon és nem a liofilizátumon végeztük, így itt szeretném megragadni a lehetőséget, hogy megmagyarázzam az eredmények ismertetésének szerkezetét. Mindkét modellen (HC és PAH) végzett kísérletek eredményeit metodikánként összegezve ismertetem, ezáltal megkönnyítve a medvehagyma hatásainak összevetését azonos experimentális körülmények között. Ezt a szerkezetet konzekvensen tartom az *Eredmények* fejezet további alfejezeteiben is, tehát párhuzamosan láthatóak a két kísérlet eredményei.

4.2.1. HC modell eredményei

A HC kezelés echokardiográfiás eredményei a 4. táblázatban vannak összefoglalva. HC állatokban szignifikánsan nagyobb bal kamrai végszisztolés átmérőt mértünk M-módban ($1,242 \pm 0,045$ cm versus $1,016 \pm 0,091$ cm, a kontrolléhoz képest). Ezzel szemben nem tapasztaltunk jelentős változást a HCT csoportnál ($1,184 \pm 0,020$ cm) a Kontroll csoporttal összevetve. A frakcionált rövidülés (FS) és ejekciós frakció (EF) paraszternális hosszú tengelyi, valamint a rövid tengelyi metszetekben mért eredményei jól korreláltak egymással. A HC kezelést kapott állatok EF és FS eredményei jelentősen alacsonyabbnak bizonyultak a Kontroll állatokéhoz képest ($FS_{HC}: 29,010 \pm 1,056\%$ versus $FS_{KONTROLL}: 32,310 \pm 0,718\%$; $EF_{HC}: 49,810 \pm 1,140\%$ versus $EF_{KONTROLL}: 56,910 \pm 1,294\%$). Továbbá, a medvehagyma-kezelt csoportnál (HCT) szignifikánsan magasabb FS és EF értékek voltak megfigyelhetők a HC csoportéhoz képest ($FS_{HCT}: 32,970 \pm 1,131\%$; $EF_{HCT}: 55,990 \pm 1,756\%$). A diasztolés szívfunkciót az E/A hányadossal fejeztük ki, melyet Doppler (PW)-módban mértünk. Az E/A hányados is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a HC kezelés hatására a Kontroll csoportéhoz képest (HC: $1,207 \pm 0,0374$ versus Kontroll: $1,376 \pm 0,0447$), ezzel szemben a HCT és Kontroll csoport eredményei között nem volt tapasztalható szignifikáns különbség ($E/A_{HCT}: 1,344 \pm 0,076$). Az E hullám decelerációs ideje a HC állatoknál szignifikánsan megnyúlt a Kontrollhoz képest ($DecT_{HC}: 87,440 \pm 3,534$ ms versus $DecT_{KONTROLL}: 71,250 \pm 4,101$ ms), míg a HCT állatoknál ez az érték jelentősen javult ($DecT_{HCT}: 69,540 \pm 4,787$ ms). A szöveti sebességek (Tissue Velocity Imaging, TVI) mérése során nem volt szignifikáns csökkenés a laterális E'/A' hányados értékét tekintve WGLL-kezelt állatoknál. Nem várt eredménynek tekinthető, hogy a jobb kamrai szisztolés csúcsebesség (peak systolic velocity, S'), valamint a trikuszipidális annulus síkirányú szisztolés kitérése (TAPSE) jelentős emelkedést mutatott a medvehagyma liofilizátummal

kezelt állatok esetében, a beteg állatokhoz képest (S'_{HCT} : $9,156 \pm 0,210$ cm/s versus S'_{HC} : $8,103 \pm 0,216$ cm/s; $\text{TAPSE}_{\text{HCT}}$: $0,646 \pm 0,0204$ cm versus TAPSE_{HC} : $0,5762 \pm 0,0146$ cm).

mean $\pm$ SEM	HR (bpm)	Ao (cm)	LVIDs (cm)	LVIDd (cm)	FS PLAX (%)
Kontroll	180,8 $\pm$ 4,145	0,9458 $\pm$ 0,02369	1,016 $\pm$ 0,09082	1,655 $\pm$ 0,05002	39,37 $\pm$ 5,021
HC	150,2 $\pm$ 4,303*	0,9188 $\pm$ 0,02530	1,242 $\pm$ 0,04500*	1,756 $\pm$ 0,06262	29,22 $\pm$ 0,8030*
HCT	185,0 $\pm$ 7,053**	0,8985 $\pm$ 0,01250	1,184 $\pm$ 0,01992	1,793 $\pm$ 0,03095	33,82 $\pm$ 1,312**
		BK tömeg		BK tömeg	
	EF PLAX (%)	PLAX (g)	FS SAX (%)	EF SAX (%)	SAX (g)
Kontroll	56,91 $\pm$ 1,294	6,632 $\pm$ 0,4779	32,31 $\pm$ 0,7175	54,13 $\pm$ 0,9609	6,573 $\pm$ 0,3514
HC	49,81 $\pm$ 1,140*	8,218 $\pm$ 0,6284	29,01 $\pm$ 1,056*	49,43 $\pm$ 1,517*	8,315 $\pm$ 0,7921*
HCT	55,99 $\pm$ 1,756**	8,769 $\pm$ 0,1694*	32,97 $\pm$ 1,131**	54,93 $\pm$ 1,522**	8,195 $\pm$ 0,2261*
				LVOTVmax	Velocity Time
	E/A	DecT (ms)	E/E'	(cm/s)	Integral (cm)
Kontroll	1,376 $\pm$ 0,04473	71,25 $\pm$ 4,101	1,417 $\pm$ 0,05845	84,28 $\pm$ 2,131	0,07075 $\pm$ 0,001780
HC	1,207 $\pm$ 0,03736*	87,44 $\pm$ 3,534*	1,775 $\pm$ 0,1014	87,94 $\pm$ 5,719	0,07969 $\pm$ 0,004936
HCT	1,344 $\pm$ 0,07601	69,54 $\pm$ 4,787**	1,718 $\pm$ 0,1551	77,15 $\pm$ 2,157	0,06846 $\pm$ 0,002008
	E'/A' (lateral)	MAPSE (cm)	RV S' (cm/s)	RV E'/A'	TAPSE (cm)
Kontroll	1,303 $\pm$ 0,05784	0,5273 $\pm$ 0,01834	8,935 $\pm$ 0,2730	1,336 $\pm$ 0,05057	0,5760 $\pm$ 0,01197
HC	1,109 $\pm$ 0,07107	0,5708 $\pm$ 0,02484	8,103 $\pm$ 0,2155*	1,233 $\pm$ 0,09219	0,5762 $\pm$ 0,01460
HCT	1,065 $\pm$ 0,1171	0,5925 $\pm$ 0,03008*	9,156 $\pm$ 0,2104**	1,055 $\pm$ 0,07717*	0,6445 $\pm$ 0,02037**

4. táblázat: HC modell TTE eredményei. A szignifikanciát * $P < 0,05$ a Kontroll csoporthoz képest; ** $P < 0,05$ HC csoporthoz hasonlítva állapítottuk meg és jelöltük (saját eredmények).

4.2.2. PAH modell eredményei

Amint az alábbi táblázatban is látható (6. táblázat), a bal kamra szisztolés funkcióit vizsgálva - úgymint FS, EF és a bal kamrai szabadfal szisztolés kitérése (mitral annular plane systolic excursion, MAPSE) - nem tapasztaltunk szignifikáns változást a csoportok között. A szívfrekvencia (heart rate, HR) szintén nem változott egyik vizsgált csoportnál sem. A jobb kamrai funkciók vizsgálata során a Kontroll csoport TAPSE értéke a normál tartományban maradt ($\text{TAPSE}_{\text{Kontroll}}$: $2,308 \pm 0,074$ mm), ezzel szemben a beteg állatok értéke jelentősen leromlott ($\text{TAPSE}_{\text{PAH}}$: $1,697 \pm 0,098$ mm), míg a WGLL- és sildenafil-kezelt állatok jelentős javulást mutattak a PAH csoporthoz összevetve ($\text{TAPSE}_{\text{WGLL}}$: $2,021 \pm 0,071$ mm; $\text{TAPSE}_{\text{Sildenafil}}$:

2,390 ± 0,069 mm). A diasztolés szívfunkció vizsgálata során (E/A) a monokrotalin-, a Sildenafil- és a WGLL-kezelés egyaránt hatástalannak bizonyult a nyolc hetes kezelést követően.

Parameter	Kontroll	PAH	Sildenafil	WGLL
BK EF (%)	73,39 ± 3,638	82,61 ± 2,911	76,93 ± 2,294	76,13 ± 2,327
BK FS (%)	38,64 ± 3,268	47,75 ± 3,432	40,84 ± 2,177	40,49 ± 2,059
BK tömeg (g)	1,388 ± 0,085	1,343 ± 0,037	1,487 ± 0,036	1,469 ± 0,057
Verőtérfogat (mL)	0,459 ± 0,070	0,456 ± 0,056	0,445 ± 0,081	0,452 ± 0,032
HR (bpm)	269,5 ± 16,21	274,2 ± 9,37	264,3 ± 10,39	243,1 ± 9,76
LVOT maxPG (mmHg)	2,225 ± 0,247	2,415 ± 0,260	2,401 ± 0,381	2,128 ± 0,179
LVOT meanPG (mmHg)	1,032 ± 0,112	1,067 ± 0,096	1,169 ± 0,185	0,876 ± 0,074
LVOT Vmax (m/s)	0,753 ± 0,041	0,746 ± 0,445	0,748 ± 0,082	0,720 ± 0,032
LVOT Vmean (m/s)	0,432 ± 0,025	0,451 ± 0,018	0,463 ± 0,045	0,398 ± 0,017
Lat S' (cm/s)	32,29 ± 1,782	40,51 ± 2,710	50,39 ± 2,278 *	39,36 ± 3,565
MV E vel (cm/s)	65,81 ± 3,860	64,71 ± 3,046	58,09 ± 2,906	63,56 ± 2,484
MV A vel (cm/s)	40,15 ± 4,253	37,54 ± 5,484	30,82 ± 1,054	39,19 ± 2,385
MV E/A arány	1,841 ± 0,167	1,856 ± 0,165	1,903 ± 0,052	1,745 ± 0,129
MAPSE (mm)	2,085 ± 0,089	1,961 ± 0,098	1,905 ± 0,057	1,944 ± 0,150
TAPSE (mm)	2,308 ± 0,074	1,697 ± 0,098 *	2,390 ± 0,069 #	2,210 ± 0,071 [#]

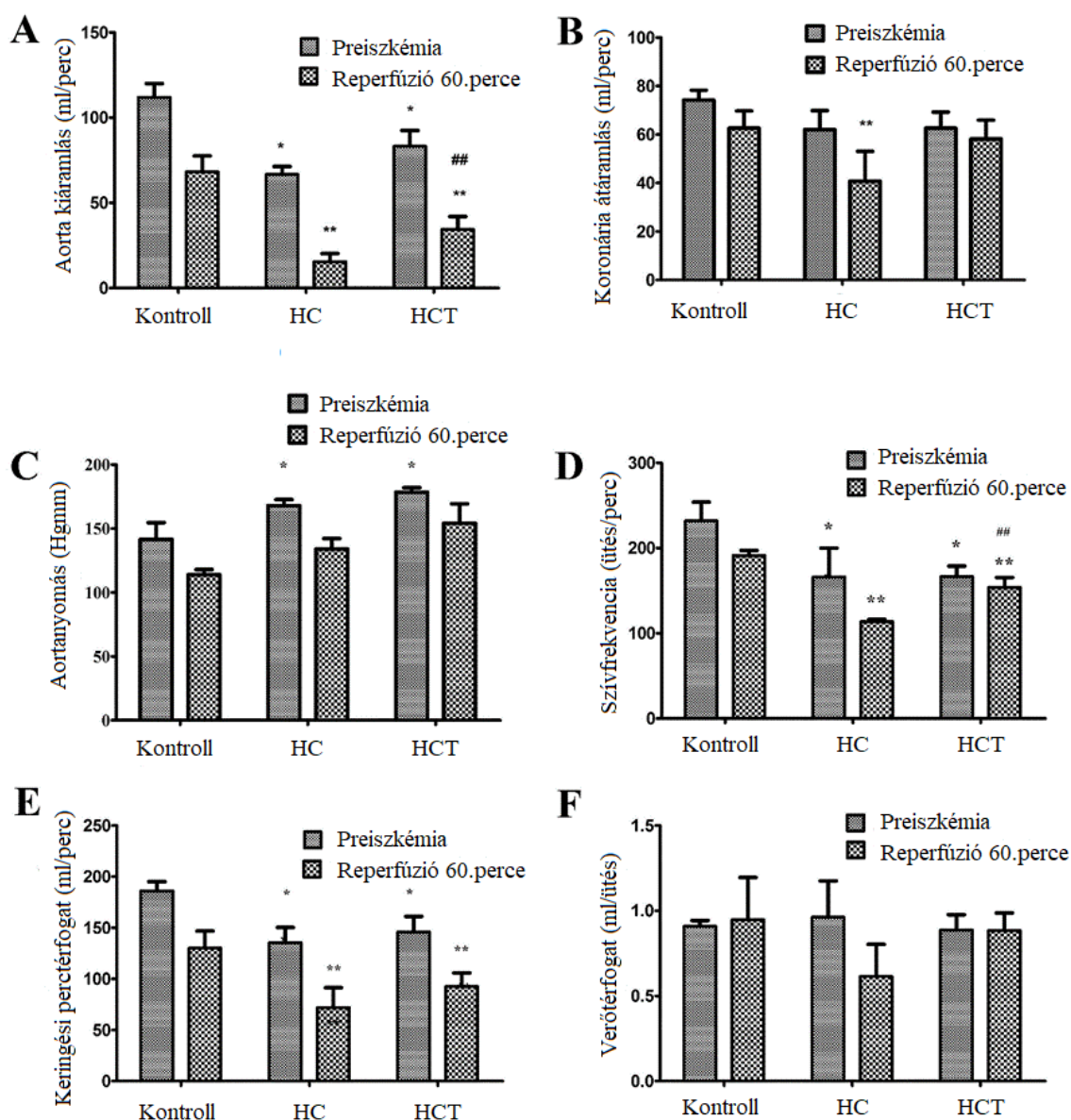
5. táblázat: PAH modell TTE eredményei. A szignifikanciát * P<0,05 a Kontroll csoporthoz képest; # P<0,05 PAH csoporthoz hasonlítva állapítottuk meg és jelöltük (*saját eredmények*).

4.3. Izolált „dolgozó-szív” eredmények

4.3.1. HC modell

A koleszterines kezelés indukálta hiperkoleszterinémia, valamint a WGLL-kezelés szívfunkciós paraméterekre gyakorolt hatásainak *ex vivo* eredményeit a 13. ábra mutatja. Az alábbi funkciókat vizsgáltuk: aorta kiáramlás (aortic flow, AF; 13A), koronária átáramlás (coronary flow, CF; 13B), aortanyomás (aortic pressure, AoP; 13C), szívfrekvencia (heart rate, HR; 13D), perctérfogat (cardiac output, CO; 13E), verőtérfogat (stroke volume, SV; 13F). A HC és HCT kezelt állatok preiszkémias AF (AF_{HC}: 73,40 ± 5,014; AF_{HCT}: 83,20 ± 6,144), HR (HR_{HC}: 166,2 ± 22,48; HR_{HCT}: 166,5 ± 8,082) és CO (CO_{HC}: 135,4 ± 9,926; CO_{HCT}: 145,8 ± 10,19) eredményei jelentősen leromlottak a Kontroll (AF_{Kontroll}: 112,0 ± 5,333; HR_{Kontroll}: 232,0 ± 14,60; CO_{Kontroll}: 186,2 ± 5,867) csoporthoz képest (P<0,05). Az AoP tekintetében viszont

szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a HC ($AoP_{HC}: 168,0 \pm 3,113$), illetve a WGLL-kezelt ($AoP_{HCT}: 178,4 \pm 2,428$) csoport esetében a Kontroll ($AoP_{Kontroll}: 141,5 \pm 8,609$) csoporthoz képest ($P < 0,05$). Az állatok posztiszkémiás AF, CF, HR és CO eredményei jelentősen leromlottak 60 perc elteltével a saját preiszkémiás eredményeikhez képest, minden csoportban ($P < 0,05$). A WGLL-kezelt csoport AF ($AF_{HCT}: 34,40 \pm 5,049$; 60. perc) és HR ($HR_{HCT}: 149,0 \pm 9,071$; 60. perc) posztiszkémiás értékei viszont jelentősen magasabbak voltak a HC ($AF_{HC}: 15,50 \pm 3,122$; $HR_{HC}: 112,5 \pm 2,079$; 60. perc) csoporthoz képest ($P < 0,05$).

