

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

dr. Szőke Kitti

**Hagyományos terápiás lehetőségek új szemszögből a
szívizomban**

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Hagyományos terápiás lehetőségek új szemszögből a szívizomban

dr. Szőke Kitti

Témavezető: Dr. Lekli István



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Az iszkémiás szívbetegség.....	11
2. Az oxidatív stressz.....	13
3. A hemoxigenáz-1 és szerepe a kórfolyamatokban	15
4. Az Allium sativum jellemzése.....	18
5. Hibrid aszpirin vegyületek	22
3. Célkitűzés.....	25
4. Anyagok és módszerek:.....	26
4.1. Módszerek I. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív- és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban	26
4.1.1. Kísérleti állatok.....	26
4.1.2. Kezelési protokoll	26
4.1.3. Fekete fokhagyma előállítása.....	26
4.1.4. GC-MS analízis.....	27
4.1.5. Izolált dolgozó szív preparátum, szívfunkciós paraméterek	27
4.1.6. Infarktusos terület meghatározása	28
4.1.7. Vér paraméterek.....	28
4.1.8. Fehérje izolálás	29
4.1.9. Westem blot analízis	29
4.1.10. Statisztikai elemzés	30
4.2. Módszerek II. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata	30
4.2.1. In vitro kísérletek	30
4.2.1.1. Oxidatív stabilitás	30
4.2.1.2. A sejtek életképességének vizsgálata MTT assay -vel.....	31
4.2.1.3. Hemolitikus aktivitás mérés.....	31
4.2.2. Ex vivo kísérletek.....	32
4.2.2.1. Kísérleti állatok.....	32
4.2.2.5. Langendorff szívizoláció, izolált dolgozó mód	32
4.2.2.6. TTC festés	33
4.2.2.7. Statisztikai elemzés.....	33
5. Eredmények.....	34

5.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív-és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban.....	34
5.1.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma komponenseinek vizsgálata.....	34
5.1.2. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a testtömegre.....	36
5.1.3. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása vérparaméterekre	37
5.1.4. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a szívfunkciókra.....	37
5.1.5. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása az infarktusos területre	39
5.1.6. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a HO-1 és az iNOS expressziós szintjére.....	40
5.2. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata H9c2 sejtvonalon és patkánymodellen	42
5.2.1. Oxidatív stabilitás.....	42
5.2.2. ERJ-500 molekula hatása a sejtek életképességére.....	43
5.2.3. ERJ- 500 molekula hatása a koronária erekre.....	45
5.2.4. Infarktusos terület meghatározása	49
6. Megbeszélés	50
7. Összefoglalás.....	56
8. Summary	57
9. Főbb megállapítások	58
9.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív- és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban.....	58
9.2. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata H9c2 sejtvonalon és patkánymodellen	58
10. Irodalomjegyzék	59
11. Tárgyszavak.....	65
12. Köszönetnyilvánítás	66

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE angiotenzin konvertáló enzim

ACN acetonitril

ADP adenozin difoszfát

AF aorta kiáramlás (aortic flow)

ALP alkalikus foszfatáz

ALT alanin aminotranszferáz

AODP/dT aorta nyomás idő szerinti első deriváltja (first derivate of aortic pressure)

AOP aorta nyomás (aortic pressure)

ASA acetilszalicilsav, aszpirin (acetylsalicylic acid)

ASTL aszpartát aminotranszferáz

ATP adenozin-trifoszfát

BCA bikinkoninin sav (bicinchoninic acid)

BSA marha szérum albumin (bovine serum albumin)

BVR biliverdin-reduktáz

CABG szívkoszorúér áthidaló műtét (coronary artery bypass grafting)

CAD szívkoszorúerek megbetegedése

CF koronária átáramlás (coronary flow)

cGMP ciklikus guanozin-monofoszfát (cyclic guanosine monophosphate)

CHO összkoleszterin

CK-MB kreatin-kináz-myoglobin

COUT perctérfogat (cardiac output)

COX ciklooxigenáz (cyclooxygenase)

CRP C-reaktív protein

CVD kardiovaszkuláris megbetegedések

DADS diallil diszulfid

DAS diallil szulfid

DATS diallil triszulfid

EDTA etilén-diamin-tetraecetsav

GST glutation-transzferáz

H₂O₂ hidrogén peroxid

HDL nagy sűrűségű lipoprotein

HLA-B27 Humán Leukocita Antigén B27

HO hemoxigenázok

HR szívfrekvencia (heart rate)

IL-6 interleukin-6

IL-8 Interleukin-8

ISIS-II Second International Study of Infarct Survival

ISZB iszkémiás szívbetegség

KAT kataláz

LAMP2A lizoszóma asszociált membrán fehérje 2 (lysosome associated membrane protein-2)

LDH laktát dehidrogenáz

LDL alacsony sűrűségű lipoprotein

LPS lipopoliszacharid

MAP mitogén-aktiválta protein

MAPK p38 mitogén aktivált protein kináz

MCP-1 monocita kemotaktikus protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)

MI miokardiális infarktus (myocardial infarction)

MMP mátrix metalloproteinázok

MOL molszidomin (molsidomine)

MRSA meticillin rezisztens Staphylococcus aureus

MTT 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid

NF-κB nukleáris faktor-kappa

NK Természetes ölősejtek (Natural Killer)

NO nitrogén monoxid (nitrogen monoxide)

NOS nitrogén-oxid-szintáz

PAS pre-autofagoszomális struktúra (phagophore assembly site)

PBS fiziológias foszfát puffer (Phosphate Buffered Saline)

PE foszfatidil-etanolamin (phosphatidylethanolamine)

PTCA perkután transzlumináris koronária angioplasztikai (percutaneous transluminal coronary angioplasty)

PVDF polivinil-difluorid (polyvinylidene-difluoride)

ROS reaktív oxigén intermedierek

RNS reaktív nitrogén származékok

SAC S-allil-cisztein

SD Sprague Dawley patkány

SOD szuperoxid diszmutázok (SOD)

STEMI, NSTEMI ST-elevációval járó-, ST-elevációval nem járó miokardiális infarktus

SV verőtérfogat (stroke volume)

TNF- α tumor nekrosis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

TRIG triglicerid

XO xantin-oxidáz

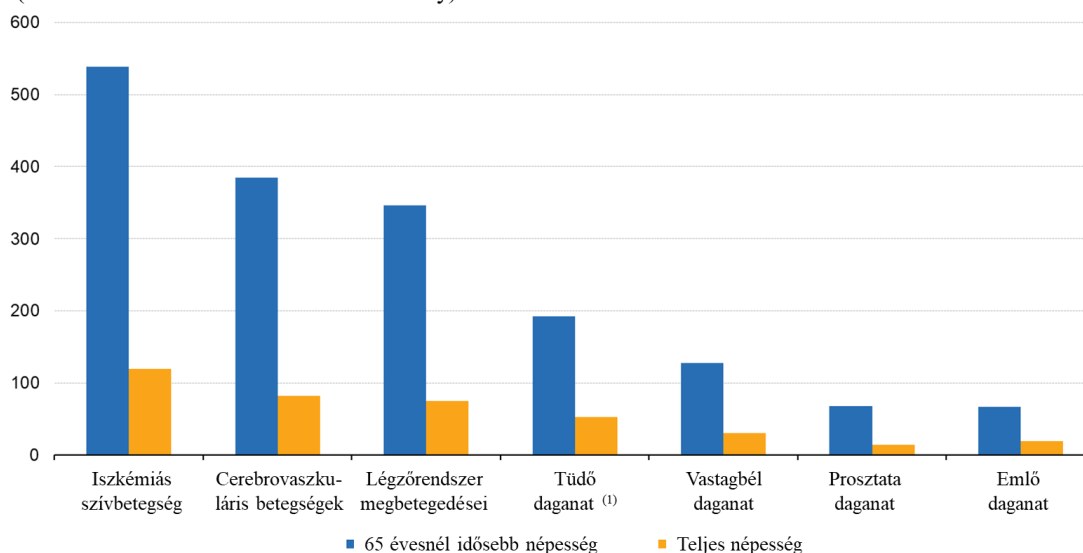
1. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) által okozott elhalálozások az egyre korszerűbb és sikeresebb gyógyszer kezelés és invazív ellátások hatására javuló tendenciát mutatnak, de ennek ellenére még napjainkban is változatlanul vezető szerepet töltenek be a mortalitási statisztikában.

