

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Kozma Mariann

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2018.

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

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

Írta: Dr. Kozma Mariann gyógyszerész

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

Témavezető: Dr. Juhász Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
	Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja és helyszíne: 2018. június 18. 11 óra, a
Debreceni Egyetem ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
könyvtára (I. emelet)

Az értekezés bírálói:

Dr. Almássy János, PhD
Dr. Varga Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
	Dr. Bay Péter, az MTA doktora
	Dr. Almássy János, PhD
	Dr. Varga Csaba, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2018. június 18. 15 óra, helye a Debreceni
Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Anyagok és módszerek	3
2.1. Kísérleti állatok	3
2.2. Minta liofilizálása és bioanalitika	4
2.3. Transztorakális echokardiográfia (TTE)	5
2.4. Szérum paraméterek mérése	6
2.5. Izolált „dolgozó- szív”	6
2.6. Szövettan	8
2.7. Western blot.....	9
2.8. Statisztika	10
3. Eredmények.....	10
3.1. Bioanalitika	10
3.2. Transztorakális echokardiográfia	10
3.3. Izolált „dolgozó-szív” eredmények.....	12
3.4. Western blot eredmények	13
3.5. Szövetteni eredmények	13
3.6. A HC modell szerológiai eredményei	14
4. Megbeszélés	15
5. Összefoglalás.....	24
7. Köszönetnyilvánítás	28

1. Bevezetés és célkitűzés

A szív- és érrendszeri megbetegedések és az általuk okozott halálozás legfontosabb kockázati tényezői a magasvérnyomás-betegség, a cukorbetegség, a zsíransanyagcsere-zavar, az elhízás, a dohányzás és az alkoholizmus, valamint az elégtelen táplálkozás és a mozgásszegény életmód. A KSH által rendelkezésünkre bocsátott legfrissebb adatok alapján elmondhatjuk, 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 számított mértékkel járult hozzá a várható élettartam meghosszabbodásához, melyben a megelőző és gyógyító medicina együttesen meghatározó szerepet játszott. A magasvérnyomás-betegség, a cukorbetegség és a diszlipidémiák korszerű kezelése, a már kialakult szívkoszorúér-betegségek, pangásos szívelégtelenség, ritmuszavarok és agyérbetegségek 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. Annak ellenére, hogy az iszkémiás szívbetegségek miatti halálozási arány csökkent a legnagyobb mértékben a vezető halálokok közül, továbbra is magasan megelőzi azokat Magyarországon és Európában is egyaránt. Bár szintén jól tükrözi az intervenció sikerét, hogy a koszorúér betegség és *stroke* miatti halálozás az elmúlt évtizedben csökkent, a krónikus szívelégtelenség prevalenciája ennek következtében drámaian növekedett. A krónikus szívelégtelenség kezelése viszont jelentős népegészségügyi és gazdasági terhet jelent így az iparilag fejlett országokban. Az előző gondolatsort 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, mely 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 halálozás, mind primer és szekunder prevenció keretében. A szív-érrendszeri megbetegedések kapcsán nem szabad megfeledkezni az olyan ritka, ám progresszív, malignus jellegű betegségről sem, mint a pulmonális artériás hipertónia, mely a mai napig gyógyíthatatlan. A PAH kifejlődése gyakran alattomos, így a felismerésekor a beteg már rendkívül előrehaladott állapotban lehet. Az érintett betegek magas, 5 éven belüli mortalitása miatt, nem győzzük kihangsúlyozni, hogy milyen nagy szükség van a PAH terápiájának fejlesztésére.

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. Anyagok és módszerek

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. A medvehagymával dúsított táp előállítását a Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Karának, Gyógyszertechnológiai Tanszékének kísérleti üzemében történt. Az állatok folyadék-, tápanyagfogyasztásában, illetve a testsúlyuk gyarapodásában nem volt észrevehető különbség a kezelt csoportok között.