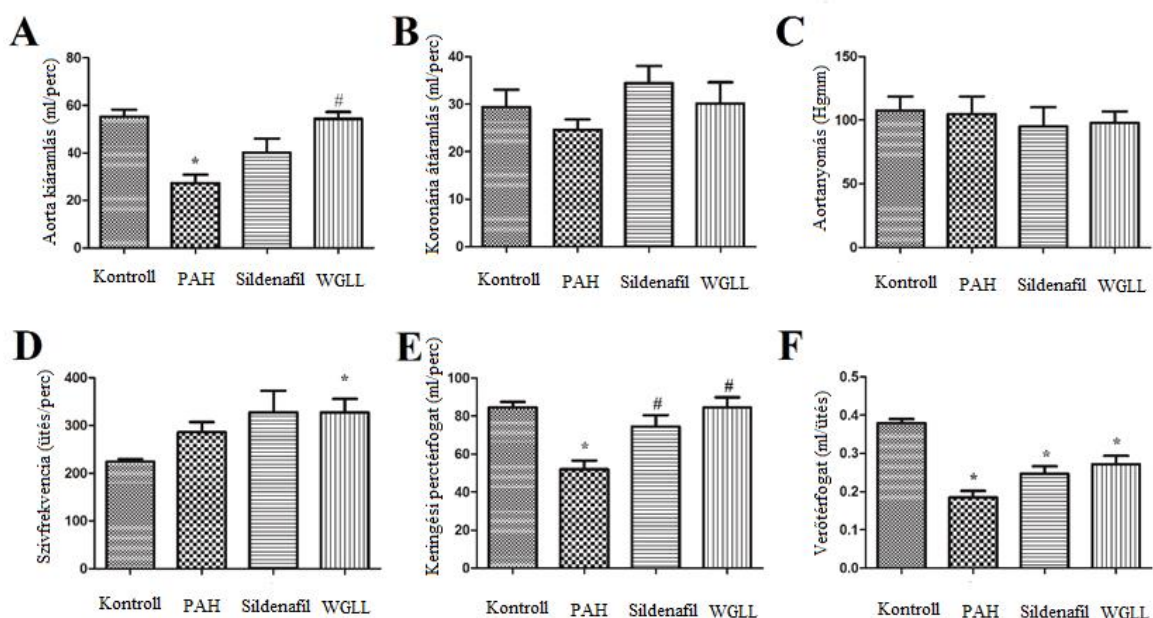


13. ábra: Ex vivo szívfunkciós eredmények, HC modell. 6A: aorta kiáramlás (ml/perc); 6B: koronária átfolyás (ml/perc); 6C: Aortanyomás (Hgmm); 6D: szívfrequencia (BPM, beat per minute= ütés/perc); 6E: keringési perctérfogat (ml/perc); 6F: verőtérfogat (ml/ütés). A szignifikancia szintet * $P < 0,05$ Preiszkémiás kontrollhoz;

**P<0,05 Kontroll posztisztkémia 60. percéhez; ##P<0,05 HC posztisztkémia 60. percéhez hasonlítva állapítottuk meg és jelöltük (*saját eredmények*).

4.3.2. PAH modell ex vivo szívfunkciós eredményei

A PAH modell állatainak izolált „dolgozó-szív” rendszeren vizsgált bal kamra funkciói a 14. ábrán vannak feltüntetve. A monokrotalin kezelés egyértelmű AF csökkenést idézett elő a Kontroll csoporthoz képest (AF_{PAH}: 27,38 ± 3,447 ml/perc vs. AF_{Kontroll}: 55,33 ± 2,932 ml/perc), míg a WGLL kezelés hatására az AF elérte az egészséges állatok értékeit (AF_{WGLL}: 54,36 ± 2,864 ml/perc). A CF-ra és az AoP-ra nézve hatástalannak bizonyultak a kezelések, a két vizsgált paraméter tekintetében nem volt változás a három csoport között (P<0,05). A WGLL csoport szívfrekvenciája viszont jelentősen emelkedett a Kontrollhoz képest (HR_{WGLL}: 327,5 ± 28,22 bpm vs. HR_{Kontroll}: 224,0 ± 5,579 bpm). A beteg állatok CO-ja szignifikánsan lecsökkent az egészséges állatokéhoz képest (CO_{PAH}: 52,00 ± 4,730 vs. CO_{Kontroll}: 84,67 ± 2,783), míg a Sildenafil és a WGLL kezelés hatására jelentősen emelkedett ez az érték (CO_{Sildenafil}: 74,40 ± 6,130; CO_{WGLL}: 84,45 ± 5,409). A SV mindhárom monokrotalinnal kezelt csoport esetében jelentősen leromlott a Kontrollhoz képest, egymással összevetve viszont nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket (SV_{PAH}: 0,1846 ± 0,01738; SV_{Sildenafil}: 0,2471 ± 0,01890; SV_{WGLL}: 0,2708 ± 0,02270 vs. SV_{Kontroll}: 0,3788 ± 0,01114) (*saját eredmények*).

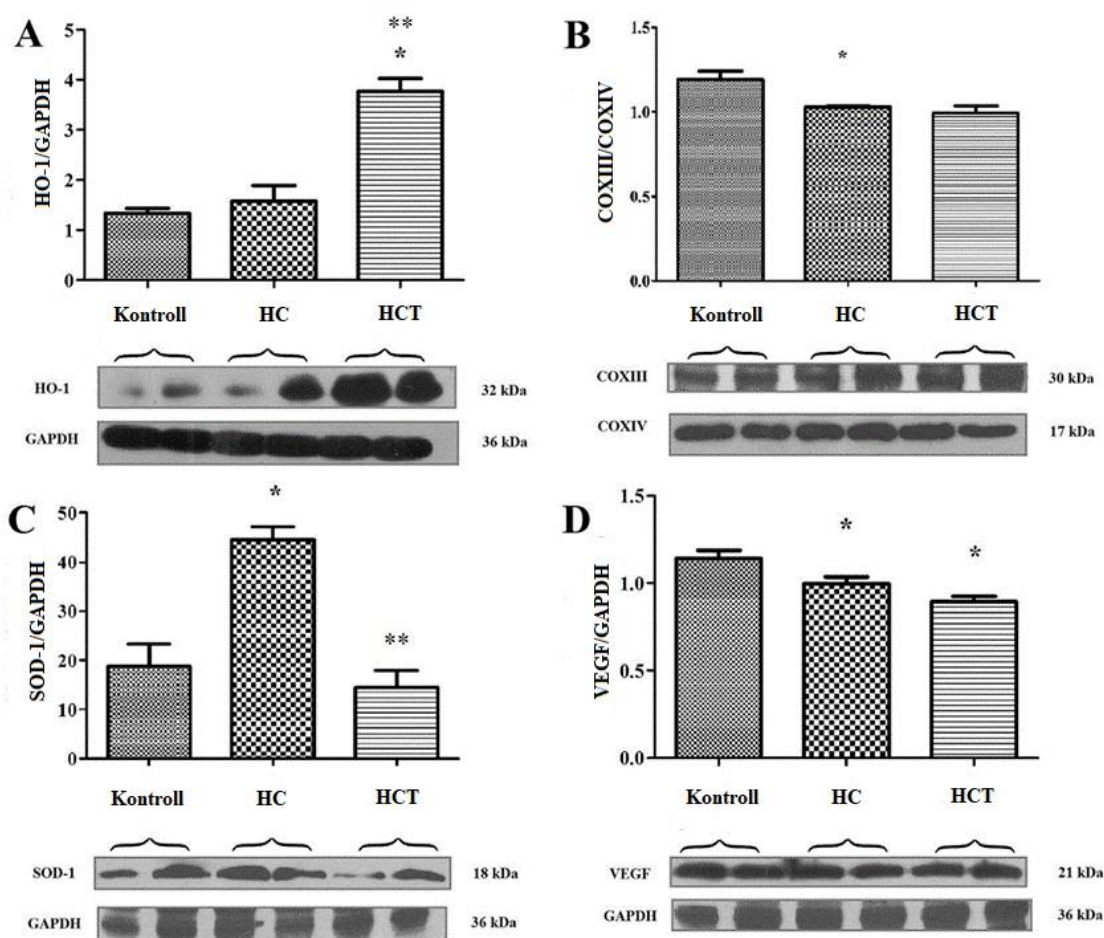


14. ábra. PAH modell ex vivo szívfunkciós eredményei. 7A: aorta kiáramlás; 7B: koronária áramlás; 7C: aortanyomás; 7D: szívfrekvencia; 7E: keringési perctérfogat; 7F: verőtérfogat. A szignifikanciát * P<0,05 a Kontroll csoporthoz képest; # P<0,05 PAH csoporthoz hasonlítva állapítottuk meg és jelöltük (*saját eredmények*).

4.4. Western blot

4.4.1. HC modell

A szív homeosztázisában, négy jelentős szereppel bíró mediátor Western blot analízissel kapott eredményei a 15. ábrán láthatóak. Ezen eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a HO-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a medvehagyma kezelés hatására a beteg csoportban mért értékekhez képest (HCT_{HO-1} : $3,770 \pm 0,393$ vs. HC_{HO-1} : $1,578 \pm 0,475$, 8A). A SOD1 expressziós szintje viszont a HC csoportban emelkedett meg jelentősen a Kontroll, valamint a HCT csoporthoz képest (HC_{SOD-1} : $44,45 \pm 2,74$ vs. HCT_{SOD-1} : $14,56 \pm 3,348$; $Kontroll_{SOD-1}$: $18,78 \pm 4,560$; 8C). A COXIII és a VEGF fehérjék expressziója a HC és HCT (HC_{COXIII} : $1,029 \pm 0,002753$; HC_{VEGF} : $0,9965 \pm 0,03945$; HCT_{COXIII} : $0,9923 \pm 0,04085$; HCT_{VEGF} : $0,8942 \pm 0,02966$) csoportban is egyaránt csökkent a Kontrollhoz képest ($Kontroll_{COXIII}$: $1,191 \pm 0,05040$; $Kontroll_{VEGF}$: $1,142 \pm 0,04613$; 8B; 8D).

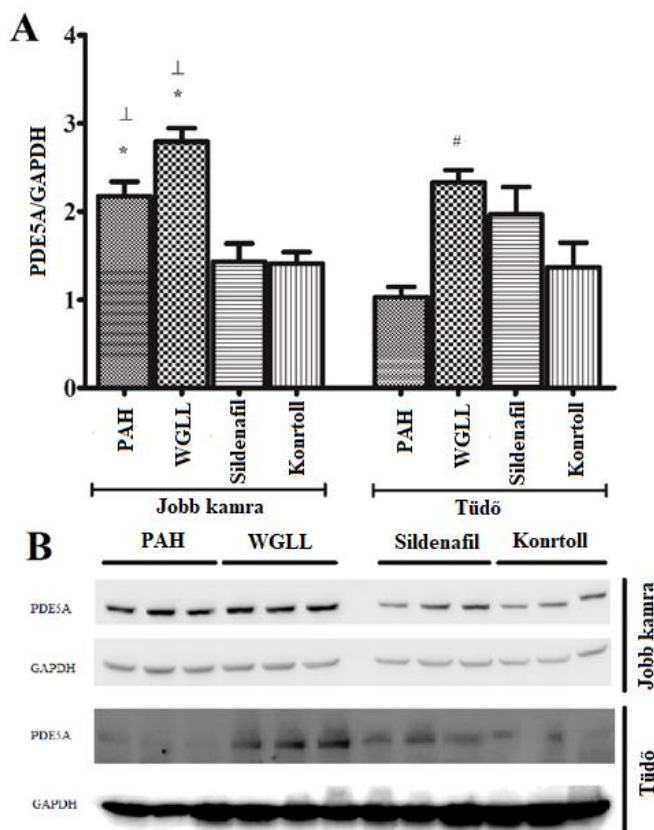


15. ábra. HC modell miokardiális fehérjéknek Western blot analízise. A relatív intenzitás értékeit egy önkényes egységben határoztuk meg, melyeket mean ± SEM-ben ábrázoltunk. A szignifikanciát * $P < 0.05$ HO-1, COXIII,

SOD-1 és VEGF átlag expressziós szintjeit a Kontroll csoport miokardiumából vett mintákhoz; ** $P < 0,05$ HC csoporthoz hasonlítva állapítottuk meg és jelöltük (saját eredmények).

4.4.2. PAH modell

A PAH modell PDE5A enzim expressziójának szintjét a jobb kamrákból, illetve a tüdőkből vett mintákból készített izolátumokból vizsgáltuk, mely eredményeket a 16. ábrán szemléltettünk. A jobb kamrák miokardiumából vett mintáknál azt tapasztaltuk, hogy a PDE5A szintje a PAH és WGLL csoportban magasabb volt, mint a Sildenafil és Kontroll csoportban ($PDE5A_{PAH}$: $2,174 \pm 0,110$ és $PDE5A_{WGLL}$: $2,690 \pm 0,096$ vs. $PDE5A_{Sildenafil}$: $1,432 \pm 0,139$ és $PDE5A_{Kontroll}$: $1,410 \pm 0,088$). Ezek alapján azt is megjegyezhetjük, hogy a Sildenafil kezelés markáns PDE5A expresszió gátlást eredményezett a jobb kamrából vett mintákon, valamint, hogy a PAH és WGLL csoportok között nem volt jelentős különbség ($P < 0,05$). Ezzel szemben a tüdőszövetből vett mintáknál a PAH kezelés és Kontroll csoport között nem volt jelentős expresszióbeli különbség, míg a WGLL csoport PDE5A szintje szignifikánsan magasabb volt a beteghez képest ($Kontroll_{PDE5A}$: $1,367 \pm 0,189$; $WGLL_{PDE5A}$: $2,329 \pm 0,094$; $Sildenafil_{PDE5A}$: $1,968 \pm 0,209$; PAH_{PDE5A} : $1,029 \pm 0,079$).

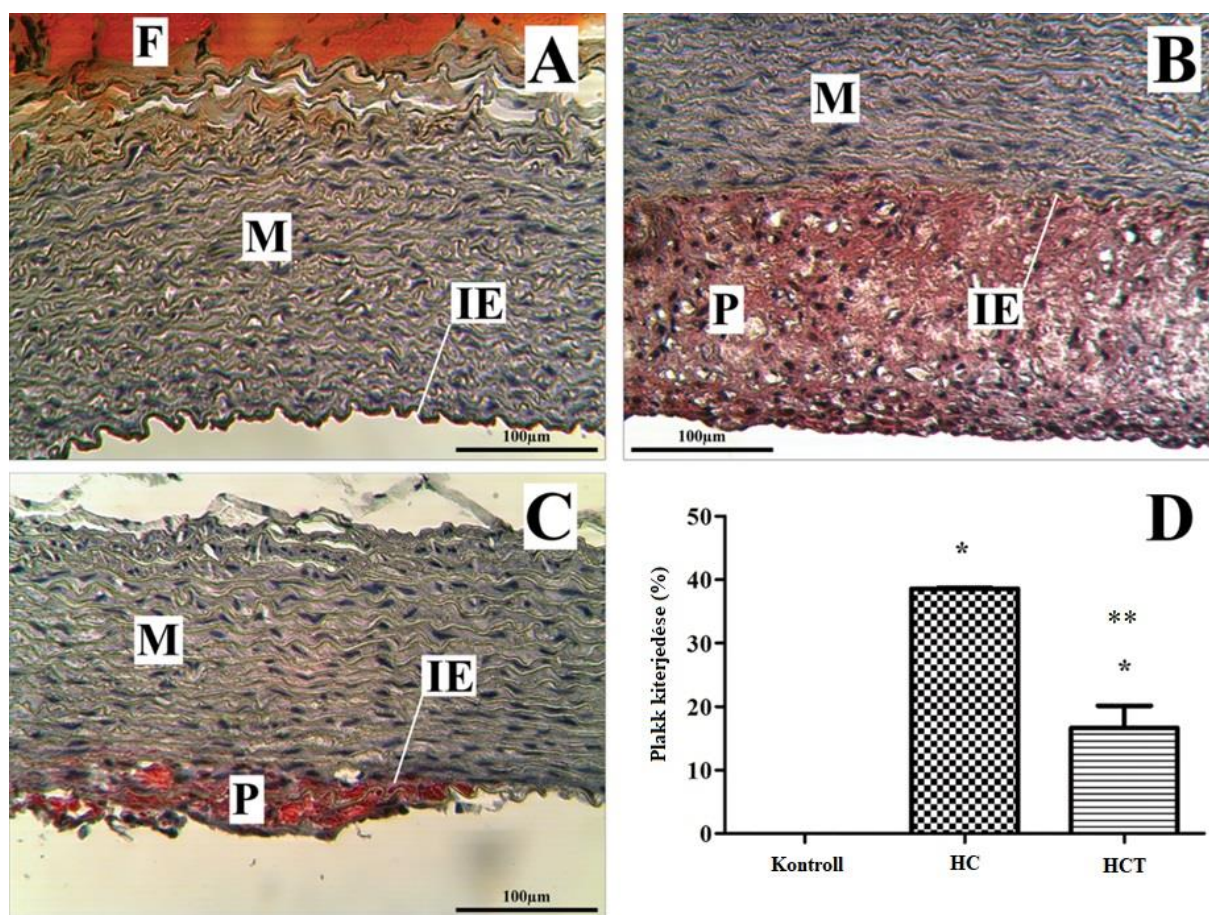


16. ábra: A PAH modell Western blot analízise. A) A PDE5A relatív intenzitása GAPDH fehérje expressziójára vonatkoztatva. B) A PDE5A és GAPDH fehérjék Western blot képei a kezelt csoportokban, tüdő illetve jobb kamra mintából izolálva. * $P < 0,05$ Kontroll csoporthoz viszonyítva; # $P < 0,05$ PAH-hoz viszonyítva; $\perp$ $P < 0,05$ Sildenafilhoz hasonlítva (saját eredmények).