A WHO adatai alapján 2019-ben körülbelül 17,9 millió ember halt meg a világon szív- és érrendszeri betegség következtében, amely a globális halálok 32 %-a. Ezen halálok, 85 %-a a sztróknak és szívinfarktusnak volt köszönhető. 2019-ben a korai halálozások száma 17 millió volt a nem fertőző krónikus betegségek következtében, amely 38 %-a volt a CVD-nek köszönhető [1].

Az Európai Unió (EU) tagállamaiban is a legnagyobb haláloki csoport továbbra is a keringési rendszer betegségei, amelyekhez a magasvérnyomás-betegség, magas vérnyomás eredetű szívbetegség, iszkémiás szívbetegségek (ISZB) (pl. heveny szívizomelhalás, idült iszkémiás szívbetegségek), a szívbetegség egyéb formái és az agyérbetegségek, érelmeszesedés tartozik. Ezek a betegségek Bulgária után Magyarországon okozzák a legtöbb halálozást. Az EUROSTAT adatai alapján, az EU 28 tagállamaiban a 65 év felettiek körében is a szív- és érrendszeri betegség volt a vezető halálok, az teljes halálozás 40,3 %-a [2].

Vezető haláloki tényezők, EU, 2016
(100 000 lakosra vetített halálozási arány)



Megjegyzés: a három leggyakrabban előforduló haláloki tényező a 65 éves és ettől idősebb népességnél a keringési rendszer-, daganatos- és légzőrendszer megbetegedései

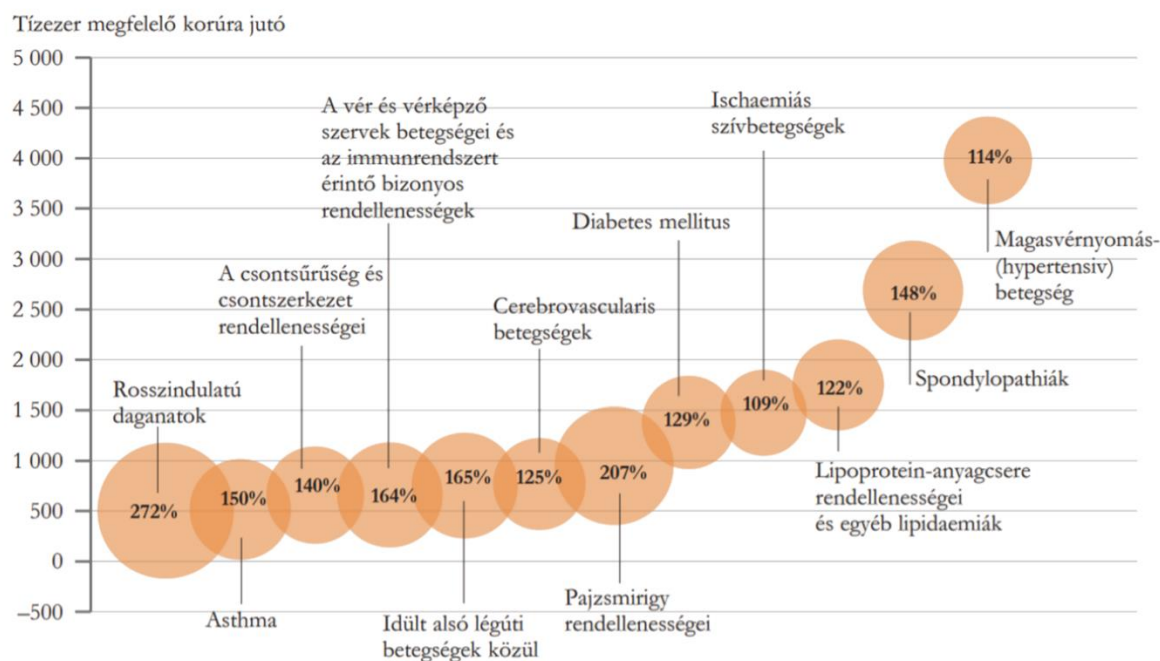
(1) Trachea, bronchus, tüdő

Forrás: Eurostat (online datacode: hlth_cd_asdr2)

eurostat 

1. ábra: Halálokok aránya az Európai Unióban, 2016-ban a teljes lakosság és a 65 év és annál idősebbek körében.

A Központi Statisztikai Hivatal (KSH) 2019 felmérése alapján a 18 évesnél idősebbek körében a legnagyobb egészségügyi probléma a magasvérnyomás-betegség. A magas vérnyomás kockázata az életkor növekedésével emelkedik. A 35-44 éves lakosok 16 %-a szenved a magas vérnyomástól, míg a 75 évesek és annál idősebbek több, mint kilenczetedét érinti a betegség. A magas vérnyomás kialakulásának kockázata jelentős társadalmi eltéréseket mutat, például a felsőfokú iskolai végzettséggel rendelkezőknél és legfelső jövedelmi ötödhöz tartozóknál kisebb a kialakulási esély. Észak-Magyarországon a betegség kialakulási esélye nagyobb, míg Nyugat-Dunántúlon kisebb ez az érték. A keringési rendszer betegségei közül az iszkémiás szívbetegség szintén élen jár, ami a 19 évesek és annál idősebbek 15 %-át érinti. Nagyobb számban a 45–54 éves populációban jelenik meg elsőként, az ilyen korúak 6%-át érinti. Az idősebbeknél meredeken emelkedik a prevalencia, minden második embert érint a betegség a 75 éves vagy annál idősebb korcsoportban. A betegek aránya 2011-től 2 százalékponttal nőtt. Jelentős területi különbségek figyelhetők meg az ISZB előfordulásában is. A legnagyobb kockázatnak az Észak-Alföldön élők vannak kitéve, míg a Nyugat-Dunántúlon kedvezőbb a helyzet [3].



2. ábra: A háziiorvosi szolgálathoz bejelentkezett 19 éves és annál idősebb leggyakoribb betegségei 2019-ben. (a körök átmérője arányos a 2011-2019 között történő változással). KSH, Egészségügyi helyzetkép, 2019

A szív- és érrendszeri betegségek kezelési költsége jelentősen megterheli az egészségügyi kiadásokat is, ezért fontos a megelőzés szerepének előtérbe helyezése. A prevenció törekvések között kiemelten fontos a befolyásolható rizikófaktorok azonosítása és kedvezően történő módosítása, eliminálása, hiszen ez kulcsszerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésében, illetve a betegség progressziójának és a későbbi kardiovaszkuláris események megelőzésében. Ezek a megfelelő életmódváltozásokkal elérhetőek, mint például a rendszeres mozgás, dohányzás elhagyása, mediterrán típusú diéta (zöldségekben, gyümölcsökben gazdag étrend, rendszeres halfogyasztás, só bevitel megszorítása), testsúlycsökkenés és a túlzott mértékű alkohol fogyasztás kerülése. A KSH 2019 felmérése alapján megállapították, hogy az összes haláleset fele az egészségtelen életmód miatt következett be. A dohányzás és az elhízás az egyik leggyakoribb kiváltó ok, ugyanis a felnőtt lakosok negyede dohányzott és a 15 éves és annál idősebbek közel negyede volt elhízott.