2.1. Kísérleti állatok

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, koleszterin mentes 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% medvehagymaliofilizátummal dúsított, koleszterindús tápot kapott (WGLL) 8 héten keresztül. *Pulmonális artériás hipertenzív patkány modell (PAH modell)*

A kísérletben ivarérett, hím Sprague Dawley patkányokat (Charles Rivers Laboratories International Inc., Wilmington, MA, USA) random, négy csoportra osztottuk (n=8): Normál patkánytáppal 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 szuszpenzió (Sigma-Aldrich Co., LLC), valamint monokrotalin kezelésben részesült állatok (Sildenafil). 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. 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

2.2. Minta liofilizálása és bioanalitika

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

2.3. Transztorakális echokardiográfia (TTE)

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 pozícionáltuk, a mellkasi régiót szőrtelenítettük. A képalkotó eljáráshoz az ateroszklerózisos nyúl modell esetében Siemens Acuson 512 ultrahangot alkalmaztunk, 7 MHz-es 7V3c transzducerrel ellátva, a PAH patkánymodellnél esetében egy Vivid E9 echokardiográfot (GE Healthcare Inc.) használtunk rágsálókra kifejlesztett transzducerrel. 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 pulzatis Doppler görbe, és mitrális annulus spektrális szöveti Doppler görbe. 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 képből mértük a tricuspídalis annulus síkjának szisztolés elmozdulását (TAPSE). Szintén M-mode felvételből mértük a bal kamra végszisztolés (LVESD) és végdiastolés (LVEDD) átmérőit. A fenti adatokból számoltuk a frakcionált rövidülést (fractional shortening, FS) és a bal kamrai ejekciós frakciót (EF) az alábbi képletek segítségével: $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD * 100$; $EF = (LVEDD^2 - LVESD^2) / LVEDD^2 * 100$.

2.4. Szérum paraméterek mérése

A 8 hét eltelte után a nyulakat mély anesztézia alá helyeztük, majd a fülvénából 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 mérésre: 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).

2.5. 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/xylazine, 40/5 mg/kg (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., 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; 25mM NaHCO₃; 0,36 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄, 10mM 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 kanuláltuk a szíveket és 10 percig 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 kanuláltuk a pulmonális vénát, majd átkapcsoltuk a készüléket „dolgozó” módba - elzártuk

az aorta felőli beáramlást 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 percre történő gyűjtésével mértük. A bal kamrai nyomást (AoP), az ebből származtatott 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 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 miokardiumokat. Az ateroszklerotikus nyúl modell protokollja szerint, az aerob perfúziót követően elzártuk a bal pitvarba történő beáramlás és a bal kamrából történő kiáramlás útját, így globális iszkémiát hoztunk létre 30 percen keresztül. A perfúzió újraindításához megszüntettük az elzárásokat, ám a reperfúzió első 10 percében Langedorff perfúziót indítottuk, hogy elkerüljül a fatális kimenetelű kamrai fibrillációkat, ezt követően „dolgozó” módban perfundáltattuk a szíveket 110 percre, mely 60. és 120. percében történt a korábban felsorolt szívfunkciós adatok rögzítése. A reperfúzió lejártát követően, a miokardiumok előkészítése és tárolása hasonlóképpen zajlott a PAH protokollhoz.

2.6. Szövettan

A HC modell ateroszklerotikus plakkjainak területének kvantifikálására Oil red O (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) festést alkalmaztunk. A korábban preparált torakális aortákat OTC médiumba (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ágyasztuk. Kriosztát segítségével, 6 μm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket Superfrost Plus tárgylemezre helyeztünk (Daiggers, Vernon Hills, IL, USA). Az ateroszklerotikus elváltozást az aortaív területéről vett mintákból vizsgáltuk, melyeket három, egymástól 120 μm -es távolságra lévő területről metszettünk, négy-öt metszetet készítettünk mindhárom területről. Korábbi publikáció alapján megfestett metszeteken 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 rutineljárásnak számító hematoxin festéssel emeltük ki a sejtmagokat.