4.5. Szövettan

4.5.1. HC modell szövettani analízis

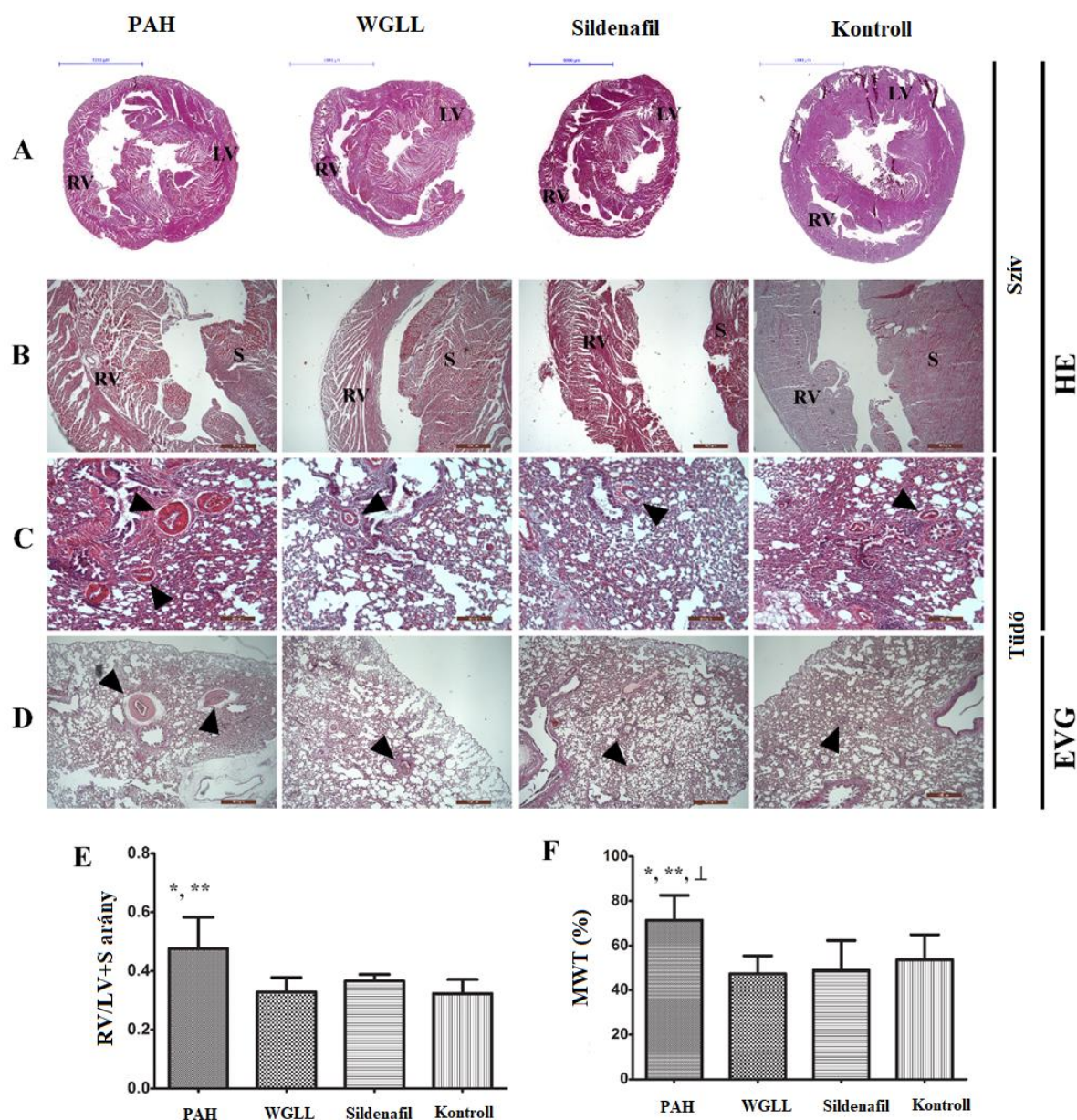
HC modellből származó *arcus aortae* területéről vett minták hematoxinil, illetve ORO festett szövettani metszetei a 17. ábrán láthatóak. A Kontroll csoport állatainak mintáin a plakkfestési eljárás alapján, nem volt ateroszklerotikus lézió megfigyelhető (17A. ábra). A 8 hetes koleszterines kezelés hatására, HC csoportról készített metszetek alapján magasabb, mint 35%-os terület volt ORO pozitív a teljes területhez képest (17B. ábra), mely egyértelmű különbség a két csoport között (HC: $38,610 \pm 0,146$ %, 17B-D. ábra). Diszkrét ateroszklerotikus elváltozás volt megfigyelhető a HCT csoport tekintetében, mely a HC csoporttal összevetve szignifikánsan kisebb mértékűnek bizonyult (HCT: $16,710 \pm 3,421$ %; $P < 0,05$; 10C-D. ábra).



17. ábra. HC modell *arcus aortae* szövettani vizsgálata, HE-ORO festési eljárással. A) Kontroll csoport; B) HC csoport; C) HCT csoport; D) Plakkos terület aránya a teljes területhez viszonyítva, %-ban kifejezve. Rövidítések: F: ORO festett zsíros szövet az adventíciáról; IE: belső (internális) elasztikus lamina; M: media; P: ateroszklerotikus plakk. (25x nagyítás). * $P < 0,05$ a Kontroll csoporttal összevetve. ** $P < 0,05$ HC csoporthoz hasonlítva (saját eredmények).

4.5.2. PAH modell mikroszkópikus morfológiája

A PAH protokoll miokardiumból és tüdőből vett HE-, illetve EVG-festett mintáinak eredményeit 18. ábrán szemléltettük. A jobb és bal kamrákról készült HE festett metszetek képein jól látszódik a MCT-indukálta szöveti károsodás (PAH, Sildenafil, WGLL), ezzel szemben a Kontroll csoport megtartotta a normál morfológiáját (18A-B. ábrák). A szövetkárosodás a PAH csoport kardiomiocitáinak hiperbazofiliájában, hipereozinofiliájában, az izomrostok hullámos elrendezkedésében, sejtek közötti ödémában, lézióban egyértelműen megnyilvánult. A PAH csoportból vett mintákon látható a legdrámaibb jobb kamrai hipertrófia, míg a WGLL-kezelte csoportnál, illetve a Sildenafil csoportnál csak mérsékelt szöveti nagyobbodás volt észrevehető. A jobb karma hipertrófiájának mértékét (JKH) a $RV/(LV+S)$ arány segítségével határoztuk meg (18E. ábra), mely érték a PAH ($0,477 \pm 0,044$) csoportban a Kontrollhoz ($0,323 \pm 0,020$) és WGLL-hez ($0,328 \pm 0,020$) képest jelentősen magasabb volt. A pulmonális artériák és arteriolák mediális falának vastagságát a mediális fal vastagság% (medial wall thickness, MWT%) segítségével fejeztük ki. A PAH csoport mintáinak MWT% értéke jelentősen megemelkedett a többi csoporthoz képest, viszont a másik három csoportot egymással összevetve nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket ($MWT_{PAH}: 71,39 \pm 2,628\%$; $MWT_{Kontroll}: 53,64 \pm 3,240\%$; $MWT_{WGLL}: 47,32 \pm 2,084\%$ és $MWT_{Sildenafil}: 48,91 \pm 3,444$; 18F ábra).



18. ábra. PAH modellből származó szív- és tüdő minták HE és EVG festésének eredményei. A) Reprezentatív kép a szívek HE festett teljes transzverzális metszetéről; B) Reprezentatív kép a HE festett szívek transzverzális metszetéről (40x nagyítás); C) tüdő szövetek HE festett metszetei (40x nagyítás); D) Elastica van Gieson (EVG) festett tüdő szövetek (40x nagyítás); E) jobb kamrai hipertrófia az RV/LV+S képlet szerint kifejezve; F) mediális fal vastagsága (medial wall thickness, MWT) %-ban kifejezve, az alábbi egyenlet alapján: $MWT\% = (M1 + M2)/ED \times 100$. További rövidítések: RV (right ventricle)=jobb kamra; LV (left ventricle)= bal kamra; S (septum) = szeptum. Az eredmények átlag $\pm$ SEM-ben voltak kifejezve ($n=15$ /csoport); * $P < 0,05$ Kontrollhoz viszonyítva; ** $P < 0,05$ WGLL-hez viszonyítva; $\perp$ $P < 0,05$ a Sildenafilhez hasonlítva (társszerző eredményei).

4.6. A HC modell szerológiai eredményei

A perifériáról vett szérum vizsgálatának eredményeit a 6. táblázat ismerteti. Éheztetést követően vett plazma TC és LDL koleszterin szintje a HC csoportban nyolcszorosa, a HCT csoportban hatszorosa volt a Kontroll csoportnak, így a HCT és HC csoport között is szignifikáns különbség volt megfigyelhető ($P < 0,05$). Az apolipoprotein A-I (ApoA) szintje a HC csoportban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a másik két csoporthoz képest, viszont a HCT és Kontroll között nem volt jelentős különbség tapasztalható. A nyulak szérum ApoB szintjeinek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a HC és HCT csoporté egyaránt megemelkedett az egészséges állatokéhoz képest, viszont a HCT szintje számottevően alacsonyabbnak bizonyult a HC-hoz képest ($P < 0,05$). A TG vizsgálata során nem tapasztaltunk figyelemre méltó eltéréseket a három csoport között. A proinflammatorikus biomarker, a CRP vizsgálatakor, a HC csoportnál egyértelmű emelkedést tapasztaltunk a Kontrollhoz képest, csakúgy, mint a GOT májenzimnél, melynek értéke a HC csoportban HCT-hez képest is jelentősen emelkedett volt. Laktát-dehidrogenáz (LDH) és kreatin-kináz (CK) szérumszintek tekintetében szintén nagymértékű különbséget tapasztaltunk a HC és HCT csoport között ($P < 0,05$).

Csoport	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ApoA (g/L)	ApoB (g/L)
Kontroll	0,7929±0,06685	0,23±0,02259	0,5231±0,04498	0,04231±0,005083	0,01538±0,003323
HC	26,37±3,663 ^{*,#}	23,55±3,032 ^{*,#}	4,427±0,6562 [*]	0,02222±0,002778 ^{*,#}	0,28±0,06349 ^{*,#}
HCT	20,03±1,947 ^{*,**}	17±1,942 ^{*,**}	3,314±0,3686 [*]	0,056±0,008459 ^{**}	0,1718±0,01920 ^{*,**}
	TG (mmol/L)	CRP (mg/L)	GOT (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)
Kontroll	0,7877±0,03534	0,1±0,01387	29,67±2,895	726,4±170,7	4213±623,2
HC	1,367±0,3354	0,7278±0,3617 [*]	48,8±16,22 [*]	791,9±325,4	4955±1353
HCT	1,052±0,3391	0,5958±0,2311	24,91±2,708 ^{**}	316,6±37,17 ^{**}	2851±600,8 ^{**}

6. táblázat: HC modell szérum biomarkerei. Az eredményeket átlag± SEM-ben fejeztük ki, csoportonként $n=6$ mintát átlagoltunk. ^{*} $P < 0,05$ a Kontroll csoporthoz viszonyítva. ^{**} $P < 0,05$ HC csoporthoz viszonyítva. [#] $P < 0,05$ HCT csoporthoz viszonyítva (társszerző eredményei).

5. Megbeszélés

Jelen tanulmány megvalósításának egyik főbb célja az volt, hogy a rendelkezésünkre álló *Allium ursinum* leveléből készített liofilizátum kémiai összetételét megvizsgáljuk, és a kapott eredményeket összevessük a rendelkezésünkre álló szakirodalmi adatokkal [171]. Eredményeink jól korreláltak a korábban nyert értékekkel, ugyanis a szárított liofilizátum is gazdag volt megannyi fenolos vegyületben, mint például a kempferol származékok, juglanin, drakorubin, blumetain és kvercitrin (3. táblázat, 12. ábra)[172]. Mások és saját kutatócsoportunk egybehangzó korábbi eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az *Allium ursinum* különösen gazdag flavonoid vegyületekben, mely összetételt a liofilizálást követően is képes megtartani. Jelentős értéket képviselnek ezek az eredmények azáltal, hogy a bizonyítékon alapuló orvoslás gyakran alkalmaz természetes eredetű termékeket, így elengedhetetlen azok pontos kémiai összetételének vizsgálata, ismerete. Ezen túlmenően nem feledkezhetünk meg arról a tényről sem, hogy a polifenolok preventív, illetve terápiás értékét már ez ideáig is több farmakológiai témájú tanulmány igazolta [145, 173, 174].

Ahogy azt a bioanalitikai elemzés is mutatja, a flavonoid tartalom mellett további 0,261 m/m% alliint is tartalmazott a WGLL minta, mely komponenshez köthető az ateroszklerózis patofiziológiájában szerepet játszó molekulák szintjének csökkentése. Ez a természetes komponens egy szulfoxid származék, mely a cisztein aminosavból képződik [175]. Az alliin antioxidáns tulajdonsága mellett, mely számos egyéb oxidatív stressz okozta szöveti károsodás kivédésére alkalmas, az egyik legfőbb erénye a szabadgyök-fogó képessége [176]. Az alliinról továbbá azt is megállapították, hogy immunmodulátor hatással is rendelkezik azáltal, hogy a proinflammatorikus IL-1 β és IL-6 citokinek szintjét jelentősen lecsökkentette *in vitro* körülmények között [177]. E két citokin szerepe az ateroszklerózis és más gyulladásos betegségek patogenezisében már régóta feltárt tény [178].

A kezelések szívvultrahang eredményeit a 4. és az 5. táblázat taglalja. A HC modell tekintetében kapott eredményeket négy fő szempont alapján lehet jellemezni, összegezni:

- (1) M-mode és Doppler mérések során tapasztalt stabil pulzus- illetve légzésfrekvencia alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a hiperkoleszterinémia nem befolyásolta lényegesen az alap kardio-pulmonális keringést, mely következtetést egy korábbi tanulmányunk is megerősíti [170].
- (2) Az egészséges, normál tápon tartott állatok bal kamrai végszisztolés átmérőjéhez (LVIDd) képest lényegesen nőtt a HC és HCT állatok értéke. Az LVIDd érték emelkedésével együtt így párhuzamosan romlott ezen állatok frakcionált rövidülése

(FS) és ejekciós frakciója (EF). A paraszternális hosszú-, illetve rövidtengelyi metszetekből mért FS és EF értékek mellesleg jól korreláltak egymással. Azonban a WGLL-kezelt állatok FS értéke szignifikánsan javult a HC állatokéhoz képest. Szakirodalmi tények igazolják, hogy patológiásan emelkedett LVIDd érték összeköthető a szívbetegségek mortalitásának magasabb kockázatával [179], valamint közelmúltban publikált tanulmányok szerint, az alacsonyabb FS és EF értékek hozzájárulnak fibrotikus betegségek kialakulásához [180].

- (3) A 4. táblázat szerint a Doppler (PW) módszerrel mért E/A arány jelentősen romlott a koleszterin-dús étrend hatására az egészséges állatokéhoz képest, míg a WGLL-kezelt állatok értéke a Kontroll csoportét közelítette meg. Továbbá, az E hullám decelerációs idejében, mely a bal kamra abnormális telődési mintázatát tükrözi, szignifikáns megnyúlás volt megfigyelhető a HC állatoknál, míg ezt a jelenséget a WGLL kezelés képes volt ellensúlyozni. Így elmondhatjuk, hogy a medvehagyma kezelés nem csak a szisztolés, hanem a diasztolés bal kamrai funkciókra is egyaránt jó hatással volt, hiperkoleszterinémiás körülmények között.
- (4) Végezetül, a jobb kamrai funkciókra is jótékony hatással bírt a kezelésünk. A WGLL kezelés nemcsak a szisztolés (S') csúcshullámot, hanem a jobb kamrai szabadfal szisztolés kitérését (TAPSE) is jelentősen növelte. Érdeemes megjegyezni, hogy a jobb kamrai diszfunkció egyik legérzékenyebb mutatója a szisztolés csúcssebesség csökkenése, mely a HC állatoknál egyértelműen romlott. Szívelégtelenségben szenvedő betegeknél a TAPSE értékének romlása párhuzamba állítható a jobb kamrai diszfunkció súlyosságával [181]. Amely még meglepőbb eredmény volt, hogy a WGLL-csoport TAPSE értékei az egészségesekéhez képest is jelentősen magasabbak voltak. Ezen eredmények vetették fel valójában a kérdést, hogy érdemes lenne-e tovább vizsgálni a WGLL jobb kamrai szisztolés funkciókra kifejtett hatását, valamint a háttérben megbújó mechanizmusokat.