Ezen kétségbeejtő statisztikai adatok alapján fontosnak véljük az új prevenciók eljárások bevezetését és új, hatékonyabb, kedvezőbb mellékhatás profillal rendelkező gyógyszerek fejlesztését.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az iszkémiás szívbetegség

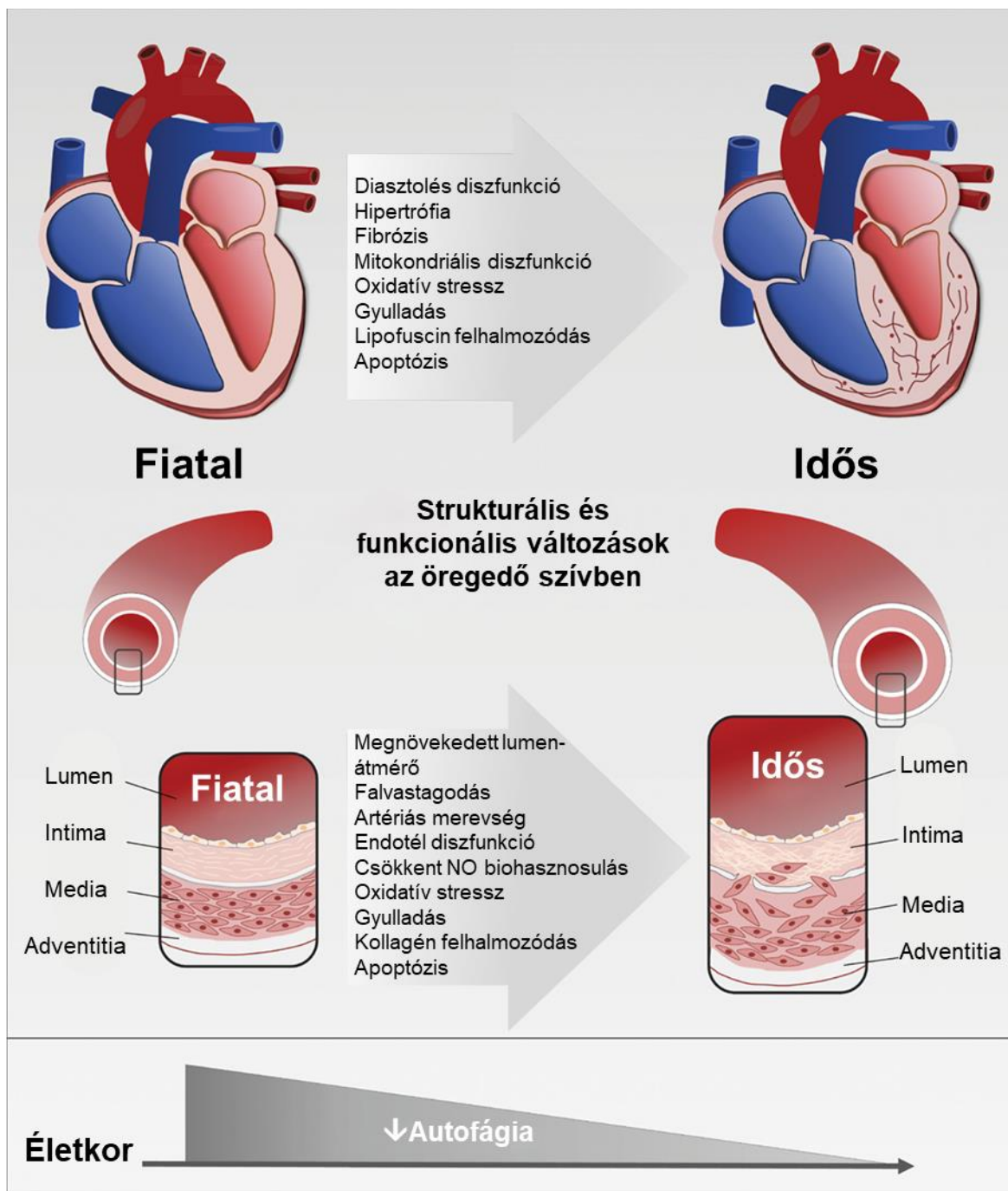
Az egyre sikeresebb gyógyszeres és eszközös terápiák ellenére a kardiovaszkuláris megbetegedések által okozott halálok továbbra is vezető helyen állnak a mortalitási statisztikai adatok alapján felállított rangsorban. Az iszkémiás szívbetegség, vagy más néven szívkoszorúér- betegség az egyik leggyakoribb mortalitási okok közé tartozik.

Az iszkémiás szívbetegség klinikailag több formában jelentkezhet. Megkülönböztetjük a stabil koronária betegséget (ezen belül a néma „silent” iszkémiát és a stabil effort angina pectorist), a prinzmetal-anginát, az instabil angina pectorist, az akut miokardiális infarktust és az iszkémiás eredetű szívelégtelenséget [4]. Stabil angina akkor alakul ki, amikor a koronáriák ateroszklerotikus szűkülete miatt az áramlás korlátozott. Nyugalomban ez a csökkent koronáriaáramlás is kielégíti a szív O_2 igényét, azonban a terhelésre vagy emocionális stressz hatására növekvő miokardiális O_2 igényt már nem képes ellátni [5, 6]. A prinzmetal- vagy vazospasztikus angina egy olyan ritka állapot, amelynek hátterében a koronáriaerek súlyos, átmeneti görcsös összehúzódása áll. Általában nyugalomban jelentkezik, a terheléstől független és gyakran kora reggel alakul ki [7]. Az instabil anginát a koronáriaerekben lévő instabil plakkok okozzák. Azok ruptúrája kapcsán alakul ki érelzáródás, mely infarktushoz vezet. Az instabil angina gyakran előrejelzi a miokardiális infarktust, amikor az iszkémia a miokardium egy meghatározott területén nekrozist okoz. Az EKG alapján ST-elevációval járó-(STEMI), és az ST-elevációval nem járó miokardiális infarktust (NSTEMI) különböztetjük meg [8].

Az iszkémiás szívbetegség során a szívizom oxigén igénye és ellátása közötti arány felborul, amely a kontrakció és relaxáció zavarához, az előterhelés növekedéséhez, a diasztolés volumen és a végdiasztolés nyomás növekedéséhez vezet [9]. Számos metabolikus változás történik az iszkémia és reperfúzió során. Az elégtelen oxigén ellátás miatt az aerob glükóz oxidáció helyett az anaerob glikolízis fokozódik. Az anaerob folyamatok nem képesek kellő mennyiségű ATP-t előállítani. A csökkent ATP szint pedig az intracelluláris pH csökkenéséhez vezet. Mindezek következtében az aktív transzport folyamatok működése is sérül és elégtelenné válik, mint például a Ca^{2+} ATPáz és a $3 Na^+ - 2 K^+$ ATPáz. Az egyre növekvő Na^+ -ot a sejt a $3 Na^+ / 1 Ca^{2+}$ ioncserélő segítségével próbálja eltávolítani, amely az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedéséhez vezet. A reaktív oxigén intermedierek termelődése a sejtekben apoptotikus és nekrotikus elváltozások kialakulásához vezetnek [10, 11]. A miokardiumban a reaktív oxigén intermedierek (ROS) és gyulladásos mediátorok termelődnek, amelyek a

pumpafunkciók zavarához, aritmiához és akár nekrozishoz, apoptózishoz vezetnek. Az iszkémiás miokardium felépülése érdekében nélkülözhetetlen a csökkent keringésű miokardium területek vérellátásának az időben történő javítása, illetve elzáródás esetén a keringés megindítása, a reperfúzió [12, 13]. A reperfúzió fontosságára elsőként W. R. Ginks és munkatársai hívták fel a figyelmet, ugyanis kutyákat tanulmányozva felismerték, hogy az időben megkezdett artéria elzáródás helyreállítása jelentősen csökkentette a nekrozist [14]. Ezt követően hamarosan előtérbe került a farmakológiai intervenció is. A trombolitikus szerek alkalmasak a koronáriát elzáró alvadék feloldására, ami az infarcerálódott terület reperfúziójához vezet [15, 16]. Habár a reperfúzió nélkülözhetetlen a megfelelő keringés biztosításához, mégsem kockázatmentes, hiszen számolnunk kell azzal, hogy az iszkémiás szöveteket megnövekedett nyomású keringés terheli meg, amely reverzibilis és irreverzibilis károsodáshoz is vezethet. Reverzibilis károsodás lehet a hirtelen reoxigenizáció következtében kialakuló aritmiák, mint például kamrai fibrilláció, kamrai tachicardia, de a supraventrikuláris aritmiák is gyakoriak. A károsodások hátterében többek között a jelentősen megnövekedett ic. Ca^{2+} szint és az oxidatív stressz áll [17, 18]. Irreverzibilis károsodás lehet a kardiomiociták nekrozisa és a kamrai remodelling folyamata, amely dilatációval jár együtt. Az infarcerálódott fal megnyúlik és elvékonyodik, a növekvő falfeszülés következtében excentrikus hipertrofia alakul ki, amelyek szívelégtelenséghez vezetnek [19, 20].