A PAH modell izolált dolgozó szív perfúzióját követően a sziveket transzverzális síkban, az apiko-bazális tengellyel párhuzamosan, az apextől számítva, kb. a szív mértani felénél elmetsettük, majd 24 órára 4 %-os pufferelt formalin oldatba fixáltuk (pH=7.4), ezt követően paraffinba ágyasztuk. A parafinos metszetekből 7 μm vastagságú metszeteket készítettünk, majd hematoxin-eozin (HE) festést alkalmaztunk a szöveti struktúrák vizualizálására. A jobb kamrai hipertófiát (right ventricular hypertrophy; RVH) a szív teljes transzverzális metszetéből határoztuk meg, mely mértékét a jobb kamra/(bal kamra+ interventrikuláris szeptum) arány segítségével határoztuk meg ($RHV = RV / (LV + \text{interventricular septum (IVS)})$).

A kimetszett tüdő részleteket szintén 4%-os formalinban fixáltuk, majd a paraffinba ágyazott mintákból rotatoros mikrotommal (márka) 5 μm vékony metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxin-eozin (HE) illetve Elastica van Gieson (EVG) néven ismert eljárások segítségével festettük. A

tüdő arteriálák falának megvastagodásának mértékét $\% \text{ MWT} = (M1 + M2)/ED \times 100$ 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. 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).

2.7. Western blot

A Laemli 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 90 percen keresztül, majd a megfelelően kihígított antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A TBS-T puffer összetétele a következő volt: Trisz(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), szuperoxid dizmutáz 1(SOD1), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGF), citokróm c oxidáz III (COXIII), citokróm c oxidáz IV (COXIV), gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), foszfodiészteráz-5A (PDE5A). Másnap TBS-T pufferrel öblítettük le a primer antitesteket, majd további 90 percig inkubáltuk a szobahőmérsékleten kecske anti-nyúl HRP-konjugált másodlagos antitestet tartalmazó oldatban, melyet 1 %-os alacsony zsírtartalmú tejporos TBS-T pufferben hígítottunk. Újabb mosást követően az antigén-antitest komplex jelenlétét ECL (enhanced chemiluminescence) módszer segítségével tettük láthatóvá. Az előhívást Medical X-ray filmekken végeztük, majd a szkennelt képeken az immunpozitivitás pixeldenzitását Scion Image szoftver segítségével végeztük.

2.8. Statisztika

A kapott számadatok kielemezéséhez Graph Pad programot alkalmazva, egyutas Anova tesztet használtunk posthoc Bonferroni analízissel, a normalitás tesztet pedig D'Agostino teszttel végeztük el. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -tel határoztuk meg.

3. Eredmények

3.1. Bioanalitika

Az alliin a legtöbb *Allium* fajban előforduló, egy nemfehérje-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, reprezentatív alliin csúcsaival való összevethetőség.

A tömegspektrometriai eljárás során a kálium és nátrium által kationizált kvázi molekula ionokat vizsgáltuk. Az $[M + K]^+$ és a $[M + Na]^+$ csúcsok tömege alapján az alábbi komponenseket tartalmazhatja a növény: kaempferol-3-O-rutinozid (m/z 617.4 $[M + Na]^+$ és m/z 633.3 $[M + K]^+$); quercitrin (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.

3.2. Transztorakális echokardiográfia

Minden echokardiográfiás vizsgálat 20 perc alatt lezajlott, az állatok maradéktalanul visszatértek az altatásból, stabil keringéssel, szív-és

légzésfrekvenciával.

HC modell eredményei

A HC állatokban szignifikánsan magas bal kamrai végszisztolés értékeket mértünk M-módban. Ezzel szemben nem tapasztaltunk jelentős változást a HCT csoportnál a Kontroll csoporttal összevetve. A Frakcionált rövidülés (FS) és Ejekciós frakció (EF) paraszternális hosszú tengelyi, valamint a rövid tengelyi metszetekben mért eredményei jó korreláltak egymással. A HC kezelést kapott állatok EF és FS eredményei jelentősen alacsonyabbnak bizonyultak a Kontroll állatokéhoz képest. Továbbá, a medvehagyma kezelt csoportnál (HCT) szignifikánsan magasabb FS és EF értékek voltak megfigyelhetők a HC csoporthoz képest. A diasztolés szívfunkciók az E/A hányadossal voltak kifejezve, melyet Doppler(PW)-módban mértünk. Az E/A hányados is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a HC kezelés hatására, a Kontroll csoportéhoz képest, ezzel szemben a HCT és Kontroll csoport eredményei között nem volt szignifikáns különbség tapasztalható. Az E hullám decelerációs ideje a HC állatoknál szignifikánsan megnyúlt a Kontrollhoz képest, míg a HCT állatoknál ez az érték jelentősen javult. 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 csúcs szisztolés sebesség (peak systolic velocity, S'), valamint a trikuszipidális annulus síkirányú szisztolés kitérése (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) jelentős emelkedést mutatott a medvehagyma liofilizátummal kezelt állatok esetében, a beteg állatokhoz képest.