A PAH-modell esetében a 8 hetes kezelés leteltével nem tapasztaltunk echokardiográfiás vizsgálattal azonosítható patológiás elváltozást a bal kamrai diasztolés és szisztolés funkciók tekintetében. A TAPSE érték, amelyről már korábban kijelentettük, hogy a jobb kamrai diszfunkciók jellemzésére egyik leggyakrabban használt paraméter, a pulmonális hipertenzív patkányokban szignifikánsan lecsökkent, míg a WGLL kezelés jelentősen javította. TAPSE eredményeink jól korrelálnak más kutatók által MCT-indukálta pulmonális hipertenzív (kb. 1,6 mm) és egészséges (>2 mm) patkányokon mért értékeivel [182, 183]. Tehát elmondhatjuk, hogy hiperkoleszterinémiás és pulmonális artériás hipertóniás körülmények között a WGLL kezelés

egyaránt javította a jobb kamrai szívfunkciót. Természetesen érdemes megjegyezni, hogy a vizsgálatunk értékét limitálja, hogy vizsgálatunk során nem vizualizáltuk a pulmonális artériát, így nem határoztuk meg a pulmonális artériás nyomást, akcelerációs időt és a pulmonális ejekciós időt, melyek a PAH további értékes diagnosztikus paraméterei a TAPSE meghatározása mellett [184]. Ugyanakkor a modellünkben kialakuló betegséget további technikák -mint a mediális falvastagodás kimutatása szövettani festéssel - segítségével is alátámasztottuk.

Az izolált-dolgozó szív modell egy széles körben elterjedt és jól ismert módszer szívfunkciós értékek olyan meghatározására, ahol ezt - a metodika sajátosságának segítségével - a vegetatív idegrendszer befolyása nélkül tehetjük meg [185, 186]. Kutatócsoportunknak is jelentős tapasztalata van a módszerrel kapcsolatban [160, 187, 188]. Az echokardiográfiás szívfunkciós eredmények is jól korrelálnak dolgozó-rendszeren mértekkel, viszont a vegetatív beidegzés és adaptív reflexek hiánya miatt mindig kell számolni diszkrepanciával, mely különbség sok esetben megadja a választ a felmerülő kérdésekre.

A HC modell, izolált- dolgozó szív rendszeren végzett vizsgálata során azt állapítottuk meg, hogy a preiszkémiás AoP (13. ábra) érték egyaránt jelentősen emelkedett a HC és WGLL-kezelt csoportokban a Kontrollhoz képest. A 13. ábrán jól látható, hogy az iszkémia-reperfúzió okozta károsodás egyértelműen látható a HC csoport AF, CF, HR és CO értékeiből, míg a WGLL kezelés anti-iszkémiás tulajdonsága a perfúziót követő AF és HR értékek szignifikáns emelkedésében volt jól látható. Ezirányú eredményeink jól korrelálnak korábbi tanulmányokkal, ahol a csökkent oxidatív stressz drámaian javítja a szívizomszövet iszkémiát követő felépülését [189-191]. A WGLL kardioprotektív hatásának egyik értelmezése is lehet, hogy a miokardiális iszkémiás események jellemzően csökkentik az aorta nyomást (AoP), mely a koronária átáramlás mértékének csökkenését és a bal kamrai nyomás esését vonja magával. Ezen ismeretekből következtetve a csökkent AoP lehet egyben előnyös és hátrányos is [192]. Összességében a HC kezelés hatására létrejövő AoP emelkedés elleni védelem tekintetében az extraktumnak elhanyagolható a jelentősége.

A MCT modell izolált-dolgozó szív rendszeren vizsgált szívfunkciós eredményei tükrében elmondhatjuk, hogy a monokrotalin-kezelt csoport aorta kiáramlása, mely a bal kamra pumpafunkciójának markere, jelentősen leromlott a Kontrollhoz képest. Ezáltal, korábbi kutatásokkal egybehangzóan kijelenthetjük, hogy a monokrotalin indukálta pulmonális artériás hipertónia következménye képpen a jobb szívfél elégtelenség bal szívfél rendellenességéhez is vezet [68, 132, 193, 194]. A Sildenafil-kezelés szignifikánsan javította a perctérfogatot (CO) a PAH csoporthoz képest, mely szintén megerősíti a korábbi eredményeket [153, 182, 195].

Továbbá, a WGLL kezeléssel is sikerült kivédeni a monokrotalin-indukálta folyamatok egy részét, ugyanis AF és CO emelkedést értünk el a beteg csoport értékeihez képest. Összességében elmondhatjuk a WGLL és Sildenafil kezelésről, hogy CO és SV eredményei hasonló tendenciákat mutattak a Kontroll és PAH csoportokhoz képest, ezáltal hatásuk összevethető monokrotalin-indukálta beteg állatmodellen, *ex vivo* perfúziós rendszeren vizsgálva. Érdekes újra megállapítani azt a tényt is, hogy mind posztisztkémiás HC, mind PAH-beteg modellen aorta kiáramlás javulást értünk el medvehagyma-kezelés hatására.

A 14. ábrán feltüntetett tüdő és szív szövettani metszetein látható elváltozások jól korrelálnak az *in vivo* és *ex vivo* szívfunkciós paraméterekkel (*in vivo* TAPSE, *ex vivo* CO, SV). A PAH betegség modell egyértelműen megnyilvánul a tüdő vaszkuláris *remodellingjében*, a pulmonális artériák lumenének szűkületében, a jobb kamra hipertrófiájában. Az alkalmazott MCT-indukálta pulmonális artériás hipertónia, valamint a JK hipertrófia modell jól ismert [196, 197]. A Sildenafil pulmonális artériás nyomásra (PAP), pulmonális vaszkuláris rezisztenciára, ezáltal a JK funkciókra kifejtett hatása is egyértelműen bizonyított PAH és humán beteg modellben egyaránt [198]. Eredményeink viszont kétséget kizáróan felvetik a WGLL és Sildenafil hatásának összehasonlíthatóságát pulmonális artériás hipertónia kezelésében. Mindazonáltal, a monokrotalinról rendre publikált tény, hogy a pulmonális endoteliális sejtek károsítása révén fejt ki hatását, a pontos toxikológiai háttere még mindig ismeretlen, ezáltal egyes szakvélemények továbbra is vitatják a relevanciáját a humán betegség patobiológiájának imitálásában [199]. Éppen ezért érdemes mindig kellő kritikával kezelni az állatmodellen kapott eredményeinket.

A 15. ábrán olyan fehérjék Western blot analízissel kimutatott expressziója látható, amelyeknek jelentős szerep tulajdonítható az ateroszklerotikus betegségek patogenezisében, illetve a betegség hatására kialakuló adaptív válasz kialakulásában. A HCT csoportból vett mintáknál szignifikánsan magasabb HO-1 expressziót tapasztaltunk, a Kontroll és HC csoportokhoz viszonyítva egyaránt. A hősokkfehérjeként ismert HO-1 (hsp-32) az egyik legfontosabb antioxidáns tulajdonságú védő fehérjénk, melynek szintje mintegy válaszként emelkedik meg számos betegség által okozott intrinszik sérülés hatására, mely jelenség különösen jellemző az ateroszklerózisra [200]. Gyakori, hogy egyes betegségek patogenezise során zajló mechanizmusokat teljesen elnyomják az endogén HO-1 expresszió által indukált protektív folyamatok. Ez kutatócsoportunk számára sem ismeretlen tény, mivel korábbi tanulmányunkban is foglalkoztunk olyan természetes eredetű farmakoterápiás értékű készítmény vizsgálatával, mely kardioprotektív hatását HO-1 enzim-inducerként fejtette ki. Az említett tanulmányban a meggy (*Prunus cerasus*) magjából készített extraktumról állapítottuk

meg, hogy HO-inducer [170]. A HO-1 szintjének emelkedéséért nagymértékben felelős a hem degradációja, melyet az enzim denaturált hemből bilirubinná/biliverdinné, vassá és szén-monoxiddá alakít [201]. A HO-1 hatására képződő bilirubinnal is igazolt, hogy citoprotektív hatással bír a szívérrendszerre [202]. Tehát az új eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a meggy-maghoz hasonlóan, a medvehagyma liofilizátuma is HO-inducerként viselkedett hiperkoleszterinémias körülmények között. A korábban leírt szívfunkciós paraméterek jótékony változása tehát nagy valószínűséggel köthető az aktivált HO-1 túlélési útvonalhoz is. A magas koleszterin tartalmú diétán tartott állatok fokozott HO-1 expresszióhoz köthető, csökkent ateroszklerotikus elváltozásai, ezáltal a HO-mediálta vaszkuláris protekció, gyakorta publikált jelenségek [203]. Kutatócsoportunk már korábban is tapasztalt csökkent ateroszklerotikus elváltozást emelkedett HO-1 expresszió mellett meggy-mag őrleménnyel kezelt HC nyulakon [170]. Jelenlegi kutatásunk során is a Hematoxilin-Oil Red O-festett szövettani metszeteken jól látható, hogy a medvehagyma kezelés hatására drasztikusan lecsökkent a plakk lefedettség az intima környezetében. Ez a tapasztalat két szempontból is jelentős, egyrészt bővíti a HO-1 enzim ateroszklerózisban betöltött szerepéről szóló ismerteket, másrészt megerősíti a WGLL HO-1-mediált anti-ateroszklerotikus hatását.

A SOD1 enzim kritikus jelentőségű elem az apoptózis és az oxidatív stressz jelátviteli folyamataiban, pontosabban a SOD1-nek kulcsfontosságú szerepe van az iszkémia-reperfúzió kiváltotta reaktív oxigén gyökök felszabadulásában, különösen a miokardiumban, iszkémiás események lejátszódása során [204]. Jól ismert tény, hogy iszkémia-reperfúzió során ROS szabadulnak fel, melyek jelentősen hozzájárulnak a sejtek károsodásához és halálához, amelyet közvetlenül, illetve az apoptózis útján is indukálhatnak [205].

A SOD1 azáltal, hogy hidrogén-peroxiddá alakítja az $\cdot\text{O}_2^-$ -t - ezáltal eliminálva azt a rendszerből - kivédi a ROS káros hatásait. A glutation-peroxidáz (GSH) és kataláz enzimek pedig „ártalmatlan” H_2O -t és O_2 -t termelnek belőle. Fontos megjegyezni, hogy a felszabaduló hidrogén-peroxid szabad vassal, Fenton-reakció révén is képes szabad hidroxil gyököket képezni, melyek káros hatásai fokozhatják a reperfúziós károsodás mértékét [30]. Másképp fogalmazva, egy felborult arány a prooxidáns SOD1, valamint az antioxidáns glutation-peroxidáz és kataláz enzimek között, fokozhatja a szabadgyökök általi sejthalált. A megváltozott SOD1/GSH arány teóriáját a kapott HO-1 eredményeink is támogatják, ugyanis szintén publikált tény, hogy egyéb folyamatok mellett a csökkent GSH-szint is képes fokozni a HO-1 expresszióját [206]. Az elméletet alátámasztja, hogy miokardiális infarktuson átesett betegeknél is emelkedett SOD1 szintet mértek, egészséges vizsgáltkához képest [207]. A mi esetünkben is a koleszterindús diéta és iszkémia/reperfúzió hatására is szignifikánsan

megemelkedett az enzim expressziója, míg a medvehagymával kezelt csoport értékei az iszkémián átesett egészséges állatok értékeinek szintjéhez közelítettek. Tehát elmondhatjuk, hogy az emelkedett SOD1 enzim szint nagyfokú oxidatív stresszel együtt fokozhatja a miokardiális károsodás mértékét. A Western blot analízis technikával a COXIII és VEGF fehérjéket is vizsgáltuk. Mindkét fehérjének jelentős szerepe van a kardiovaszkuláris betegségek patofiziológiájában, szintjük jelentősen csökkent a koleszterin-dús diéta és iszkémia/reperfúziós károsodások hatására, melyre a WGLL kezelés nem volt hatással- ez az eredmény jól korrelál korábbi tapasztalatainkkal [27]. Eredményeink szerint a WGLL kardioprotektív hatását inkább a hem/HO-1 rendszeren keresztül, mint COXIII által befolyásolt útvonalakon keresztül fejt ki. A VEGF változatlan, illetve a HO-1 emelkedett expressziójának eredményéből arra következtetünk, hogy, bár jól ismert folyamat a HO-1 indukálta angiogenesis folyamata [52], az általunk alkalmazott kezelési periódusban a VEGF-aktiválta neovaszkularizáció még nem indult el.

A PAH modell-ből származó minták Western blot vizsgálatának fókuszában a PDE5A enzim állt, ugyanis közzismert tény, hogy a pulmonális vaszkulátúra remodelling folyamata, ezáltal a NO/cGMP rendszer szerepe kritikus a PAH patogenezisében. Ezen belül is a foszfodiészteráz enzimek felelősek a cGMP hidrolíziséért a pulmonális vaszkulátúrában [208]. Korábban már részletes kifejtésre került a sildenafil cGMP szint emelő hatása, az említett enzim gátlása révén, ezáltal fokozva a NO mediálta vazorelaxáns hatást [209]. Eredményeink megerősítik azt a számos korábbi kutató által feltárt tény, hogy a PDE5A expressziója fokozódik a jobb kamrát érintető betegségek során [210], mint például pangásos szívelégtelenség, pulmonális hipertónia, valamint jobb kamrai hipertrófia [211]. Ezáltal elmondhatjuk a monokrotalin-indukálta PAH modellünkről is, hogy más tanulmányokhoz hasonlóan befolyásolta a PDE5 szintjét [210]. Új eredményünk viszont, hogy a WGLL kezelés nem befolyásolta a PDE5A expressziós szintjét jobb kamrából vett szövetmintán, ezzel utalva a WGLL PDE5 útvonalától független protektív mechanizmusára. A tüdőszövetből vett mintákon elvégzett Western blot vizsgálat alapján azonban megállapítható, hogy míg a beteg és Kontroll csoport expressziója között nem tapasztaltunk eltérést, addig a WGLL-kezelt csoporté szignifikánsan megnőtt, mely eredmény kompenzatórikus folyamat hatására utalhat. Eredményeink értékelése kapcsán nem szabad megfeledkezni arról a tényről sem, hogy egy fehérje expresziójának a növekedése nem mindig jár együtt az aktivitás emelkedésével is. Korábbi kutatások is beszámoltak hasonló jelenségről a PDE5 enzim kapcsán, ahol is azt tapasztalták, hogy csak az enzim foszforilált formája fokozza az aktivitást [212, 213]. A mi esetünkben a Western blot analízis során vizsgálatunk csupán a fehérje foszforilálatlan formájára korlátozódott, ezáltal nem tapasztaltunk különbséget a

Sildenafil és a Kontroll csoport értékei között, ahogy más kutatók sem [214]. Számos publikáció által bizonyított a PDE5 enzim szerepe a betegség patológiájában, továbbá a mi eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a WGLL protektív szerepe tagadhatatlan, viszont nem találtunk kapcsolatot a kettő között. Feltételezhető tehát, hogy más útvonalon keresztül fejtheti ki hatását a medvehagyma a pulmonális vaszkulátúra, valamint a miokardium védelmében [215-217].