A halálloki struktúra az életkorral változik, életkor előrehaladtával egyre magasabb a CVD kialakulási esélye, amely a kardiovaszkuláris öregedésnek is köszönhető. Az öregedő szívben jelentős funkcionális és strukturális változások alakulnak ki. Sejtszinten egy remodelling veszi kezdetét, csökken mind a munkaizomsejtek, mind az ingerképző és vezető sejtek száma is. A balkamra fala jelentősen megvastagodik. Főként a kardiomiocita szám csökkenés kompenzálása miatt koncentrikus hipertrofia alakul ki. A balkamra diasztolés funkciója jelentősen romlik. A terhelés hatására csökken a maximális szívfrekvencia, amely hátterében a gyengülő kronotrop β -adrenerg válasz és a sinuscsomó csökkenő frekvenciája áll. A vaszkuláris remodelling során a nagyerek átmérője és falvastagsága nő, legjelentősebben az aorta fala tágul ki és egyre merevebb lesz. Így az aorta elasztikus tulajdonságai súlyosan károsodnak. Mindez a szisztolés nyomás emelkedéséhez vezet. A kardiovaszkuláris öregedés során a sejtek szabályozott önmérsztő folyamata, az autofágia is jelentős mértékben csökken, amely a károsodott organellek eltávolításáért felelősek [21].



3. ábra: Az öregedő szívben történő strukturális és funkcionális változások. Mahmoud Abdellatif et al 2018. alapján

2. Az oxidatív stressz

A szabad gyökök olyan atomok vagy molekulák, amelyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Ezek igen reaktív származékok, a felszínükön lévő szabad elektronnak köszönhetően könnyen lépnek kémiai reakcióba a szervezetet alkotó molekulákkal.

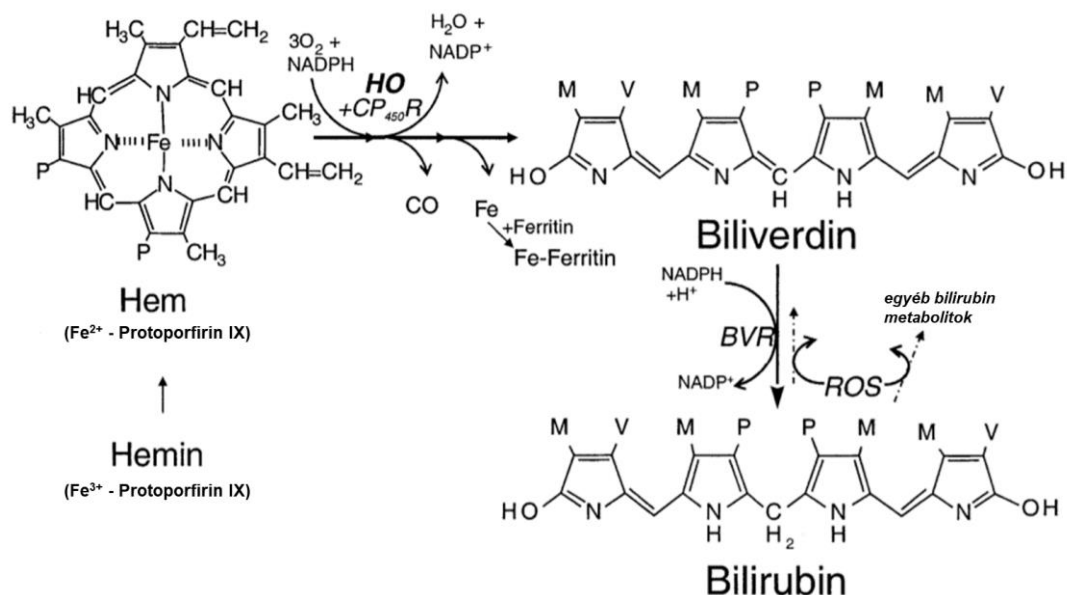
A két legjelentősebb prooxidáns csoport az oxigén eredetű reaktív vegyületek (ROI vagy reactive oxygen species = ROS) és a nitrogén eredetű reaktív nitrogén származékok (RNI vagy reactive nitrogen species = RNS). A reaktív köztitermékek nem mindegyike szabadgyök, így összefoglaló néven reaktív oxigén és nitrogén intermediereknek nevezzük. Legismertebb képviselőjük a szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilgyök ($OH^{\cdot}$), peroxilgyök ($ROO^{\cdot}$), alkoxilgyök ($RO^{\cdot}$), ózon (O_3), a szinglet oxigén (1O_2) és a hidrogén-peroxidot (H_2O_2) [22]. Fiziológias körülmények között kis mennyiségben termelődnek, amelyek nélkülözhetetlenek számos biokémiai folyamatokhoz [23]. Azonban patológias körülmények között a ROS mennyisége jelentősen megnő, amit az antioxidáns védelmi rendszer próbál eliminálni [24]. A miokardiális iszkémiát követő reperfúzió a sejtek túlélésének feltétele, azonban paradox módon súlyos károsodásokat is okozhat. A reperfúzió kezdetén a hirtelen reoxigenizáció és a mitokondriális légzési lánc károsodása nagymértékű ROS felszabaduláshoz vezet. Továbbá az endotél sejtekből származó xantin-oxidáz, majd a NADPH oxidáz is ROS képződéshez vezetnek, mely következtében károsodhat a sejtmembrán, valamint sérülhet a mitokondrium, a fehérjeláncok és a DNS is. A reperfúzió kezdeti szakaszán a Na^+ - Ca^{2+} transzport reverz működése miatt további Ca^{2+} beáramlás történik a már magas intracelluláris kalciummal rendelkező szívizom sejtbe. A reperfúzió során helyreáll az iszkémia során lecsökkent pH és az ATP szintézis. A Ca^{2+} túltelítődés azonban kihat a kontraktilis apparátus működésére, rendszertelen kontrakciókat hoz létre és az aritmiák kialakulását fokozza [10, 25].

Az antioxidáns rendszer elsődleges védelmi vonala az endogén enzimek és a fémkötő fehérjék. Az enzimek közé tartozik a szuperoxid diszmutázok (SOD), kataláz (KAT), glutation-transzferáz (GST) és a glutation peroxidázok. A SOD a szuperoxid aniont alakítja át hidrogén peroxiddá (H_2O_2) [26], míg a hem tartalmú KAT a H_2O_2 semlegesítéséért felelős, tovább alakítja vízzé (H_2O) és oxigénné (O_2) [27]. Az antioxidáns rendszer további védelmi vonalába tartoznak a kis molekulatömegű antioxidánsok (A-, C-, E- vitaminok). A harmadik védelmi vonalat pedig a hősokk fehérjék, proteázok és lipázok jelentik. Azonban, ha túlzott mértékű a ROS termelődés vagy az antioxidáns rendszer kapacitása csökkent, felborul az egyensúly és oxidatív stressz alakul ki, amely során a proteinek, lipidek, szénhidrátok, nukleinsavak károsodnak. A DNS oxidációja a lánc töréséhez vezet [28]. A lipidek oxidációja során módosul a membránok permeabilitása, a peroxidáció következtében citotoxikus termékek keletkeznek [29]. A fehérjék oxidációja pedig a protein aggregátumok keletkezéséhez vezet [30]. Mindezen folyamatok fontos szerepet töltenek be a patofiziológias elváltozásokban, mint például a kardiovaszkuláris megbetegedés, neurogeneráció, tumorigenezis és a diabétesz.