PAH modell eredményei

A bal kamra szisztolés funkcióit vizsgálva- úgymint FS, EF és a bal kamrai szabadfal szisztolés csúcssebessége (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, ezzel szemben a beteg állatok értéke jelentősen leromlott, míg a WGLL- és Sildenafilnal kezelt állatok jelentős javulást mutattak a PAH csoporttal összevetve. Az E/A diasztolés szívfunkció vizsgálata során a monokrotalin-, a Sildenafil- és a WGLL-kezelés egyaránt hatástalannak bizonyult a nyolc hetes kezelést követően.

3.3. Izolált „dolgozó-szív” eredmények

HC modell

Az alábbi funkciókat vizsgáltuk: aorta kiáramlás (aortic flow, AF), koronária átáramlás (coronary flow, CF), aortanyomás (aortic pressure, AoP), szívfrekvencia (heart rate, HR), perctérfogot (cardiac output, CO), verőtérfogot (stroke volume, SV). A HC és HCT kezelt állatok preisztkémiás AF, HR és CO eredményei jelentősen leromlottak a Kontroll csoporthoz képest. Az AoP tekintetében viszont szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a HC, illetve a WGLL-kezelt csoport esetében a Kontroll csoporthoz képest. Az állatok posztisztkémiás AF, CF, HR és CO eredményei jelentősen leromlottak 60 perc elteltével a saját preisztkémiás eredményeikhez képest, minden csoportban. A WGLL-kezelt csoport AF és HR posztisztkémiás értékei viszont jelentősen magasabbak voltak a HC csoporthoz képest.

PAH modell

A monokrotalin kezelés egyértelmű AF csökkenést idézett elő a Kontroll csoporthoz képest, míg a WGLL kezelés hatására az AF elérte az egészséges állatok értékeit. A CF-ra és az AoP-ra nézve hatástalannak bizonyultak a kezelések, a két vizsgált paraméter tekintetében nem volt változás a három csoport között. A WGLL csoport szívfrekvenciája viszont jelentősen emelkedett a Kontrollhoz képest. A beteg állatok CO-ja szignifikánsan lecsökkent az egészséges állatokéhoz képest, míg a Sildenafil és a WGLL kezelés hatására jelentősen emelkedett ez az érték. A SV mindhárom monokrotalinnal kezelt csoport esetében jelentősen leromlott a Kontrollhoz

képest, egymással összevetve viszont nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket.

3.4. Western blot eredmények

HC modell

a Western blot eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a HO-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a medvehagyma kezelés hatására a beteg csoportban mért értékekhez képest. A SOD1 expressziós szintje viszont a HC csoportban emelkedett meg jelentősen a Kontroll, valamint a HCT csoporthoz képest. A COXIII és a VEGF fehérjék expressziója a HC és HCT csoportban is egyaránt csökkent a Kontrollhoz képest.

PAH modell

A PAH modell PDE5A enzim expressziójának szintjét a jobb kamrákból, illetve a tüdőkből vett mintákból készített izolátumokból vizsgáltuk. 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. 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. 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.

3.5. Szövettani eredmények

HC modell szövettani analízise

HC modellből származó *arcus aortae* területéről vett minták hematoxinin, illetve ORO festett szövettani metszetein vizsgáltuk a plakkos elváltozás mértékét. A Kontroll csoport állatainak mintáin a plakk festési eljárás alapján, nem volt ateroszklerotikus lézió megfigyelhető. A 8 hetes koleszterines

kezelés hatására, HC csoportról készített metszetek alapján magasabb, mint 35 %-os terület volt ORO pozitív a teljes területhez képest, mely egyértelmű különbség a két csoport között. Diszkrét ateroszklerotikus elváltozás volt megfigyelhető a HCT csoport tekintetében, mely a HC csoporttal összevetve szignifikánsan kisebb mértékűnek bizonyult.