A szérum vizsgálatok során olyan laboratóriumi paramétereket vizsgáltunk, melyek szintjének meghatározása diagnosztikai értékű lehet egyéb gyulladásos betegségekben, illetve kardiovaszkuláris megbetegedések kapcsán. Kifejezetten olyan markereket választottunk, melyek szintjének változása összefüggésbe hozható a HC modell, illetve az iszkémia hatásaival. A drámai TC, LDL koleszterin és HDL koleszterin-szint emelkedés a HC és HCT csoportban a Kontrollhoz képest egyértelműen a sikeres koleszterindús diéta eredménye [218]. A liofilizátum protektív szerepét igazolja, hogy bár jelentős mértékben emelkedett a WGLL-kezelt csoport koleszterin értéke is a Kontroll csoportéhoz képest, a csupán zsír-dús diétán tartott állatokétól szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. Az ApoA-I szintje a HC állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a WGLL-kezelt állatok értékei nem mutattak jelentős eltérést a Kontrollhoz képest. Az ApoA-I hiány okozta hipertrigliceridémia és ateroszklerózis ismert jelenség [219], melyet jelen esetben a WGLL-dúsított étrend ellensúlyozhat. Az ApoB szintek a HC és HCT csoportban egyaránt szignifikánsan magasabbak voltak a Kontrollhoz képest, viszont a HCT-ben mért érték jelentősen alacsonyabb volt, mint a beteg csoport. Az ApoB értékek változásai a csoportok között jól korrelálnak az LDL koleszterin értékek alakulásával, mely tükrözi az ApoB elsődleges apolipoprotein szerepét a kilomikron, VLDL, IDL és LDL partikulumokban. Egyes szakemberek úgy gondolják, hogy az ApoB szintjének alakulása jobban korrelál a szívbetegségek kockázatával, mint önmagában az LDL szint változása, így szintjének, arányának vizsgálata elengedhetetlen [220]. Jelen esetben elmondhatjuk, hogy a medvehagyma liofilizátummal történt kezelés nem csak az LDL koleszterin szintjét befolyásolta előnyösen, hanem az ApoB szintjét is hatékonyan csökkentette. A TG szintjénél nem tapasztaltunk jelentős változást egyik csoport tekintetében sem, mivel a csupán koleszterin-dús diéta nem befolyásolta a triglicerid metabolizmusát. A CRP vizsgálata során mindhárom csoportban emelkedett értéket tapasztaltunk, viszont egymáshoz képest nem volt érzékelhető különbség. A C-reaktív fehérje egy megbízható szisztémás indikátora gyulladásos eredetű patológiás elváltozások széles körének. Annak ellenére, hogy egyik elsődleges indikátora az ateroszklerózis során lejátszódó gyulladásos reakciónak, számos más folyamat hatására is emelkedhet a szintje. A koleszterin hepatotoxikus hatását jól tükrözi a HC

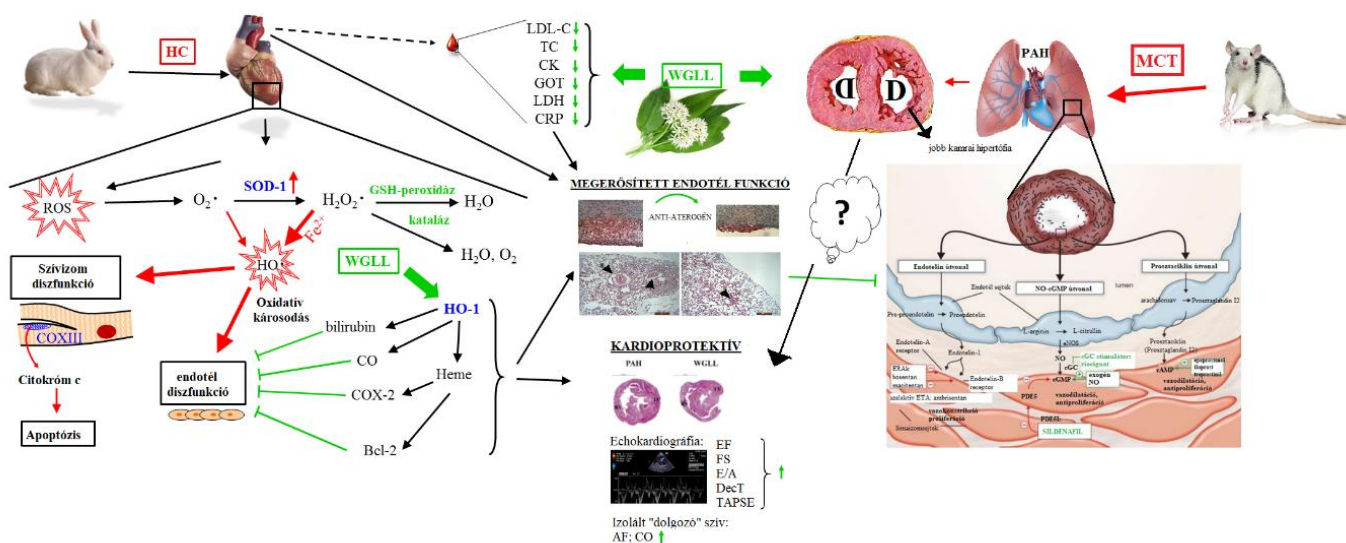
csoportnál mért szignifikánsan magasabb GOT érték a Kontroll, illetve a HCT csoporthoz képest, mely hatásra már korábbi kutatások is rámutattak [221]. Új eredmény viszont, hogy a WGLL képes ezt befolyásolni. A hiperkoleszterinémia által kiváltott káros hatások elleni WGLL protekciót támasztja alá a szignifikánsan alacsonyabb CK és LDH szint a HCT csoportban a HC-hez képest.

Egy korábbi vizsgálatban *in vitro* körülmények között bizonyították, hogy az alliin (S-allil-L-cisztein-szulfoxid) eredményesen lecsökkentette a TNF α indukálta ICAM-1 mRNS transzkripcióját, ezáltal csökkentve a monociták adhézióját a HUVEC sejt kultúrához, illetve sertés koronária artériához. Továbbá azt is igazolták, hogy szintén HUVEC primér sejt kultúrákon vizsgálva megvédte azokat a TNF α -indukálta mitokondriális membrán depolarizációtól, ezáltal a szuperoxid anionok képződésétől, mely folyamat a NOX4 mRNS transzkripció gátlása révén játszódik le. Ugyanebben a kísérletben igazolták az alliinról, hogy a szintén TNF α -mediált JNK, ERK1/2 és I κ B útvonal foszforilációját is gátolta [222]. Ezen eredmények segítségével bepillantást nyerhetünk az alliin atheroszklerózis patológiájában kifejtett kedvező hatásaiba, így az általunk végzet kísérletben betöltött szerepére is következtethetünk.

Megállapíthatjuk, hogy eredményeinkkel jelentős mértékben hozzájárultunk az *Allium ursinum* mal kapcsolatban rendelkezésünkre álló szakirodalomhoz, alátámasztván a tényt, hogy a medvehagyma is egy értékes gyógynövénynek tekinthető [118, 146, 150, 223]. Végül, de nem utolsó sorban szintén figyelemreméltó tulajdonsága a medvehagymának, hogy Európa és Ázsia szinte nagy mennyiségben, széles körben és könnyen elérhető [224].

6. Összefoglalás

Eredményeink alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy a WGLL kezelés előnyösen befolyásolja a hiperkoleszterinémia és iszkémia/reperfúzió együttes káros kardiovaszkuláris hatásait, valamint a pulmonális artériás hipertónia következtében kialakuló jobb kamrai hipertrófiát. Vizsgálataink alátámasztják mindkét beteg modell relevanciáját, valamint minden olyan korábbi saját vagy idegen szerző által publikált eredményt, amely a modellek hatására létrejövő szívfunkció-romlásról számol be. Elsőként publikáltuk a WGLL protektív hatását PAH modellen, valamint elsőként vetettük össze terápiás értékét egy jól ismert PDE-inhibítorral, a Sildenafildel. Érdeemes megemlíteni, hogy mindkét modellben transztorakális echokardiográfias módszer segítségével bizonyítottuk - a TAPSE paraméter vizsgálata által - a jobb kamrára kifejtett előnyös hatásokat. A HC modellen a kezelés anti-aterogén hatását illetően egy HO-1 indukálta túlélő útvonal aktiválódására is rávilágítottunk. A PAH modell patomechanizmusára kifejtett gátló hatás molekuláris mechanizmusának hátterének tisztázása viszont további vizsgálatokat igényel. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy hipotézisünk, mely szerint az *Allium ursinum* a kardiovaszkuláris rendszert ért károsodásokkal szemben több szempontból is protektív hatással bír, bizonyítást nyert. Mivel ezen új eredmények további kérdéseket vetnek fel, jövőbeli terveink között szerepel a WGLL Sildenafildel vagy más hatóanyaggal történő kombinációjának vizsgálata, szintén MCT-indukálta PAH patkány modellen, egy esetleges szinergista hatás kimutatásának reményében. Hasonlóképpen érdekes lehet, konzervatív anti-hiperlipidémia terápiával kombinálni a korábban vizsgált HC nyúl modellünkön. Ugyancsak távlati terveink között szerepel a liofilizátum komponenseinek izolálása és vizsgálata *in vitro* és *in vivo* körülmények között (19. ábra)



19. ábra: Az értekezés kísérletes eredményeinek grafikus összefoglalója. (módosított forrás: [127, 160])

Summary

Outcomes of the present report demonstrate that wild garlic leaf lyophilisate improves cardiac functions in hypercholesterolaemic rabbit hearts after ischemia/reperfusion injury and in PAH-induced right ventricular hypertrophy in rats alike. Our studies confirm the relevance of both experimental animal models with deteriorated cardiac functions published by former investigators. To our knowledge, this is the first study to evaluate the possible cardioprotective benefits of *Allium ursinum* in a model of PAH, and directly compare it with sildenafil, a well-known PDE inhibitor. It is worth mentioning that WGLL supplementation exerts protection in right ventricle as it was shown by significant changes in the value of echocardiography-derived TAPSE in both models. Our research revealed that WGLL supplementation elevate the activity of HO-1-mediated cardioprotective pathway in hypercholesterolemic models. Nevertheless, the exact underlying molecular mechanism of how WGLL exerts protection against MCT-induced PAH requires further investigations. Overall, our hypothesis that supplementation with WGLL, a low-cost and reasonable natural product, suppresses the harmful effect of various factors affecting the cardiovascular system has partly been confirmed experimentally. Undoubtedly, our findings also indicate that it would be impressive to evaluate the synergistic actions of Sildenafil and WGLL supplementation in the treatment of pulmonary arterial hypertension. Moreover, based on the same principles, we would like to examine the combination therapy of conservative anti-hyperlipidemic drugs with WGLL supplementation as well. Finally, it is among our future plans to isolate and separate the chemical components of the wild garlic leaf lyophilisate and also analyze it in *in vitro* and *in vivo* circumstances.

7. Irodalomjegyzék

A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. KSH Halálozások a gyakoribb halálokok szerint http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html (14/11/2017),
2. KSH Születéskor várható átlagos élettartam. http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_int009.html (14/17/2017),
3. Eurostat A halálokokra vonatkozó statisztika. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/hu (14/11/2017),
4. Hegele, R. A., The genetic basis of atherosclerosis. *International journal of clinical & laboratory research* **1997**, 27, (1), 2-13.
5. Mayerl, C.; Lukasser, M.; Sedivy, R.; Niederegger, H.; Seiler, R.; Wick, G., Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **2006**, 449, (1), 96-103.
6. Methe, H.; Weis, M., Atherogenesis and inflammation--was Virchow right? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2007**, 22, (7), 1823-7.
7. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* **1999**, 340, (2), 115-26.
8. Hansson, G. K.; Libby, P., The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* **2006**, 6, (7), 508-19.
9. Libby, P.; Schoenbeck, U.; Mach, F.; Selwyn, A. P.; Ganz, P., Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *The American journal of medicine* **1998**, 104, (2A), 14S-18S.
10. Palinski, W.; Napoli, C., Pathophysiological events during pregnancy influence the development of atherosclerosis in humans. *Trends in cardiovascular medicine* **1999**, 9, (7), 205-14.
11. Smedby, O.; Johansson, J.; Molgaard, J.; Olsson, A. G.; Walldius, G.; Erikson, U., Predilection of atherosclerosis for the inner curvature in the femoral artery. A digitized angiography study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1995**, 15, (7), 912-7.
12. Davies, M. G.; Fulton, G. J.; Hagen, P. O., Clinical biology of nitric oxide. *The British journal of surgery* **1995**, 82, (12), 1598-610.
13. Sary, H. C.; Chandler, A. B.; Dinsmore, R. E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, W., Jr.; Rosenfeld, M. E.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **1995**, 92, (5), 1355-74.
14. Ahmadi, A.; Stone, G. W.; Leipsic, J.; Shaw, L. J.; Villines, T. C.; Kern, M. J.; Hecht, H.; Erlinge, D.; Ben-Yehuda, O.; Maehara, A.; Arbustini, E.; Serruys, P.; Garcia-Garcia, H. M.; Narula, J., Prognostic Determinants of Coronary Atherosclerosis in Stable Ischemic Heart Disease: Anatomy, Physiology, or Morphology? *Circulation research* **2016**, 119, (2), 317-29.
15. Sary, H. C.; Chandler, A. B.; Glagov, S.; Guyton, J. R.; Insull, W., Jr.; Rosenfeld, M. E.; Schaffer, S. A.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the

- Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **1994**, 89, (5), 2462-78.
16. Miller, N. E., Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *American heart journal* **1987**, 113, (2 Pt 2), 589-97.
 17. Chanu, B., [Hypertriglyceridemia: danger for the arteries]. *Presse medicale* **1999**, 28, (36), 2011-7.
 18. Acton, S. L.; Kozarsky, K. F.; Rigotti, A., The HDL receptor SR-BI: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Molecular medicine today* **1999**, 5, (12), 518-24.
 19. Yamashita, S.; Hirano, K.; Sakai, N.; Matsuzawa, Y., Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biochimica et biophysica acta* **2000**, 1529, (1-3), 257-75.
 20. Beisiegel, U., New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1996**, 124, (1), 1-8.
 21. Zambon, A.; Hokanson, J. E.; Brown, B. G.; Brunzell, J. D., Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* **1999**, 99, (15), 1959-64.
 22. Bradley, W. A.; Gianturco, S. H., Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis: pathophysiological considerations. *Journal of internal medicine. Supplement* **1994**, 736, 33-9.
 23. Irani, K., Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circulation research* **2000**, 87, (3), 179-83.
 24. Ananyeva, N. M.; Tjurnin, A. V.; Berliner, J. A.; Chisolm, G. M.; Liao, G.; Winkles, J. A.; Haudenschild, C. C., Oxidized LDL mediates the release of fibroblast growth factor-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1997**, 17, (3), 445-53.
 25. Holvoet, P.; Perez, G.; Zhao, Z.; Brouwers, E.; Bernar, H.; Collen, D., Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest* **1995**, 95, (6), 2611-9.
 26. Wu, Y.; Wan, J.; Zhen, W. Z.; Chen, L. F.; Zhan, J.; Ke, J. J.; Zhang, Z. Z.; Wang, Y. L., The effect of butorphanol postconditioning on myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* **2014**, 18, (3), 308-12.
 27. Kertesz, A.; Bombicz, M.; Priks, D.; Balla, J.; Balla, G.; Gesztelyi, R.; Varga, B.; Haines, D. D.; Tosaki, A.; Juhasz, B., Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters. *International journal of molecular sciences* **2013**, 14, (9), 19086-108.
 28. Boveris, A.; Chance, B., The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal* **1973**, 134, (3), 707-16.
 29. Sanz, A.; Stefanatos, R. K., The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Current aging science* **2008**, 1, (1), 10-21.
 30. Mao, G. D.; Thomas, P. D.; Lopaschuk, G. D.; Poznansky, M. J., Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *J Biol Chem* **1993**, 268, (1), 416-20.
 31. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2012**, 32, (9), 2045-51.
 32. Murtagh, B. M.; Anderson, H. V., Inflammation and atherosclerosis in acute coronary syndromes. *The Journal of invasive cardiology* **2004**, 16, (7), 377-84.

33. Blake, G. J.; Ridker, P. M., Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: from laboratory evidence to clinical application. *Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology* **2001**, 2, (11), 796-800.
34. Ablij, H.; Meinders, A., C-reactive protein: history and revival. *European journal of internal medicine* **2002**, 13, (7), 412.
35. Yousuf, O.; Mohanty, B. D.; Martin, S. S.; Joshi, P. H.; Blaha, M. J.; Nasir, K.; Blumenthal, R. S.; Budoff, M. J., High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol* **2013**, 62, (5), 397-408.
36. Wang, L. J.; Lee, T. S.; Lee, F. Y.; Pai, R. C.; Chau, L. Y., Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology* **1998**, 152, (3), 711-20.
37. Ishikawa, K.; Maruyama, Y., Heme oxygenase as an intrinsic defense system in vascular wall: implication against atherogenesis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **2001**, 8, (3), 63-70.
38. Yachie, A.; Niida, Y.; Wada, T.; Igarashi, N.; Kaneda, H.; Toma, T.; Ohta, K.; Kasahara, Y.; Koizumi, S., Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* **1999**, 103, (1), 129-35.
39. Stocker, R.; Yamamoto, Y.; McDonagh, A. F.; Glazer, A. N.; Ames, B. N., Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **1987**, 235, (4792), 1043-6.
40. Qi, Z.; Hamza, I.; O'Brian, M. R., Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (23), 13056-61.
41. Otterbein, L. E.; Bach, F. H.; Alam, J.; Soares, M.; Tao Lu, H.; Wysk, M.; Davis, R. J.; Flavell, R. A.; Choi, A. M., Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* **2000**, 6, (4), 422-8.
42. Song, H.; Bergstrasser, C.; Rafat, N.; Hoger, S.; Schmidt, M.; Endres, N.; Goebeler, M.; Hillebrands, J. L.; Brigelius-Flohe, R.; Banning, A.; Beck, G.; Loesel, R.; Yard, B. A., The carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) inhibits expression of vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin independently of haem oxygenase-1 expression. *Br J Pharmacol* **2009**, 157, (5), 769-80.
43. Soares, M. P.; Seldon, M. P.; Gregoire, I. P.; Vassilevskaia, T.; Berberat, P. O.; Yu, J.; Tsui, T. Y.; Bach, F. H., Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* **2004**, 172, (6), 3553-63.
44. Woo, J.; Iyer, S.; Cornejo, M. C.; Mori, N.; Gao, L.; Sipos, I.; Maines, M.; Buelow, R., Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32). *Transplant immunology* **1998**, 6, (2), 84-93.
45. Wu, M. L.; Ho, Y. C.; Yet, S. F., A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, 15, (7), 1835-46.
46. Zheng, Y.; Morris, A.; Sunkara, M.; Layne, J.; Toborek, M.; Hennig, B., Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement. *The Journal of nutritional biochemistry* **2012**, 23, (2), 163-8.
47. Lazze, M. C.; Pizzala, R.; Perucca, P.; Cazzalini, O.; Savio, M.; Forti, L.; Vannini, V.; Bianchi, L., Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Molecular nutrition & food research* **2006**, 50, (1), 44-51.
48. Shibuya, M., Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* **2006**, 9, (4), 225-30; discussion 231.

49. Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J., Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling* **2007**, 19, (10), 2003-12.
50. Meoli, D. F.; Sadeghi, M. M.; Krassilnikova, S.; Bourke, B. N.; Giordano, F. J.; Dione, D. P.; Su, H.; Edwards, D. S.; Liu, S.; Harris, T. D.; Madri, J. A.; Zaret, B. L.; Sinusas, A. J., Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* **2004**, 113, (12), 1684-91.
51. Bussolati, B.; Ahmed, A.; Pemberton, H.; Landis, R. C.; Di Carlo, F.; Haskard, D. O.; Mason, J. C., Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* **2004**, 103, (3), 761-6.
52. Dulak, J.; Jozkowicz, A.; Foresti, R.; Kasza, A.; Frick, M.; Huk, I.; Green, C. J.; Pachinger, O.; Weidinger, F.; Motterlini, R., Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxidants & redox signaling* **2002**, 4, (2), 229-40.
53. Rubin, L. J., Primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* **1997**, 336, (2), 111-7.
54. Simonneau, G.; Gatzoulis, M. A.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R. F.; Olschewski, H.; Robbins, I. M.; Souza, R., Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **2013**, 62, (25 Suppl), D34-41.
55. Badesch, D. B.; Raskob, G. E.; Elliott, C. G.; Krichman, A. M.; Farber, H. W.; Frost, A. E.; Barst, R. J.; Benza, R. L.; Liou, T. G.; Turner, M.; Giles, S.; Feldkircher, K.; Miller, D. P.; McGoon, M. D., Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* **2010**, 137, (2), 376-87.
56. Humbert, M.; Sitbon, O.; Chaouat, A.; Bertocchi, M.; Habib, G.; Gressin, V.; Yaici, A.; Weitzenblum, E.; Cordier, J. F.; Chabot, F.; Dromer, C.; Pison, C.; Reynaud-Gaubert, M.; Haloun, A.; Laurent, M.; Hachulla, E.; Simonneau, G., Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2006**, 173, (9), 1023-30.
57. Ling, Y.; Johnson, M. K.; Kiely, D. G.; Condliffe, R.; Elliot, C. A.; Gibbs, J. S.; Howard, L. S.; Pepke-Zaba, J.; Sheares, K. K.; Corris, P. A.; Fisher, A. J.; Lordan, J. L.; Gaine, S.; Coghlan, J. G.; Wort, S. J.; Gatzoulis, M. A.; Peacock, A. J., Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2012**, 186, (8), 790-6.
58. Kollégium, A. K. S. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja Pulmonalis embolia http://www.kk.pte.hu/docs/protokollok/KARDPulmembo_P.pdf (14/11/2017),
59. Ghamra, Z. W.; Dweik, R. A., Primary pulmonary hypertension: an overview of epidemiology and pathogenesis. *Cleveland Clinic journal of medicine* **2003**, 70 Suppl 1, S2-8.
60. Thenappan, T.; Shah, S. J.; Rich, S.; Gomberg-Maitland, M., A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982-2006. *The European respiratory journal* **2007**, 30, (6), 1103-10.
61. Humbert, M.; Sitbon, O.; Yaici, A.; Montani, D.; O'Callaghan, D. S.; Jais, X.; Parent, F.; Savale, L.; Natali, D.; Gunther, S.; Chaouat, A.; Chabot, F.; Cordier, J. F.; Habib, G.; Gressin, V.; Jing, Z. C.; Souza, R.; Simonneau, G.; French Pulmonary Arterial Hypertension, N., Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* **2010**, 36, (3), 549-55.
62. Degano, B.; Guillaume, M.; Savale, L.; Montani, D.; Jais, X.; Yaici, A.; Le Pavec, J.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Sitbon, O., HIV-associated pulmonary arterial

- hypertension: survival and prognostic factors in the modern therapeutic era. *Aids* **2010**, 24, (1), 67-75.
63. Sitbon, O.; Lascoux-Combe, C.; Delfraissy, J. F.; Yeni, P. G.; Raffi, F.; De Zuttere, D.; Gressin, V.; Clerson, P.; Sereni, D.; Simonneau, G., Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2008**, 177, (1), 108-13.
 64. Graham, B. B.; Kumar, R., Schistosomiasis and the pulmonary vasculature (2013 Grover Conference series). *Pulmonary circulation* **2014**, 4, (3), 353-62.
 65. Vonk-Noordegraaf, A.; Haddad, F.; Chin, K. M.; Forfia, P. R.; Kawut, S. M.; Lumens, J.; Naeije, R.; Newman, J.; Oudiz, R. J.; Provencher, S.; Torbicki, A.; Voelkel, N. F.; Hassoun, P. M., Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol* **2013**, 62, (25 Suppl), D22-33.
 66. Vonk Noordegraaf, A.; Galie, N., The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **2011**, 20, (122), 243-53.
 67. van Wolferen, S. A.; Marcus, J. T.; Westerhof, N.; Spreeuwenberg, M. D.; Marques, K. M.; Bronzwaer, J. G.; Henkens, I. R.; Gan, C. T.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; Vonk-Noordegraaf, A., Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *European heart journal* **2008**, 29, (1), 120-7.
 68. Gan, C.; Lankhaar, J. W.; Marcus, J. T.; Westerhof, N.; Marques, K. M.; Bronzwaer, J. G.; Boonstra, A.; Postmus, P. E.; Vonk-Noordegraaf, A., Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2006**, 290, (4), H1528-33.
 69. O'Rourke, R. A.; Dell'Italia, L. J., Diagnosis and management of right ventricular myocardial infarction. *Current problems in cardiology* **2004**, 29, (1), 6-47.
 70. Zengin, E.; Sinning, C.; Schrage, B.; Mueller, G. C.; Klose, H.; Sachweh, J.; Goepfert, M.; Hueneke, B.; Blankenberg, S.; Kozlik-Feldmann, R., Right heart failure in pregnant women with cyanotic congenital heart disease--The good, the bad and the ugly. *International journal of cardiology* **2016**, 202, 773-5.
 71. McGoon, M.; Gutterman, D.; Steen, V.; Barst, R.; McCrory, D. C.; Fortin, T. A.; Loyd, J. E.; American College of Chest, P., Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **2004**, 126, (1 Suppl), 14S-34S.
 72. MacGregor, A. J.; Canavan, R.; Knight, C.; Denton, C. P.; Davar, J.; Coghlan, J.; Black, C. M., Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: risk factors for progression and consequences for survival. *Rheumatology* **2001**, 40, (4), 453-9.
 73. Grunig, E.; Janssen, B.; Mereles, D.; Barth, U.; Borst, M. M.; Vogt, I. R.; Fischer, C.; Olschewski, H.; Kuecherer, H. F.; Kubler, W., Abnormal pulmonary artery pressure response in asymptomatic carriers of primary pulmonary hypertension gene. *Circulation* **2000**, 102, (10), 1145-50.
 74. D'Alonzo, G. E.; Barst, R. J.; Ayres, S. M.; Bergofsky, E. H.; Brundage, B. H.; Detre, K. M.; Fishman, A. P.; Goldring, R. M.; Groves, B. M.; Kernis, J. T.; et al., Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of internal medicine* **1991**, 115, (5), 343-9.
 75. "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS)." Nazzareno Galie, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gerald Simonneau, Andrew Peacock, Anton Vonk Noordegraaf,

- Maurice Beghetti, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, Georg Hansmann, Walter Klepetko, Patrizio Lancellotti, Marco Matucci, Theresa McDonagh, Luc A. Pierard, Pedro T. Trindade, Maurizio Zompatori and Marius Hoeper. *Eur Respir J* 2015; 46: 903-975. *The European respiratory journal* **2015**, 46, (6), 1855-6.
76. Cheitlin, M. D.; Armstrong, W. F.; Aurigemma, G. P.; Beller, G. A.; Bierman, F. Z.; Davis, J. L.; Douglas, P. S.; Faxon, D. P.; Gillam, L. D.; Kimball, T. R.; Kussmaul, W. G.; Pearlman, A. S.; Philbrick, J. T.; Rakowski, H.; Thys, D. M.; Antman, E. M.; Smith, S. C., Jr.; Alpert, J. S.; Gregoratos, G.; Anderson, J. L.; Hiratzka, L. F.; Faxon, D. P.; Hunt, S. A.; Fuster, V.; Jacobs, A. K.; Gibbons, R. J.; Russell, R. O.; ACC/AHA/ASE 2003 Guideline Update for the Clinical Application of Echocardiography: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* **2003**, 16, (10), 1091-110.
 77. Meluzin, J.; Spinarova, L.; Bakala, J.; Toman, J.; Krejci, J.; Hude, P.; Kara, T.; Soucek, M., Pulsed Doppler tissue imaging of the velocity of tricuspid annular systolic motion; a new, rapid, and non-invasive method of evaluating right ventricular systolic function. *European heart journal* **2001**, 22, (4), 340-8.
 78. Denton, C. P.; Cailles, J. B.; Phillips, G. D.; Wells, A. U.; Black, C. M.; Bois, R. M., Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *British journal of rheumatology* **1997**, 36, (2), 239-43.
 79. Weytjens, C.; Cosyns, B.; D'Hooge, J.; Gallez, C.; Droogmans, S.; Lahoute, T.; Franken, P.; Van Camp, G., Doppler myocardial imaging in adult male rats: reference values and reproducibility of velocity and deformation parameters. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* **2006**, 7, (6), 411-7.
 80. Stenmark, K. R.; Meyrick, B.; Galie, N.; Mooi, W. J.; McMurtry, I. F., Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **2009**, 297, (6), L1013-32.
 81. Tudor, R. M.; Marecki, J. C.; Richter, A.; Fijalkowska, I.; Flores, S., Pathology of pulmonary hypertension. *Clinics in chest medicine* **2007**, 28, (1), 23-42, vii.
 82. Montani, D.; Gunther, S.; Dorfmüller, P.; Perros, F.; Girerd, B.; Garcia, G.; Jais, X.; Savale, L.; Artaud-Macari, E.; Price, L. C.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Sitbon, O., Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases* **2013**, 8, 97.
 83. al-Sabbagh, M. R.; Steen, V. D.; Zee, B. C.; Nalesnik, M.; Trostle, D. C.; Bedetti, C. D.; Medsger, T. A., Jr., Pulmonary arterial histology and morphometry in systemic sclerosis: a case-control autopsy study. *The Journal of rheumatology* **1989**, 16, (8), 1038-42.
 84. Montani, D.; Savale, L.; Natali, D.; Jais, X.; Herve, P.; Garcia, G.; Humbert, M.; Simonneau, G.; Sitbon, O., Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European heart journal* **2010**, 31, (15), 1898-907.
 85. Azevedo, M. F.; Fauch, F. R.; Bimpaki, E.; Horvath, A.; Levy, I.; de Alexandre, R. B.; Ahmad, F.; Manganiello, V.; Stratakis, C. A., Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocrine reviews* **2014**, 35, (2), 195-233.

86. Giaid, A.; Saleh, D., Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* **1995**, 333, (4), 214-21.
87. Morris, C. R.; Kato, G. J.; Poljakovic, M.; Wang, X.; Blackwelder, W. C.; Sachdev, V.; Hazen, S. L.; Vichinsky, E. P.; Morris, S. M., Jr.; Gladwin, M. T., Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama* **2005**, 294, (1), 81-90.
88. Aldashev, A. A.; Kojonazarov, B. K.; Amatov, T. A.; Sooronbaev, T. M.; Mirrakhimov, M. M.; Morrell, N. W.; Wharton, J.; Wilkins, M. R., Phosphodiesterase type 5 and high altitude pulmonary hypertension. *Thorax* **2005**, 60, (8), 683-7.
89. Mitchell, J. A.; Ahmetaj-Shala, B.; Kirkby, N. S.; Wright, W. R.; Mackenzie, L. S.; Reed, D. M.; Mohamed, N., Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Global cardiology science & practice* **2014**, 2014, (4), 382-93.
90. Christman, B. W.; McPherson, C. D.; Newman, J. H.; King, G. A.; Bernard, G. R.; Groves, B. M.; Loyd, J. E., An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* **1992**, 327, (2), 70-5.
91. Tuder, R. M.; Cool, C. D.; Geraci, M. W.; Wang, J.; Abman, S. H.; Wright, L.; Badesch, D.; Voelkel, N. F., Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **1999**, 159, (6), 1925-32.
92. Seo, B.; Oemar, B. S.; Siebenmann, R.; von Segesser, L.; Luscher, T. F., Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* **1994**, 89, (3), 1203-8.
93. Montani, D.; Souza, R.; Binkert, C.; Fischli, W.; Simonneau, G.; Clozel, M.; Humbert, M., Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension. *Chest* **2007**, 131, (1), 101-8.
94. Rubens, C.; Ewert, R.; Halank, M.; Wensel, R.; Orzechowski, H. D.; Schultheiss, H. P.; Hoeffken, G., Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* **2001**, 120, (5), 1562-9.
95. Ma, L.; Roman-Campos, D.; Austin, E. D.; Eyries, M.; Sampson, K. S.; Soubrier, F.; Germain, M.; Tregouet, D. A.; Borczuk, A.; Rosenzweig, E. B.; Girerd, B.; Montani, D.; Humbert, M.; Loyd, J. E.; Kass, R. S.; Chung, W. K., A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* **2013**, 369, (4), 351-361.
96. Weir, E. K.; Reeve, H. L.; Huang, J. M.; Michelakis, E.; Nelson, D. P.; Hampl, V.; Archer, S. L., Anorexic agents aminorex, fenfluramine, and dexfenfluramine inhibit potassium current in rat pulmonary vascular smooth muscle and cause pulmonary vasoconstriction. *Circulation* **1996**, 94, (9), 2216-20.
97. Rothman, R. B.; Ayestas, M. A.; Dersch, C. M.; Baumann, M. H., Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation* **1999**, 100, (8), 869-75.
98. Herve, P.; Launay, J. M.; Scrobohaci, M. L.; Brenot, F.; Simonneau, G.; Petitpretz, P.; Poubeau, P.; Cerrina, J.; Duroux, P.; Drouet, L., Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American journal of medicine* **1995**, 99, (3), 249-54.
99. Balabanian, K.; Foussat, A.; Dorfmueller, P.; Durand-Gasselin, I.; Capel, F.; Bouchet-Delbos, L.; Portier, A.; Marfaing-Koka, A.; Krzysiek, R.; Rimaniol, A. C.; Simonneau, G.; Emilie, D.; Humbert, M., CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2002**, 165, (10), 1419-25.