A ROS jelentős szerepet tölt be a szívkoszorúerek megbetegedésének (CAD) kialakulásában és progressziójában. A szívizomsejtekben a mitokondriumok tekinthetők az elsődleges szabadgyök forrásnak, de szerepet játszik a NAPDH-oxidáz, xantin-oxidáz (XO) [31] és a szétkapcsolt nitrogén-oxid szintázok (NOS) is [32]. A keletkező gyökök a lipideket alkotó zsírsavmolekulákat károsítják és a kialakuló gyökös láncreakció a lipidek oxidatív degradációjához vezet. A lipidperoxidáció károsítja a membrán felépítését, megváltozik az áteresztő képessége, károsítja a specifikus membráncsatornákat és inaktiválja a membránhoz kötött enzimeket. A lipidperoxidáció révén az alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) oxidálódnak, az oxidált LDL-t pedig a makrofágok felveszik, majd subendotheliálisan migrálnak és a T-limfocitákkal együtt képezik az ateroszklerotikus plakk belső részét, magját [29]. Továbbá aktiválja a mátrix metalloproteinázokat (MMP), a szívizomban legnagyobb mértékben előforduló MMP-2 és -9-t, amely az ateroszklerotikus plakk ruptúrájához vezet [33]. Az MMP-k fontos szerepet töltenek be a szív remodelling és a fibrózis kialakulásában is. A ROS direkt és indirekt módon fokozzák számos a szív hipertrófiához vezető jelátviteli útnak és faktoroknak az aktivitását, mint például angiotenzin-II, endotelin-1 és a tumor nekrosis faktor (TNF- α) és a mitogén-aktiválta protein (MAP) kinázokat is [34].

3. A hemoxigenáz-1 és szerepe a kórfolyamatokban

A hemoxigenázok (HO) olyan mikroszómális, evolúciósan konzervált enzimek, amelyek a hem degradációjának sebesség meghatározó lépését katalizálják. A hem egy metenilhidakkal összekötött pirrolgyűrűből, a porfirinvázból és egy központi vas Fe(II) atomból épül fel. A hem különböző fehérjékhez kötődhet, azok prosztetikus csoportját alkotva, hemoglobint, mioglobint, citokrómot és katalázt képezve. A hem degradáció egy komplex folyamat eredménye, amely során a HO által katalizált első lépésben a porfirin gyűrű váza felbomlik, az α -metin hidjainak hasításának következtében. A reakció végeredményeként biliverdin, szén-monoxid CO és szabad vas keletkezik. A reakcióhoz három oxigén molekula és 7 elektron szükséges, amelyeket a NAPDH-citokróm-p450- reduktáz biztosít. A biliverdin a biliverdin-reduktáz (BVR) segítségével bilirubinná alakul tovább, a vas pedig a ferritinhez kötődik [35-37].



4. ábra: A hem lebontásának folyamata.

A HO- nak eddig 3 izoformáját azonosították, a HO-1, HO-2, HO-3, amelyeket a HMOX1, HMOX2 és HMOX3 gének kódolnak. A HO-1, vagy másnéven hő-sokk fehérje 32 (32 kDa), fiziológiás körülmények között alacsony expressziója, de indukálható. Kivételt képez ez alól a lép, ahol nyugalmi körülmények között is magasabb a HO-1 szintje, ezzel biztosítva a hemoglobin és vörösvérsejtek lebontását [38, 39]. A HO-2 (36 kDa) konstitutív izoforma, amely legtöbb szövetben előfordul, de legnagyobb mennyiségben az agyban, herékben és a vaszkulátúrában található meg [40]. Patkányokban leírtak egy harmadik izoformát is, a HO-3-t, amely a HO-2 transzkriptumának pszeudogén származéka [41]. HO-1 a endoplazmatikus retikulum lokalizálódik, a NADPH-citokróm-p450- reduktáz közelében [42], de újabban felfedezték, hogy a mitokondriumban és a sejtmagban is megtalálható [43]. A HO-1 az endogén heme kívül számtalan stimulusra és ágensre indukálódhat, amelyek oxidatív stresszt és patológiás állapotokat okoznak. [44]. Ilyen induktor például az iszkémia, glutation-depléción, hipoxia, hiperoxia, endotoxinok, nehézfémek, ultraviola sugárzás, hipertermia, szulfhidril reagensek és a nitrogén-monoxid. A HO-1 ezáltal fontos szerepet tölt be az oxidatív stresszel szembeni védekezésben és az aktivitásának fokozásával a sejtkárosodás mértéke csökkenthető. A hem lebontás során keletkező termékeknek köszönhető a HO protektív tulajdonságai, mint az antioxidáns, antiinflammatorikus és az antiapoptotikus tulajdonsága [35]. A biliverdin/bilirubinnak tulajdonítható főként az antioxidáns hatás, ugyanis ezen molekulák potens gyökfogó tulajdonságúak, ezáltal képesek megkötni a peroxinitritet [45],

szuperoxid aniont [46] és a hipoklórossavat is [47]. Baranano és munkatársai azt tapasztalták, hogy a 100 μ M-os toxikus koncentrációjú H_2O_2 -al kezelt HeLa sejtek életképessége nőtt a bilirubin kezelés hatására [48]. A hem degradáció során képződő CO szintén fontos szerepet játszik az élettani folyamatokban, mint endogén mediátorként. Az antiapoptotikus hatása a p38 mitogén aktivált protein kináz MAPK útvonal aktiválásával magyarázható [49]. A HO-1 antiinflammatorikus hatását bizonyítja, hogy a HO-1-et expresszáló makrofágok lipopoliszacharid (LPS) stimuláció hatására csökkent proinflammatorikus citokin termeléssel válaszolnak, a TNF- α képződése jelentősen alacsonyabb volt [50].

Jelentős kardioprotektív hatással is rendelkezik a HO-1, amelyet számos kutatás bizonyít. Shaw-Fang Yet és kutatótársai azt találták, hogy a HO-1 génnel nem rendelkező egereknél (HO-1^{-/-}) hét hetes hipoxia hatására súlyos jobb kamrai tágulat fejlődött ki a vad típusú egerekhez képest, ahol nem volt megfigyelhető szívbetegség kialakulása [51]. Guangwu Wang és kutatótársai kísérletük során HO-1 transzgén és vad típusú egereknél koronária lekötéssel indukáltak szívelégtelenséget és azt tapasztalták, hogy a transzgén egerekben a proapoptotikus p53 expresszió és mitokondriális citokróm- c szintje is alacsonyabb volt a vad típushoz képest [44]. A HO-1 hiány miatt az endotelizáció folyamata lényegesen lassabb I/R-t követően a sérülés helyén, mivel csökkent az endotél prekursor sejtek toborzása és differenciálódása a vad típusúakkal összehasonlítva [52]. Ezzel ellentétben Shaw-Fang Yet és munkatársai bizonyították HO-1 transzgén egerekkel való kísérletük során, hogy a HO-1 dózisfüggő módon javította szívizom kontraktilitását I/R-t követően. Azt tapasztalták, hogy a HO-1 overexpresszált állatoknál az oxidatív károsodás, az inflammatorikus sejtek migrációja jelentősen csökkent, valamint infarktusos terület nagysága csupán 14,7% volt, míg a vad típusúaknál ez az érték 56,5% volt [53]. Azonban a HO-1 protektív hatása megszüntethető a HO-1 inhibitor, ón-protoporfirin IX jelenlétében [54]. Kutatócsoportunk is vizsgálta már korábban a HO-1 overexpresszió hatását I/R-t követően transzgén egerekben, ahol azt tapasztalták, hogy jobb balkamra funkcióval bírnak a vad típusúakhoz képest [55]. Továbbá kutatócsoportunk vizsgálta az antioxidáns tulajdonságú természetes vegyület, a meggymagbél-kivonat hatásait is I/R-t követően. Azt tapasztalták, hogy a meggymagbéllel történt kezelés dózis függő módon védte a szívszövetet az I/R okozta károsodásokkal szemben. A kezelés hatására a szívszövetben lényegesen emelkedett a HO-1 és az antiapoptotikus Bcl-2 expressziós szintje. A meggymagbél kezelést kapó állatoknál jelentősen javultak a posztisztkémiai szívfunkciók és az infarktusos terület nagymértékben csökkent [56, 57].