PAH modell mikroszkópikus morfológiája

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. A szövetkárosodás a PAH csoport kardiomiocitáinak hiperbazofiliájában, hipereozinofiliájában, az izomrostok hullámos elrendezkedésében, sejtek ödémájában, léziójában, illetve a kardiomiociták apoptózisában egyértelműen megnyilvánult. A PAH csoportból vett mintákon látható a legdrámaibb jobb kamrai hipertrófia, míg a WGLL-kezelt 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, mely érték a PAH csoportban a Kontrollhoz és WGLL-hez 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.

3.6. A HC modell szerológiai eredményei

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. Az 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. 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. LDH és CK szérumszintek tekintetében szintén nagymértékű különbséget tapasztaltunk a HC és HCT csoport között.

4. 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. 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. 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.

Ahogy azt a bioanalitikai analízis 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. Az alliin antioxidáns tulajdonsága mellett, mely számos egyéb oxidatív stressz okozta szöveti károsodás kivédésére alkalmas, az egyik legfőbb erénye a szabadgyök-fogó képessége.

A HC modell tekintetében kapott echokardiográfiás 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.

(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, valamint közelmúltban publikált tanulmányok szerint, az alacsonyabb FS és EF értékek hozzájárulnak fibrotikus betegségek kialakulásához.

(3) 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, nem várt eredményként tapasztaltuk, hogy 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. 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. 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. 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. A HC modell, izolált- dolgozó szív rendszeren végzett vizsgálata során azt állapítottuk meg, hogy a preiszkémiás AoP 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. Ez irányú eredményeink jól korrelálnak korábbi tanulmányokkal, ahol a csökkent oxidatív stressz, drámaian javítja a szívizomszövet iszkémiát követő felépülését. A WGLL kardioprotektív hatásának egyik értelmezése is lehet, hogy a miokardiális iszkémiás események jellemzően csökkentik az aorta nyomást (AoP), mely a koronária átfolyás mértékének csökkenését és a bal kamrai nyomás esését vonja magával. 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 AF, mely a bal kamra pumpafunkciójának markere, jelentősen leromlott a Kontrollhoz képest. Ezáltal, korábbi kutatásokkal egybehangzóan kijelenthetjük, hogy a monokrotalin indukálta pulmonális artériás hipertónia következményeként a jobb szívfél elégtelenség bal szívfél rendellenességéhez is vezet. A Sildenafil-kezelés szignifikánsan javította a perctérfogatot (CO) a PAH csoporthoz képest, mely szintén megerősíti a korábbi eredményeket. 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. Érdeemes újra megállapítani azt a tényt is, hogy mind posztiszkémiás HC, mind PAH-beteg modellen aorta kiáramlás javulást értünk el medvehagyma-kezelés hatására.

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 szűkülésében, a jobb kamra hipertrófiájában. Az alkalmazott MCT-indukálta pulmonális artériás hipertónia, valamint a JK hipertrófia modell jól ismert. A Sildenafil pulmonális artériás nyomásra (PAP), pulmonális vaszkuláris rezisztenciára, ezáltal a JK funkciókra kifejtett hatása is egyértelműen bizonyított PAH és humán beteg modellben egyaránt. 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. Éppen ezért érdemes mindig kellő kritikával kezelni az állatmodellen kapott eredményeinket.

A Western blot analízis során 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. Gyakori, hogy a betegség lefolyását 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. A HO-1 szintjének emelkedéséért nagymértékben felelős a hem degradációja, melyet az enzim denaturált hemből bilirubinná/biliverdinné, vassá és szén-monoxiddá alakít. A HO-1 hatására képződő bilirubinról is igazolt, hogy citoprotektív hatással bír a szívérrendszerre.

A magas koleszterin tartalmú diétán tartott állatok fokozott HO-1 expresszióhoz köthető, csökkent ateroszklerotikus elváltozásai, ezáltal a HO-mediálta vaszkuláris protekció, gyakorta publikált jelenségek. 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.