100. Condcliffe, R.; Howard, L. S., Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *F1000prime reports* **2015**, 7, 06.
101. Nicolls, M. R.; Taraseviciene-Stewart, L.; Rai, P. R.; Badesch, D. B.; Voelkel, N. F., Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *The European respiratory journal* **2005**, 26, (6), 1110-8.
102. Kherbeck, N.; Tamby, M. C.; Bussone, G.; Dib, H.; Perros, F.; Humbert, M.; Mouthon, L., The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clinical reviews in allergy & immunology* **2013**, 44, (1), 31-8.
103. Tanaka, E.; Harigai, M.; Tanaka, M.; Kawaguchi, Y.; Hara, M.; Kamatani, N., Pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus: evaluation of clinical characteristics and response to immunosuppressive treatment. *The Journal of rheumatology* **2002**, 29, (2), 282-7.
104. Sitbon, O.; Humbert, M.; Jais, X.; Ioos, V.; Hamid, A. M.; Provencher, S.; Garcia, G.; Parent, F.; Herve, P.; Simonneau, G., Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **2005**, 111, (23), 3105-11.
105. Moncada, S.; Gryglewski, R.; Bunting, S.; Vane, J. R., An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **1976**, 263, (5579), 663-5.
106. Rubin, L. J.; Mendoza, J.; Hood, M.; McGoon, M.; Barst, R.; Williams, W. B.; Diehl, J. H.; Crow, J.; Long, W., Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Annals of internal medicine* **1990**, 112, (7), 485-91.
107. O'Callaghan, D. S.; Savale, L.; Montani, D.; Jais, X.; Sitbon, O.; Simonneau, G.; Humbert, M., Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nature reviews. Cardiology* **2011**, 8, (9), 526-38.
108. Barst, R. J.; Rubin, L. J.; McGoon, M. D.; Caldwell, E. J.; Long, W. A.; Levy, P. S., Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Annals of internal medicine* **1994**, 121, (6), 409-15.
109. Shapiro, S. M.; Oudiz, R. J.; Cao, T.; Romano, M. A.; Beckmann, X. J.; Georgiou, D.; Mandayam, S.; Ginzton, L. E.; Brundage, B. H., Primary pulmonary hypertension: improved long-term effects and survival with continuous intravenous epoprostenol infusion. *J Am Coll Cardiol* **1997**, 30, (2), 343-9.
110. Higenbottam, T.; Butt, A. Y.; McMahon, A.; Westerbeck, R.; Sharples, L., Long-term intravenous prostaglandin (epoprostenol or iloprost) for treatment of severe pulmonary hypertension. *Heart* **1998**, 80, (2), 151-5.
111. Olschewski, H.; Simonneau, G.; Galie, N.; Higenbottam, T.; Naeije, R.; Rubin, L. J.; Nikkho, S.; Speich, R.; Hoeper, M. M.; Behr, J.; Winkler, J.; Sitbon, O.; Popov, W.; Ghofrani, H. A.; Manes, A.; Kiely, D. G.; Ewert, R.; Meyer, A.; Corris, P. A.; Delcroix, M.; Gomez-Sanchez, M.; Siedentop, H.; Seeger, W.; Aerosolized Iloprost Randomized Study, G., Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* **2002**, 347, (5), 322-9.
112. Tapson, V. F.; Gomberg-Maitland, M.; McLaughlin, V. V.; Benza, R. L.; Widlitz, A. C.; Krichman, A.; Barst, R. J., Safety and efficacy of IV treprostinil for pulmonary arterial hypertension: a prospective, multicenter, open-label, 12-week trial. *Chest* **2006**, 129, (3), 683-8.
113. Barst, R. J.; Galie, N.; Naeije, R.; Simonneau, G.; Jeffs, R.; Arneson, C.; Rubin, L. J., Long-term outcome in pulmonary arterial hypertension patients treated with subcutaneous treprostinil. *The European respiratory journal* **2006**, 28, (6), 1195-203.
114. Jing, Z. C.; Parikh, K.; Pulido, T.; Jerjes-Sanchez, C.; White, R. J.; Allen, R.; Torbicki, A.; Xu, K. F.; Yehle, D.; Laliberte, K.; Arneson, C.; Rubin, L. J., Efficacy and safety of

- oral treprostinil monotherapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a randomized, controlled trial. *Circulation* **2013**, 127, (5), 624-33.
115. Humbert, M.; Ghofrani, H. A., The molecular targets of approved treatments for pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **2016**, 71, (1), 73-83.
 116. Rubin, L. J.; Badesch, D. B.; Barst, R. J.; Galie, N.; Black, C. M.; Keogh, A.; Pulido, T.; Frost, A.; Roux, S.; Leconte, I.; Landzberg, M.; Simonneau, G., Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* **2002**, 346, (12), 896-903.
 117. Channick, R. N.; Simonneau, G.; Sitbon, O.; Robbins, I. M.; Frost, A.; Tapson, V. F.; Badesch, D. B.; Roux, S.; Rainisio, M.; Bodin, F.; Rubin, L. J., Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **2001**, 358, (9288), 1119-23.
 118. Pulido, T.; Adzerikho, I.; Channick, R. N.; Delcroix, M.; Galie, N.; Ghofrani, H. A.; Jansa, P.; Jing, Z. C.; Le Brun, F. O.; Mehta, S.; Mittelholzer, C. M.; Perchenet, L.; Sastry, B. K.; Sitbon, O.; Souza, R.; Torbicki, A.; Zeng, X.; Rubin, L. J.; Simonneau, G.; Investigators, S., Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* **2013**, 369, (9), 809-18.
 119. Galie, N.; Badesch, D.; Oudiz, R.; Simonneau, G.; McGoon, M. D.; Keogh, A. M.; Frost, A. E.; Zwicke, D.; Naeije, R.; Shapiro, S.; Olschewski, H.; Rubin, L. J., Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **2005**, 46, (3), 529-35.
 120. Galie, N.; Olschewski, H.; Oudiz, R. J.; Torres, F.; Frost, A.; Ghofrani, H. A.; Badesch, D. B.; McGoon, M. D.; McLaughlin, V. V.; Roecker, E. B.; Gerber, M. J.; Dufton, C.; Wiens, B. L.; Rubin, L. J.; Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, R. D.-B. P.-C. M. E. S. G., Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* **2008**, 117, (23), 3010-9.
 121. Oudiz, R. J.; Galie, N.; Olschewski, H.; Torres, F.; Frost, A.; Ghofrani, H. A.; Badesch, D. B.; McGoon, M. D.; McLaughlin, V. V.; Roecker, E. B.; Harrison, B. C.; Despain, D.; Dufton, C.; Rubin, L. J.; Group, A. S., Long-term ambrisentan therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **2009**, 54, (21), 1971-81.
 122. Seferian, A.; Simonneau, G., Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **2013**, 22, (129), 217-26.
 123. Barnett, C. F.; Machado, R. F., Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vascular health and risk management* **2006**, 2, (4), 411-22.
 124. Oudiz, R. J.; Brundage, B. H.; Galie, N.; Ghofrani, H. A.; Simonneau, G.; Botros, F. T.; Chan, M.; Beardsworth, A.; Barst, R. J.; Group, P. S., Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study. *J Am Coll Cardiol* **2012**, 60, (8), 768-74.
 125. Jing, Z. C.; Yu, Z. X.; Shen, J. Y.; Wu, B. X.; Xu, K. F.; Zhu, X. Y.; Pan, L.; Zhang, Z. L.; Liu, X. Q.; Zhang, Y. S.; Jiang, X.; Galie, N.; Efficacy; Safety of Vardenafil in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension Study, G., Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2011**, 183, (12), 1723-9.
 126. Macchia, A.; Marchioli, R.; Tognoni, G.; Scarano, M.; Marfisi, R.; Tavazzi, L.; Rich, S., Systematic review of trials using vasodilators in pulmonary arterial hypertension: why a new approach is needed. *American heart journal* **2010**, 159, (2), 245-57.

127. Humbert, M.; Sitbon, O.; Simonneau, G., Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* **2004**, 351, (14), 1425-36.
128. Nakata, T. M.; Tanaka, R.; Yoshiyuki, R.; Fukayama, T.; Goya, S.; Fukushima, R., Effects of Single Drug and Combined Short-term Administration of Sildenafil, Pimobendan, and Nicorandil on Right Ventricular Function in Rats With Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology* **2015**, 65, (6), 640-8.
129. Iglarz, M.; Landskroner, K.; Bauer, Y.; Vercauteren, M.; Rey, M.; Renault, B.; Studer, R.; Vezzali, E.; Freti, D.; Hadana, H.; Schlapfer, M.; Cattaneo, C.; Bortolamiol, C.; Weber, E.; Whitby, B. R.; Delahaye, S.; Wanner, D.; Steiner, P.; Nayler, O.; Hess, P.; Clozel, M., Comparison of Macitentan and Bosentan on Right Ventricular Remodeling in a Rat Model of Non-vasoreactive Pulmonary Hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology* **2015**, 66, (5), 457-67.
130. Zeineh, N. S.; Bachman, T. N.; El-Haddad, H.; Champion, H. C., Effects of acute intravenous iloprost on right ventricular hemodynamics in rats with chronic pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation* **2014**, 4, (4), 612-8.
131. Polonio, I. B.; Acencio, M. M.; Pazetti, R.; Almeida, F. M.; Silva, B. S.; Pereira, K. A.; Souza, R., Lodenafil treatment in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia* **2014**, 40, (4), 421-4.
132. Gomez-Arroyo, J. G.; Farkas, L.; Alhussaini, A. A.; Farkas, D.; Kraskauskas, D.; Voelkel, N. F.; Bogaard, H. J., The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **2012**, 302, (4), L363-9.
133. Kay, J. M.; Harris, P.; Heath, D., Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **1967**, 22, (2), 176-9.
134. Pitanga, B. P.; Nascimento, R. P.; Silva, V. D.; Costa, S. L., The Role of Astrocytes in Metabolism and Neurotoxicity of the Pyrrolizidine Alkaloid Monocrotaline, the Main Toxin of *Crotalaria retusa*. *Frontiers in pharmacology* **2012**, 3, 144.
135. Rosenberg, H. C.; Rabinovitch, M., Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American journal of physiology* **1988**, 255, (6 Pt 2), H1484-91.
136. Pandalis, G., [Confusion of wild garlic/meadow saffron/lily of the valley. That is even beyond the lay person]. *MMW Fortschritte der Medizin* **2003**, 145, (19), 14.
137. Brvar, M.; Kozelj, G.; Mozina, M.; Bunc, M., Acute poisoning with autumn crocus (*Colchicum autumnale* L.). *Wiener klinische Wochenschrift* **2004**, 116, (5-6), 205-8.
138. Gabrscek, L.; Lesnicar, G.; Krivec, B.; Voga, G.; Sibanc, B.; Blatnik, J.; Jagodic, B., Accidental poisoning with autumn crocus. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* **2004**, 42, (1), 85-8.
139. Kubec, R.; Dadakova, E., Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatography. A* **2008**, 1212, (1-2), 154-7.
140. Sobolewska, D.; Janeczko, Z.; Kisiel, W.; Podolak, I.; Galanty, A.; Trojanowska, D., Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta poloniae pharmaceutica* **2006**, 63, (3), 219-23.
141. Stajner, D.; Popovic, B. M.; Canadanovic-Brunet, J.; Stajner, M., Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia* **2008**, 79, (4), 303-5.
142. Putnoky, S.; Caunii, A.; Butnariu, M., Study on the stability and antioxidant effect of the *Allium ursinum* watery extract. *Chemistry Central journal* **2013**, 7, (1), 21.

143. Bagiu, R. V.; Vlaicu, B.; Butnariu, M., Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International journal of molecular sciences* **2012**, 13, (2), 1426-36.
144. Mihaylova, D. S.; Lante, A.; Tinello, F.; Krastanov, A. I., Study on the antioxidant and antimicrobial activities of *Allium ursinum* L. pressurised-liquid extract. *Natural product research* **2014**, 28, (22), 2000-5.
145. Ivanova, A.; Mikhova, B.; Najdenski, H.; Tsvetkova, I.; Kostova, I., Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian origin. *Natural product communications* **2009**, 4, (8), 1059-62.
146. Sendl, A.; Elbl, G.; Steinke, B.; Redl, K.; Breu, W.; Wagner, H., Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta medica* **1992**, 58, (1), 1-7.
147. Preuss, H. G.; Clouatre, D.; Mohamadi, A.; Jarrell, S. T., Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats. *International urology and nephrology* **2001**, 32, (4), 525-30.
148. Mohamadi, A.; Jarrell, S. T.; Shi, S. J.; Andrawis, N. S.; Myers, A.; Clouatre, D.; Preuss, H. G., Effects of wild versus cultivated garlic on blood pressure and other parameters in hypertensive rats. *Heart disease* **2000**, 2, (1), 3-9.
149. Rietz, B.; Isensee, H.; Strobach, H.; Makdessi, S.; Jacob, R., Cardioprotective actions of wild garlic (*allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry* **1993**, 119, (1-2), 143-50.
150. Sendl, A.; Schliack, M.; Loser, R.; Stanislaus, F.; Wagner, H., Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic. *Atherosclerosis* **1992**, 94, (1), 79-85.
151. Lines, T. C.; Ono, M., FRS 1000, an extract of red onion peel, strongly inhibits phosphodiesterase 5A (PDE 5A). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2006**, 13, (4), 236-9.
152. Kuroda, M.; Mimaki, Y.; Kameyama, A.; Sashida, Y.; Nikaido, T., Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺/K⁺ ATPase. *Phytochemistry* **1995**, 40, (4), 1071-6.
153. Jasinska-Stroschein, M.; Owczarek, J.; Luczak, A.; Orszulak-Michalak, D., The beneficial impact of fasudil and sildenafil on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: a hemodynamic and biochemical study. *Pharmacology* **2013**, 91, (3-4), 178-84.
154. Schermuly, R. T.; Dony, E.; Ghofrani, H. A.; Pullamsetti, S.; Savai, R.; Roth, M.; Sydykov, A.; Lai, Y. J.; Weissmann, N.; Seeger, W.; Grimminger, F., Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* **2005**, 115, (10), 2811-21.
155. Lajter, I.; Vasas, A.; Beni, Z.; Forgo, P.; Binder, M.; Bochkov, V.; Zupko, I.; Krupitza, G.; Frisch, R.; Kopp, B.; Hohmann, J., Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Journal of natural products* **2014**, 77, (3), 576-82.
156. Roza, O.; Lovasz, N.; Zupko, I.; Hohmann, J.; Csupor, D., Sympathomimetic activity of a *Hoodia gordonii* product: a possible mechanism of cardiovascular side effects. *BioMed research international* **2013**, 2013, 171059.
157. Wang, J.; Sporns, P., MALDI-TOF MS analysis of food flavonol glycosides. *Journal of agricultural and food chemistry* **2000**, 48, (5), 1657-62.
158. The Metabolomics Workbench. <http://www.metabolomicsworkbench.org/>
159. Kovacs, A.; Fulop, G. A.; Kovacs, A.; Csipo, T.; Bodi, B.; Priksz, D.; Juhasz, B.; Beke, L.; Hendrik, Z.; Mehes, G.; Granzier, H. L.; Edes, I.; Fagyas, M.; Papp, Z.; Barta, J.;

- Toth, A., Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2016**, 310, (11), H1671-82.
160. Bombicz, M.; Priks, D.; Varga, B.; Gesztelyi, R.; Kertesz, A.; Lengyel, P.; Balogh, P.; Csupor, D.; Hohmann, J.; Bhattoa, H. P.; Haines, D. D.; Juhasz, B., Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (8).
 161. Bombicz, M.; Priks, D.; Varga, B.; Kurucz, A.; Kertesz, A.; Takacs, A.; Posa, A.; Kiss, R.; Szilvassy, Z.; Juhasz, B., A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil. *International journal of molecular sciences* **2017**, 18, (7).
 162. Hlavacova, M.; Olejnickova, V.; Ronzhina, M.; Stracina, T.; Janousek, O.; Novakova, M.; Babula, P.; Kolarova, J.; Provaznik, I.; Paulova, H., Tolerance of isolated rabbit hearts to short ischemic periods is affected by increased LV mass fraction. *Physiological research* **2017**, 66, (4), 581-589.
 163. Opie, L. H., Coronary flow rate and perfusion pressure as determinants of mechanical function and oxidative metabolism of isolated perfused rat heart. *The Journal of physiology* **1965**, 180, (3), 529-41.
 164. Nunnari, J. J.; Zand, T.; Joris, I.; Majno, G., Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Experimental and molecular pathology* **1989**, 51, (1), 1-8.
 165. Dumasquier, C. M.; Dibrov, E.; Kneesh, A. L.; Cheung, P. K.; Lee, K. G.; Alexander, H. K.; Yeganeh, B. K.; Moghadasian, M. H.; Pierce, G. N., Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2007**, 293, (4), H2394-402.
 166. Tang, J.; Xie, Q.; Pan, G.; Wang, J.; Wang, M., Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **2006**, 30, (2), 353-61.
 167. Wagenaar, G. T.; Laghmani el, H.; Fidler, M.; Sengers, R. M.; de Visser, Y. P.; de Vries, L.; Rink, R.; Roks, A. J.; Folkerts, G.; Walther, F. J., Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **2013**, 305, (5), L341-51.
 168. Porvasnik, S. L.; Germain, S.; Embury, J.; Gannon, K. S.; Jacques, V.; Murray, J.; Byrne, B. J.; Shacham, S.; Al-Mousily, F., PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2010**, 334, (2), 364-72.
 169. Xiao, R.; Su, Y.; Feng, T.; Sun, M.; Liu, B.; Zhang, J.; Lu, Y.; Li, J.; Wang, T.; Zhu, L.; Hu, Q., Monocrotaline Induces Endothelial Injury and Pulmonary Hypertension by Targeting the Extracellular Calcium-Sensing Receptor. *Journal of the American Heart Association* **2017**, 6, (4).
 170. Juhasz, B.; Kertesz, A.; Balla, J.; Balla, G.; Szabo, Z.; Bombicz, M.; Priks, D.; Gesztelyi, R.; Varga, B.; Haines, D. D.; Tosaki, A., Cardioprotective effects of sour cherry seed extract (SCSE) on the hypercholesterolemic rabbit heart. *Current pharmaceutical design* **2013**, 19, (39), 6896-905.