4. Az *Allium sativum* jellemzése

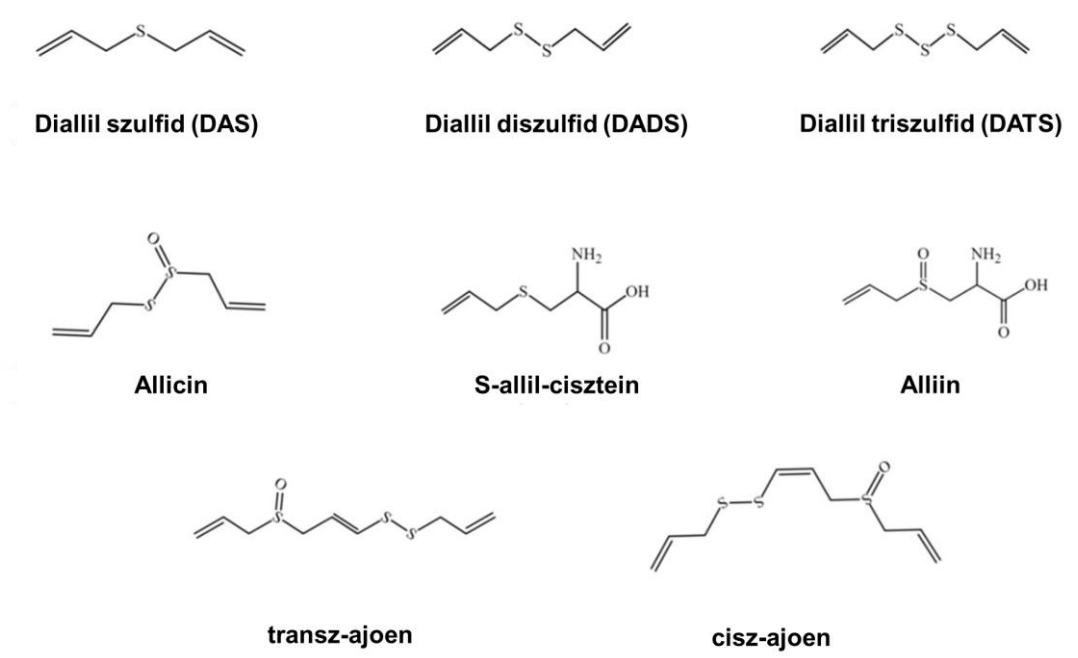
Az *Allium sativum*, hétköznapi nevén fokhagyma, az Amaryllidaceae család *Allium* nemzetségébe tartozó egyik legfontosabb zöldségnövény. A vöröshagymát követően a szélesebb körben fogyasztott *Allium* faj [58]. A szabadon termőek az évelő növények csoportjába tartoznak, de a termesztett fajok az áttelelő egyévesek csoportjába sorolhatóak. A fokhagyma Közép-Ázsiából származik, de mára az egész világon elterjedt [59]. Hazánkban is termesztik, főként Makó és Dusnok környékén. A fokhagymát régóta alkalmazzák kulináris fűszerként és gyógynövényként egyaránt [60]. Az emberi szervezetre gyakorolt jótékony hatásai több ezer éve ismertek, amelyeket számos tudományos kutatás támaszt alá. Az Ebers-féle papyrusz tekercs alapján a Kheopsz piramis építése során a dolgozó munkások fokhagymát fogyasztottak, hogy növeljék az erejüket és teherbíró képességüket. Fontos szerepet töltött be a fokhagyma a görög katonák életében is, akik sebgyógyulás elősegítésére is alkalmazták. Az Olimpiai játékok során a versenyzők szintén fokhagymát fogyasztottak, egyfajta „doppingszerként” alkalmazták, a sportolók erőnlétét ezzel növelték. A középkorban a járványok, például pestis elkerülésére is fogyasztották. Hippokratész, sokféle gyógyhatást tulajdonított a fokhagymának [61].

A fokhagyma hagymateste fajtól és termesztési viszonytól függően változó méretű és számú fiókhagymákból, gerezdekből áll, amely igen jellegzetes, erős illattal rendelkezik. Sokak számára nehezen tolerálható a kellemetlen száj- és testszagot okozó hatása, és ezért vonakodnak a fogyasztásától. Mindezek következtében a számos előnyös terápiás hatása ellenére is jelentősen csökken a fokhagyma fogyasztása. Ennek elkerülése érdekében az élelmiszeripari tudósok kifejlesztették a tradicionális fokhagyma új változatát, a fekete fokhagymát. Gasztronómiai újdonságként egyre szélesebb körben elterjedt a friss fokhagyma fermentált változata, amely az eredeti fokhagyma számos tulajdonságát magában hordozza, de illatában, ízében és összetételében az újdonság erejével ható változások történnek. A friss fokhagyma egy természetes úton való öregedési folyamaton megy keresztül, amikor a fokhagyma fekete, puhább, zselés állagú és édesebb lesz [62, 63]. A fermentáció során egyrészt a hő denaturálja az allicináz enzimet, amely így nem tudja a jellegzetes illatért felelős allicin kialakítani, másrészt a Maillard reakció felelős a sötét színért és karamellizált ízért [63, 64]. A fekete fokhagyma összetételét tekintve eltér a fokhagymától, az antioxidáns tulajdonságú aktív vegyületek száma megnő [65].



5. ábra: Fokhagyma és a fekete fokhagyma

Egy átlagos fokhagyma gumó tömege 3-6 gramm között van. Összetételét tekintve 1 gramm szénhidrátot (90% polifruktozán), 0,2 gramm fehérjét, 0,01 gramm zsírt és A-, B1-, B2-, B3-, C-, E- vitaminokat, számos ásványi anyagot (kálcium, magnézium), nyomelemeket (mangán) tartalmaz [66]. Tartalmaz még fenolsavakat, fitoszteroidokat, polifenolokat, flavonoidokat, tanninokat, szaponinokat. A fokhagyma aktív összetevői még a közel 33 organikus kén tartalmú vegyület, mint például diallil szulfid (DAS), diallil diszulfid (DADS), diallil triszulfid (DATS), cisz-ajoen, transz-ajoen, S-allil-cisztein (SAC) és S-allil-cisztein-szulfoxid (alliin). Továbbá néhány enzimet is tartalmaz, mint például az allináz, peroxidáz, mirozináz enzimek [67, 68]. Az ép fokhagyma gerezdben nincs jelen a fokhagyma jellegzetes illatáért felelős alliicin (diallil-tioszulfínát), amely számos terápiás hatásért felelős. Az ép fokhagymában fizikailag elkülönítve található az alliin és allináz enzim, amelyek a fokhagyma gerezd összevágásával, törésével kapcsolatba kerülnek és az enzim hatására kialakul az allicin. Az allicin egy illékony aromás vegyület, amely pár órán belül elbomlik [69, 70].



6. ábra: A fokhagyma legfontosabb kén tartalmú vegyületei.

A fokhagyma készítmények jelentős része, a gumóból készült drogot tartalmazza, amely a friss fokhagyma begyűjtését követő aprítással és szárítással készül, vagy pedig a hidegen áztatással előállított fokhagymaolaj kivonatot [71].

A fokhagyma gyógyászati értéke igen jelentős, a farmakológiai kutatások az antimikrobiális tulajdonságaira fókuszáltak eleinte. A fokhagymának széles spektrumú antibakteriális, antifungális, antiprotozon és antivirális hatása van. Az antimikrobiális hatás nagyrészt az allicinnek köszönhető, amely számos Gram- pozitív és Gram- negatív baktérium, mint például: Shigella, Escherichia coli [72], Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa [73], Streptococcus mutans, Streptococcus faecalis, Streptococcus pyogenes, Salmonella enterica, Klebsiella aerogenes [74], Vibrio, Mycobacteria, Proteus vulgaris, és az Enterococcus faecalis ellen aktív. Az allicin szintén hatékonyan bizonyult a meticillin rezisztens Staphylococcus aureus (MRSA) ellen is. Az antimikrobiális hatása annak köszönhető, hogy kémiai reakció lép a thiol csoportot tartalmazó enzimekkel, mint például thioredoxin reductáz, RNS polimeráz és alkohol dehidrogenáz és oxidálja a cisztein vagy a glutation fehérje csoportot. Jelentős biocid hatással rendelkezik az allicin, gátolja a cisztein proteáz metabolizmust [58].