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. 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.

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.

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 fehérjét 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. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a WGLL kardioprotektív hatását inkább fejti ki a hem/HO-1 rendszeren keresztül, mint COXIII által befolyásolt útvonalakon. A VEGF változatlan, illetve a HO-1 emelkedett expressziójának eredményéből arra következtetünk, hogy, bár jól ismert folyamat a HO-1 indukálta angiogenezis folyamata, az általunk alkalmazott kezelési periódusban ez a VEGF-aktiválta neovaszkularizáció még nem indult el.

A PAH modell-ből származó minták Western blot vizsgálatának fókuszában a PDE5A enzim állt, ugyanis közismert tény, hogy a pulmonális vaszkulátúra remodelling folyamata, ezáltal a NO/cGMP rendszer szerepe kritikus a PAH patogenezisében. Eredményeink megerősítik azt a számos korábbi kutató által feltárt tényt, hogy a PDE5A expressziója fokozódik a jobb kamrát érintető betegségek során, mint például pangásos szívelégtelenség, pulmonális hipertónia, valamint jobb kamrai hipertrófia. Ezáltal elmondhatjuk a monokrotalin-indukálta PAH modellünkről is, hogy más tanulmányokhoz hasonlóan befolyásolta a PDE5 szintjét. 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. Eredményeink értékelése kapcsán nem szabad

megfelelkezni arról a tényről sem, hogy egy fehérje expresziójának a növekedése nem mindig jár együtt az aktivitás emelkedésével is.

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. A liofilizátum protektív szerepét igazolja, hogy bár jelentős mértékben emelkedett a WGLL-kezelt csoport koleszterin értéke is a Kontroll csoporthoz 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 atheroszklerózis ismert jelenség, 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. Jelen esetben elmondhatjuk, hogy a medvehagyma liofilizátummal történt kezelés nem csak az LDL koleszterint 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. Új eredmény viszont, hogy a WGLL képest 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 sejtkultúrához, illetve sertés koronária artériához. Ezen eredmények segítségével bepillantást nyerhetünk az alliin ateroszklerózis patológiájában kifejtett kedvező hatásaiba, így az általunk végzet kísérletben betöltött szerepére is következtethetünk.

Annak ellenére, hogy az *Allium sativum* (fokhagyma) irodalma - összetételét és vizsgálatát illetően - jelentősebb ismeretanyaggal rendelkezik, kijelenthetjük, hogy eredményeinkkel jelentős mértékben hozzájárultunk az *Allium ursinum*mal kapcsolatban rendelkezésünkre álló szakirodalomhoz, alátámasztván a tényt, hogy a medvehagyma is egy értékes gyógynövénynek tekinthető. Továbbá hozzájárultunk azon kutatások szerény sorához, melyek a két növény összehasonlításakor, az *Allium ursinum* előnyösebb hatásait prezentálták. Végül, de nem utolsó sorban, az sem elhanyagolható tulajdonsága a medvehagymának, hogy Európa és Ázsia szinte nagy mennyiségben, széles körben és könnyen elérhető.

5. 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 vettettük össze terápiás értékét egy jól ismert PDE-inhibítorral, a Sildenafillel. Érdeemes megemlíteni, hogy mindkét modellben transztorakális echokardiográfiás módszer segítségével bizonyítottuk - a TAPSE paraméter vizsgálata által- a jobb kamrára kifejtett előnyös hatásokat. A HC modellben 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 Sildenafillel 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.



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., Tósaki, Á.: Alpha-MSH induces vasodilatation and exerts cardioprotection via the heme-oxygenase pathway in rat hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.247 (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., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF: 2.339
9. Juhász, B., Kertész, A. B., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF: 3.288





10. Varga, B., Gesztelyi, R., Bombicz, M., Haines, D. D., Szabó, A. M., Kemény-Beke, Á., Antal, M., Vecsernyés, M., Juhász, B., Tószaki, 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., Tószaki, 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., Tószaki, 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.



7. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönöm témavezetőmnak, 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 Farmakognóziai 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 hálásan köszönöm férjem, családom és barátaim szerető támogatását.

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