171. Oszmianski, J.; Kolniak-Ostek, J.; Wojdylo, A., Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, 61, (1), 176-84.
172. Carotenuto, A.; De Feo, V.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Cicala, C., The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry* **1996**, 41, (2), 531-6.
173. Leporatti, M. L.; Ivancheva, S., Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of ethnopharmacology* **2003**, 87, (2-3), 123-42.
174. Sytar, O.; Bruckova, K.; Hunkova, E.; Zivcak, M.; Konate, K.; Brestic, M., The application of multiplex fluorimetric sensor for the analysis of flavonoids content in the medicinal herbs family Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae. *Biological research* **2015**, 48, 5.
175. Rybak, M. E.; Calvey, E. M.; Harnly, J. M., Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, 52, (4), 682-7.
176. Ariga, T.; Seki, T., Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *BioFactors* **2006**, 26, (2), 93-103.
177. Salman, H.; Bergman, M.; Bessler, H.; Punskey, I.; Djaldetti, M., Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *International journal of immunopharmacology* **1999**, 21, (9), 589-97.
178. Ramji, D. P.; Davies, T. S., Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine & growth factor reviews* **2015**, 26, (6), 673-85.
179. Tribouilloy, C.; Grigioni, F.; Avierinos, J. F.; Barbieri, A.; Rusinaru, D.; Szymanski, C.; Ferlito, M.; Tafanelli, L.; Bursi, F.; Trojette, F.; Branzi, A.; Habib, G.; Modena, M. G.; Enriquez-Sarano, M.; Investigators, M., Survival implication of left ventricular end-systolic diameter in mitral regurgitation due to flail leaflets a long-term follow-up multicenter study. *J Am Coll Cardiol* **2009**, 54, (21), 1961-8.
180. Carluccio, E.; Biagioli, P.; Zuchi, C.; Bardelli, G.; Murrone, A.; Lauciello, R.; D'Addario, S.; Mengoni, A.; Alunni, G.; Ambrosio, G., Fibrosis assessment by integrated backscatter and its relationship with longitudinal deformation and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction. *The international journal of cardiovascular imaging* **2016**, 32, (7), 1071-80.
181. Kjaergaard, J.; Iversen, K. K.; Akkan, D.; Moller, J. E.; Kober, L. V.; Torp-Pedersen, C.; Hassager, C., Predictors of right ventricular function as measured by tricuspid annular plane systolic excursion in heart failure. *Cardiovascular ultrasound* **2009**, 7, 51.
182. Yoshiyuki, R.; Tanaka, R.; Fukushima, R.; Machida, N., Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Experimental animals* **2016**, 65, (3), 215-22.
183. Savai, R.; Al-Tamari, H. M.; Sedding, D.; Kojonazarov, B.; Muecke, C.; Teske, R.; Capecchi, M. R.; Weissmann, N.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Schermuly, R. T.; Pullamsetti, S. S., Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **2014**, 20, (11), 1289-300.
184. Thibault, H. B.; Kurtz, B.; Raher, M. J.; Shaik, R. S.; Waxman, A.; Derumeaux, G.; Halpern, E. F.; Bloch, K. D.; Scherrer-Crosbie, M., Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circulation. Cardiovascular imaging* **2010**, 3, (2), 157-63.

185. Bell, R. M.; Mocanu, M. M.; Yellon, D. M., Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2011**, 50, (6), 940-50.
186. Vidavalur, R.; Swarnakar, S.; Thirunavukkarasu, M.; Samuel, S. M.; Maulik, N., Ex vivo and in vivo approaches to study mechanisms of cardioprotection targeting ischemia/reperfusion (i/r) injury: useful techniques for cardiovascular drug discovery. *Current drug discovery technologies* **2008**, 5, (4), 269-78.
187. Vecsernyes, M.; Szokol, M.; Bombicz, M.; Priks, D.; Gesztelyi, R.; Fulop, G. A.; Varga, B.; Juhasz, B.; Haines, D.; Tosaki, A., Alpha-Melanocyte-stimulating Hormone Induces Vasodilation and Exerts Cardioprotection Through the Heme-Oxygenase Pathway in Rat Hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology* **2017**, 69, (5), 286-297.
188. Juhasz, B.; Varga, B.; Czompa, A.; Bak, I.; Lekli, I.; Gesztelyi, R.; Zsuga, J.; Kemeny-Beke, A.; Antal, M.; Szendrei, L.; Tosaki, A., Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium. *J Cell Mol Med* **2011**, 15, (9), 1973-82.
189. Csepanyi, E.; Czompa, A.; Haines, D.; Lekli, I.; Bakondi, E.; Balla, G.; Tosaki, A.; Bak, I., Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacol Res* **2015**, 100, 148-56.
190. Czompa, A.; Gyongyosi, A.; Czegledi, A.; Csepanyi, E.; Bak, I.; Haines, D. D.; Tosaki, A.; Lekli, I., Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1. *Journal of cardiovascular pharmacology* **2014**, 64, (5), 412-9.
191. Haines, D. D.; Bak, I.; Ferdinandy, P.; Mahmoud, F. F.; Al-Harbi, S. A.; Blasig, I. E.; Tosaki, A., Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology* **2000**, 35, (1), 37-44.
192. Isoyama, S.; Maruyama, Y.; Ashikawa, K.; Sato, S.; Suzuki, H.; Watanabe, J.; Shimizu, Y.; Ino-Oka, E.; Takishima, T., Effects of afterload reduction on global left ventricular and regional myocardial functions in the isolated canine heart with stenosis of a coronary arterial branch. *Circulation* **1983**, 67, (1), 139-47.
193. Nogueira-Ferreira, R.; Vitorino, R.; Ferreira, R.; Henriques-Coelho, T., Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **2015**, 35, 8-16.
194. Ryan, J. J.; Marsboom, G.; Archer, S. L., Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. *Handbook of experimental pharmacology* **2013**, 218, 105-49.
195. Bae, H. K.; Lee, H.; Kim, K. C.; Hong, Y. M., The effect of sildenafil on right ventricular remodeling in a rat model of monocrotaline-induced right ventricular failure. *Korean journal of pediatrics* **2016**, 59, (6), 262-70.
196. Lee, M. Y.; Tsai, K. B.; Hsu, J. H.; Shin, S. J.; Wu, J. R.; Yeh, J. L., Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways. *Scientific reports* **2016**, 6, 31788.
197. Huang, T. H.; Chung, S. Y.; Chua, S.; Chai, H. T.; Sheu, J. J.; Chen, Y. L.; Chen, C. H.; Chang, H. W.; Tong, M. S.; Sung, P. H.; Sun, C. K.; Lu, H. I.; Yip, H. K., Effect of early administration of lower dose versus high dose of fresh mitochondria on reducing monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rat. *American journal of translational research* **2016**, 8, (12), 5151-5168.
198. Lewis, G. D.; Shah, R.; Shahzad, K.; Camuso, J. M.; Pappagianopoulos, P. P.; Hung, J.; Tawakol, A.; Gerszten, R. E.; Systrom, D. M.; Bloch, K. D.; Semigran, M. J., Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension. *Circulation* **2007**, 116, (14), 1555-62.

199. Shah, S. J.; Thenappan, T.; Rich, S.; Tian, L.; Archer, S. L.; Gomberg-Maitland, M., Association of serum creatinine with abnormal hemodynamics and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **2008**, 117, (19), 2475-83.
200. Haines, D. D.; Lekli, I.; Teissier, P.; Bak, I.; Tosaki, A., Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta Physiol (Oxf)* **2012**, 204, (4), 487-501.
201. Choi, A. M.; Alam, J., Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1996**, 15, (1), 9-19.
202. Tomaro, M. L.; Batlle, A. M., Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2002**, 34, (3), 216-20.
203. Araujo, J. A.; Zhang, M.; Yin, F., Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology* **2012**, 3, 119.
204. Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J., Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, 116, (2), 205-19.
205. Maslov, L. N.; Naryzhnaia, N. V.; Podoksenov Iu, K.; Prokudina, E. S.; Gorbunov, A. S.; Zhang, I.; Pei Zh, M., [Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion]. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova* **2015**, 101, (1), 3-24.
206. Bears, H.; Richards, J. G.; Schulte, P. M., Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic toxicology* **2006**, 77, (3), 257-66.
207. Bagatini, M. D.; Martins, C. C.; Battisti, V.; Gasparetto, D.; da Rosa, C. S.; Spanevello, R. M.; Ahmed, M.; Schmatz, R.; Schetinger, M. R.; Morsch, V. M., Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart and vessels* **2011**, 26, (1), 55-63.
208. Elias-Al-Mamun, M.; Satoh, K.; Tanaka, S.; Shimizu, T.; Nergui, S.; Miyata, S.; Fukumoto, Y.; Shimokawa, H., Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **2014**, 78, (4), 967-76.
209. Kuang, T.; Wang, J.; Pang, B.; Huang, X.; Burg, E. D.; Yuan, J. X.; Wang, C., Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **2010**, 23, (5), 456-64.
210. Nagendran, J.; Archer, S. L.; Soliman, D.; Gurtu, V.; Moudgil, R.; Haromy, A.; St Aubin, C.; Webster, L.; Rebeyka, I. M.; Ross, D. B.; Light, P. E.; Dyck, J. R.; Michelakis, E. D., Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* **2007**, 116, (3), 238-48.
211. Kass, D. A.; Champion, H. C.; Beavo, J. A., Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation research* **2007**, 101, (11), 1084-95.
212. Hanson, K. A.; Ziegler, J. W.; Rybalkin, S. D.; Miller, J. W.; Abman, S. H.; Clarke, W. R., Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *The American journal of physiology* **1998**, 275, (5 Pt 1), L931-41.
213. Lochhead, A.; Nekrasova, E.; Arshavsky, V. Y.; Pyne, N. J., The regulation of the cGMP-binding cGMP phosphodiesterase by proteins that are immunologically related to gamma subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* **1997**, 272, (29), 18397-403.

214. Corbin, J. D.; Beasley, A.; Blount, M. A.; Francis, S. H., High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 334, (3), 930-8.
215. Vaidya, B.; Pangallo, M.; Ruffenach, G.; Cunningham, C. M.; Perron, J. C.; Kolluru, S.; Eghbali, M.; Gupta, V., Advances in treatment of pulmonary arterial hypertension: patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **2017**, 27, (8), 907-918.
216. Ahmed, M.; VanPatten, S.; Lakshminrusimha, S.; Patel, H.; Coleman, T. R.; Al-Abed, Y., Effects of novel muscarinic M3 receptor ligand C1213 in pulmonary arterial hypertension models. *Physiological reports* **2016**, 4, (24).
217. Leopold, J. A.; Maron, B. A., Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (5).
218. Stange, E.; Agostini, B.; Paenberg, J., Changes in rabbit lipoprotein properties by dietary cholesterol, and saturated and polyunsaturated fats. *Atherosclerosis* **1975**, 22, (1), 125-48.
219. Cohen, E.; Aviram, M.; Khatib, S.; Volkova, N.; Vaya, J., Human carotid atherosclerotic plaque protein(s) change HDL protein(s) composition and impair HDL anti-oxidant activity. *BioFactors* **2016**, 42, (1), 115-28.
220. Thanassoulis, G.; Williams, K.; Ye, K.; Brook, R.; Couture, P.; Lawler, P. R.; de Graaf, J.; Furberg, C. D.; Sniderman, A., Relations of change in plasma levels of LDL-C, non-HDL-C and apoB with risk reduction from statin therapy: a meta-analysis of randomized trials. *Journal of the American Heart Association* **2014**, 3, (2), e000759.
221. Kim, E. J.; Kim, B. H.; Seo, H. S.; Lee, Y. J.; Kim, H. H.; Son, H. H.; Choi, M. H., Cholesterol-induced non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis aggravated by systemic inflammation. *PloS one* **2014**, 9, (6), e97841.
222. Hui, C.; Like, W.; Yan, F.; Tian, X.; Qiuyan, W.; Lifeng, H., S-allyl-L-cysteine sulfoxide inhibits tumor necrosis factor-alpha induced monocyte adhesion and intercellular cell adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Anatomical record* **2010**, 293, (3), 421-30.
223. Ankri, S.; Mirelman, D., Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection* **1999**, 1, (2), 125-9.
224. Farkas, A.; Molnar, R.; Morschhauser, T.; Hahn, I., Variation in nectar volume and sugar concentration of *Allium ursinum* L. ssp. *ucrainicum* in three habitats. *ScientificWorldJournal* **2012**, 2012, 138579.

8. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: hipertrófia, ateroszklerózis, monokrotalin (MCT), pulmonális artériás hipertónia (PAH), hiperkoleszterinémia, iszkémia/reperfúzió, hemoxigenáz-1 (HO-1), transztorakális echokardiográfia (TTE), reaktív oxigén gyökök (ROS)

Angol tárgyszavak: hyperthrophy, atherosclerosis, monocrotaline (MCT), pulmonary arterial hypertension (PAH), hypercholesterolaemia, ischemia/reperfusion, hemoxygenase-1 (HO-1), echocardiography, reactive oxygen species (ROS)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az általa vezetett DE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Juhász Béla egyetemi docensnek a közös munka lehetőségét, szakmai instrukciókat, hasznos tanácsokat és végtelen türelmet.

Köszönettel tartozom közvetlen kollégáimnak, Dr. Priksz Dánielnek, Dr. Varga Balázsnak, Dr. Gesztelyi Rudolfnak, Dr. Kurucz Andreának és valamennyi kedves jelenlegi illetve volt munkatársamnak, hogy szakmai, illetve bármely egyéb módon nyújtott önzetlen segítségükkel hozzájárultak tudományos munkásságomhoz.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Miklós professzor úrnak, Hegedűs Krisztinának (DE ÁOK, Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Tanszék) és Dr. Hortobágyi Tibor egyetemi docensnek (DE Neuropatológiai Tanszék) a szövettani metszetek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni Dr. Tóth Attila egyetemi tanárnak és munkatársainak (DE Klinikai Fiziológiai Tanszék), Dr. Hohmann Juditnak és Dr. Csupor Dezsőnek (SZTE GYTK Farmakognóziái Intézet), Dr. Lengyel Péternek, Dr. Balogh Péternek, Dr. Harjit Bhattoa Pálnak, David D. Hainesnek, Dr. Kertész Attilának (DE Kardiológiai Intézet) és Takács Ákosnak, hogy elősegítették kollaborációs munkánkat és a közös publikációk megjelenését.

Végül, de nem utolsósorban férjem, családom és barátaim szerető támogatását.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00043, Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART) kereteiből valósult meg. A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális alap társfinanszírozásával valósult meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/75/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bombicz Mariann
Neptun kód: BOMA
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038141

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., Kurucz, A., Kertész, A. B., Takács, Á., Pósa, A., Kiss, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil.
Int. J. Mol. Sci. 18 (7), 1-19, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071436>
IF: 3.226 (2016)
2. Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., Gesztelyi, R., Kertész, A. B., Lengyel, P., Balogh, P., Csupor, D., Hohmann, J., Bhattoa, H. P., Haines, D. D., Juhász, B.: Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits.
Int. J. Mol. Sci. 17 (8), E1284, 2016.
IF: 3.226

További közlemények

3. Kurucz, A., Bombicz, M., Kiss, R., Priksz, D., Varga, B., Hortobágyi, T., Trencsényi, G., Szabó, R., Pósa, A., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Heme oxygenase-1 activity as a correlate to exercise-mediated amelioration of cognitive decline and neuropathological alterations in an aging rat model of dementia.
Biomed Res. Int. 2018, 1-13, 2018.
IF: 2.476 (2016)





4. Vecsernyés, M., Szokol, M., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Fülöp, G. Á., Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tótsaki, 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: 2.247 (2016)
5. 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: 2.861 (2016)
6. Varga, B., Priksz, D., Lampé, N., Bombicz, M., Kurucz, A., Szabó, A. M., Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Protective Effect of Prunus Cerasus (Sour Cherry) Seed Extract on the Recovery of Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Damage in Zucker Diabetic Fatty Rat.
Molecules. 22 (10), 1782 [1-12], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>
IF: 2.861 (2016)
7. Fehér, P., Ujhelyi, Z., Váradi, J., Fenyvesi, F., Róka, E., Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., Priksz, D., Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.
Molecules. 21 (10), 1269, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101269>
IF: 2.861
8. Kertész, A. B., Bombicz, M., Priksz, D., Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tótsaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF: 2.339
9. Juhász, B., Kertész, A. B., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tótsaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF: 3.288





10. Varga, B., Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D. D., Szabó, A. M., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tóski, Á.: Protective Effect of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) on the Recovery of Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Retinal Damage in A Rat Model.
J. Mol. Neurosci. 50 (3), 558-570, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-9998-3>
IF: 2.757
11. Gesztelyi, R., Kiss, Z. M., Wachal, Z., Juhász, B., Bombicz, M., Csépanyi, E., Pák, K., Zsuga, J., Papp, C., Galajda, Z., Branzaniuc, K., Pórszász, R., Szentmiklósi, J. A., Tóski, Á.: The surmountable effect of FSCPX, an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, on the negative inotropic action of A1 adenosine receptor full agonists in isolated guinea pig left atria.
Arch. Pharm. Res. 36 (3), 293-305, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0056-z>
IF: 1.751
12. Kalantari, H., Galehdari, H., Zaree, Z., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Bombicz, M., Tóski, Á., Juhász, B.: Toxicological and mutagenic analysis of Artemisia dracunculus (tarragon) extract.
Food Chem. Toxicol. 51, 26-32, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.052>
IF: 2.61

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 32,503

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,452**

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.