Számos tanulmány bizonyítja, hogy jelentős antioxidáns és gyulladásgátló hatással is rendelkezik a fokhagyma. Ilker Seckiner és munkatársai patkányokat vizsgálva azt találták, hogy a fokhagymakezelés megelőzte a gentamycin mellékhatásaként jelentkező nefrotoxicitást [75]. A fokozott HER-2 expressziót mutató dagantok kezelésénél alkalmazott trastuzumab

indukálta hepatotoxicitást is jelentősen csökkentette a patkányokon végzett kísérletek során [76]. Továbbá az paracetamol okozta hepatotoxicitást is képes csökkenteni. A fokhagyma kivonat a SOD, GPX and CAT antioxidáns enzimek aktivitását növeli [77].

A fokhagyma gyulladás gátló hatása annak köszönhető, hogy gátolja a neutrofil granulociták migrációját [78]. Xin Gu és munkatársai eger kísérletük során azt tapasztalták, hogy ankilotizáló spondylitis esetén az allicin kezelés csillapította a gerincet alkotó ízületek gyulladását, mivel számos inflammatorikus citokin szintjét csökkentette, mint például: IL-6, IL-8, and TNF- α , valamint gátolta a HLA-B27 fehérje transzlációt is [79]. Susan S Percival azt találta, hogy napi 2,56 gramm fekete fokhagyma fogyasztás 90 napon keresztül növelte a $\gamma\delta$ -T sejtek és a NK (Natural Killer) sejtek aktivitását, illetve csökkentette a TNF- α and IL-6 szintjét, továbbá a megfázások súlyosságát és időtartamát is mérsékelte [80]. Számos kísérlet támasztja alá, hogy a fokhagymához hasonlóan a fekete fokhagyma is rendelkezik gyulladásgátló hatással. A fekete fokhagymakloroformoskivonata csökkentette TNF- α által okozott nukleáris faktor-kappa (NF- κ B) aktivációt és ROS képződést humán köldökzsinór véna endotél sejteken. Továbbá, a fekete fokhagyma metanolos kivonata megelőzte a ciklooxygenáz-2 (COX-2) és a prosztaglandin E2 (PGE2) termelődést a NF- κ B inaktiváció által [81]. You és munkatársai leírták, hogy a fekete fokhagyma antiinflammatorikus hatása többek között a gyulladásos jelátvitelt elindító Toll-szerű receptor 4 (TLR4) jelátviteli kaszkád gátlásának köszönhető [82]. A fekete fokhagymagyulladásgátló hatását támasztja alá az is, hogy gátolja az iNOS és a COX-2 expressziót, ezáltal csökkenti a NO, interleukin-6 (IL-6) és a TNF- α képződést az LPS-aktivált RAW264.7 sejtekben [82]. Számos kutatás bizonyítja, hogy a fokhagyma jótékony hatással bír a diabétesz elleni küzdelemben is. Streptozotocin-indukálta I-es típusú diabéteszes patkányoknál 250 mg/ttkg fokhagyma kivonat 4 héten keresztül csökkentette a mortalitást, a β -sejtek károsodását, az oxidatív stresszt és a patológiás elváltozásokat [83]. Továbbá protektív hatást figyeltek meg a diabéteszes retinopátia esetén is [84].

Már a 20. században felismerték, hogy a fokhagyma fogyasztása szerepet játszhat a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésében és kezelésében. A fokhagyma kardioprotektív hatása háttérében az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátló hatás, NO biohasznosulás javítása, H₂S produkció fokozása és az antioxidáns hatása áll. A fokhagymafogyasztás csökkenti többek között, az ateroszklerózis, magas vérnyomás, diabétesz, hiperlipidémia és a miokardiális infarktus kockázatát. Egy meta-analízis alapján azt találták, hogy a fokhagyma fogyasztás 8,4 $\pm$ 2,8 Hgmm-el csökkenti a szisztolés vérnyomást és 7,3 $\pm$ 1,5 Hgmm-el a diasztolés vérnyomást [85]. A fokhagyma vérnyomás csökkentő hatása egyrészt az antiaterogén hatásával másrészt a vazodilatációt okozó hatásával magyarázható. Utóbbi hatás feltehetőleg

az endogén NO-szintézis fokozásával alakul ki. A fokhagymában jelenlévő arginin alapvető szerepet játszik a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) mediált NO képződésben. A sejtekben a NO a SH- csoporttal kapcsolódva a szolubilis guanilát ciklázt aktiválja, így cGMP felhalmozódást hoz létre, amely az erek simaizom relaxációját váltja ki. Miyuki Takashima és kutatótársai azt találták, hogy az adrenalin által kontrahált állapotban lévő izolált patkány aorta gyűrűt dózis függő módon relaxálja a fekete fokhagyma kezelés. Továbbá, a fokhagyma és külön az S-allil cisztein szulfoxid (SACS) komponens szinergista hatást fejt ki az ACE gátló kaptoprillal együttesen alkalmazva [86]. Sprague-Dawley patkányoknál és a H9c2 sejteknél az izoproterenol indukálta hipertrófiát a 15 napon keresztül tartó 250 mg/ ttkg fokhagyma kezelés mérsékelte, melynek háttérében a hipertrófia során csökkent működésű Na^+/K^+ -ATPáz funkciójának helyreállítása áll [87].

A fokhagyma jelentős antihiperlipidémiás hatással rendelkezik, amit számos humán és állatkísérlet támaszt alá. Az allicin a koleszterinszintézis sebesség meghatározó lépését katalizáló enzim, a HMGCoA reduktáz potens gátlójának bizonyult [88]. Mansell és munkatársai 60 2-es típusú diabéteszben szenvedő beteget kezeltek 900 mg fokhagymát tartalmazó tablettával, amely 6 hét után csökkentette a triglicerid és az LDL szintet, a HDL szint pedig 12 hét kezelés után szignifikánsan nőtt [89]. Xing Lin Ho és munkatársai 41 hiperkoleszterinémiás beteggel való vizsgálatuk során azt tapasztalták, hogy napi 1080 mg fokhagyma fogyasztás 13 héten keresztül csökkentette a mieloperoxidáz, lipid hidropoxidáz és az F_2 izoprosztánok szintjét. Ez a csökkenés szignifikánsan magasabb volt a fekete fokhagymával kezelt csoportban [90].

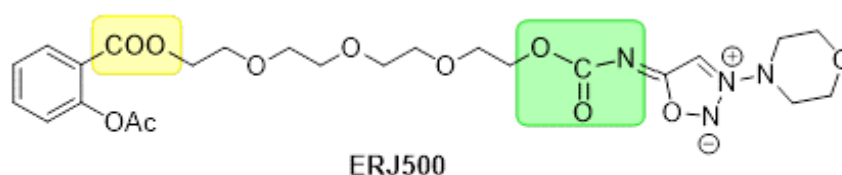
A fokhagyma trombocita aggregáció gátló és fibrinolitikus hatását is számos in vitro és humán kísérlet támasztja alá. A fokhagyma kivonat gátolja az adenosin-difoszfát (ADP) és az arachidonsav által indukált trombocita aggregációt dózis függő módon [91]. A gátló hatás háttérében az ajoen vegyület ciklooxygenáz, lipoxigenáz [92] és a glikoprotein IIb/IIa receptort gátló hatása játszik fontos szerepet [93].

5. Hibrid aszpirin vegyületek

Az iszkémiás szívbetegségek báziskezelésének fontos eleme a trombocita aggregációt gátlók. A trombocita aggregációt gátló gyógyszerek egyik legrégebb óta ismert és legfontosabb képviselője az acetilszalicilsav (ASA). Az ASA-t alkalmazzák az akut kezelések során, mint például akut miokardiális infarktus (MI), stabil és instabil angina pectoris során, artériás érsebészeti beavatkozások után (pl. PTCA, CABG). Továbbá különböző társbetegségek

kardiovaszkuláris szövődményeinek csökkentésére is használják. Multicentrikus, randomizált vizsgálat, ISIS-II igazolta, hogy az azonnal adott 162,5 mg aszpirin csökkenti a mortalitást az akut miokardiális infarktust követően [94]. A PCI-CURE tanulmány szerint már a kis dózisú (≤ 100 mg) aszpirin is hatásos a perkután koronária intervenciót követően [95]. Az aszpirin hatását úgy fejt ki, hogy acetilálja a ciklooxygenáz enzimet, így az enzim irreverzibilisen bénul [96]. A ciklooxygenáz enzimnek két izotípusa létezik: COX-1, COX-2. A COX-1 enzim konstitutív enzim, számos helyen előfordul (például a gyomorban, vérlemezkékben, vesében és az erekben is). A COX-2 indukálható enzim, gyulladásos ingerekre képződik [97, 98]. Az aszpirin relatív szelektív COX-1 enzim gátló, tehát a COX-1 enzimet erősebben gátolja, mint a COX-2 enzimet. A COX enzim az arachidonsavból a ciklikus endoperoxidokon keresztül a tromboxán és a prosztaglandinok képződését katalizálja. A vérlemezkékben történő tromboxán A₂ szintézis gátlásával megakadályozza a trombociták aggregációját [99]. A vérlemezkék nem képesek a COX enzimek regenerálására, így az acetilszalicilsav COX-1 enzimbénító hatásának időtartama megegyezik a vérlemezkék élettartamával (8-10 nap) [100]. Az aszpirin alkalmazásának korlátja a gyakran és már kis dózisban is jelentkező mellékhatásai, mint például: gyomorfekély, -vérzés [101]. A nyálkahártya károsodás hátterében többféle mechanizmus áll. Egyrészt a csökkent prosztaglandin szintézis miatt alakulhat ki, ugyanis a prosztaglandin E₂ és I₂ gátolja a gyomorsav-elválasztást, serkenti a gyomor mucustermelését és szerepe van a mikrocirkuláció fenntartásában is. Másrészt, az acetilszalicilsav lokális, irritatív hatása is hozzájárul a nyálkahártya károsodásához [102]. A gyógyszerkutatás során az egyik fő cél ezen mellékhatások csökkentése. Mindezek vezettek el a hibrid aszpireinek kidolgozásához, mivel a nitrogén-monoxid (NO) és/ vagy a kénhidrogén (H₂S) felszabadulásával csökkenthetőek a mellékhatások. A hibrid aszpirin csoport olyan acetilszalicilsav kovalens konjugátum, amelyek NO és/ vagy H₂S kibocsátó csoportot tartalmaz [103]. A NO egy fontos mediátor és neurotranszmitter szereppel bíró gáz halmazállapotú molekula a szervezetben. Robert. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad orvosi Nobel díjat kaptak 1998-ban a NO kardiovaszkuláris rendszerben felfedezett hatásaiért [104]. A NO fiziológiás értágító, fontos szerepet játszik az arteriolák és a kis artériák bazális tónusának beállításában is. A sejtekben a NO argininből keletkezik a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) hatására. A szervezetben a NO szabadon diffundál és a célsejtekhez érve aktiválja a guanilát cikláz enzimet, amely hatására emelkedik a cGMP- szint [105] [106]. Gátolja a trombociták aggregációját és adhézióját is [107-109]. Ezen kívül fontos szerepet tölt be a gasztrointesztinális nyálkahártya károsodás védelmében is. Egyrészt gátolja a gyulladásos mediátorok felszabadulását a hízósejtekből [110], másrészt serkenti a mucos szekréciót [111]. Továbbá kedvezően hat a már kialakult

fekélyekre is [112]. A NO -t felszabadító hibrid aszpirinek gátolhatják a COX-1 inhibíciója miatt kialakuló gyomorfekélyt is. Kezdetben elsősorban nitrátészter tartalmú hibrid aszpirineket szintetizáltak. Azonban a nitrátok alkalmazásának egyik legnagyobb korlátja a nitráttolerancia kialakulása, amely leggyakrabban a tartós és/vagy nagy dózisú kezelés során alakul ki. Előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek a nitrátokhoz hasonló szerkezetű, újabb antianginás szerek, mint például a molszidomin, amelynél sokkal ritkább a tolerancia kialakulása [113]. Ilyen NO-t felszabadító aszpirin hibrid vegyület az ERJ-500 is, amelyet a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszeréskémia Tanszék munkatársai szintetizáltak. Az ERJ-500 egy olyan aszpirin-észterszármazék, melyben a karboxilcsoporthoz a vízdékonyságot fokozó tetraetilénglikol láncsal csatlakozó linszidomin molekularészlet található, amely a molszidomin aktív hatású metabolitja.



7. ábra: ERJ-500 szerkezeti képlete, sárgával a karboxil csoport, zölddel a karbamát csoport jelölve.

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célul tűztük ki a fekete fokhagyma és az ERJ-500 vegyület szív- és érrendszeri hatásainak vizsgálatát iszkémia reperfúzió során.

I. Kísérleteink első részében vizsgálni kívántuk, hogy a gasztronómiai újdonságként előtérbe került, ízben és illatban is új jegyeket hordozó fekete fokhagyma milyen szív- és érrendszeri hatásokkal rendelkezik az iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban a fokhagymával összehasonlítva.

II. Kísérletünk második részében a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Kémia tanszékkal együttműködve célul tűztük ki egy újonnan szintetizált gázhírvivő molekulát felszabadító acetilszalicilsav származék szintézisét és farmakológiai hatásainak vizsgálatát. Kíváncsiak voltunk az előállított hibrid molekula, az ERJ-500, kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásaira. Elsőként H9c2 sejtvonalon, majd patkánymodellen végeztük kísérleteinket.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:

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

4.1.1. Kísérleti állatok

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

4.1.2. Kezelési protokoll

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

4.1.3. Fekete fokhagyma előállítása

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

A fekete fokhagyma előállítását és a GC-MS analízisét Dr. Prokisch József és munkatársai végezték a DE MÉK, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézetben.

4.1.4. GC-MS analízis

A fokhagyma és a fekete fokhagyma összetételének vizsgálatát SPME-GC-MS módszerrel végeztük. A SPME mintaelőkészítés manuálisan történt, az egyes mintákat összevágást és összetörést követően egy szeptummal rendelkező headspace-be helyeztük. Az extrakciót kézi eszközzel végeztük a szeptumon keresztül, amihez 85 µm-es poliakrilát szálát alkalmaztunk. Az extrakciós idő 1 óra, az extrakciós hőmérséklet pedig 50°C volt. Az egyes komponenseket GC-MS módszerrel azonosítottuk, egy Hewlett-Packard gyártmányú 5890 Series II típusú gázkromatográf – 5971A típusú tömegspektrométeren. A mintát HP-5 állófázisú kapilláris oszlopra vittük fel (25 m x 0,25 mm x 0,25µm). A vivőgáz hélium (1 mL/perc, 40°C) volt és állandó volt az injektor nyomás. Az elemzési hőmérséklet a következő volt: 55°C kiindulási hőmérséklet 2 percig, majd 20°C/perc melegítéssel 200°C véghőmérséklet eléréséig. A teljes elemzési idő 27 perc volt. Az injektor hőmérséklete 200°C volt, töltet nélküli szilanizált linert alkalmaztunk. A transzfer line hőmérséklete 280°C volt. Az ionizációs energia 70 eV, a tömegtartomány 10-500 AMU volt. A GC-MS vezérlése, az adatgyűjtés és az eredmények kiértékelése Hewlett-Packard GC-MS Chemstation rev.3 program segítségével történt. A komponenseket a tömegspektrumok felhasználásával, Nist98 és Wiley adatbázisok segítségével azonosítottuk.

4.1.5. Izolált dolgozó szív preparátum, szívfunkciós paraméterek

A 4 hetes kezelési periódus végén, 24 órával az utolsó kezelést követően az állatokat intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitál (60mg/ttkg) injekcióval altattuk el, valamint antikoagulánsként intravénásan heparint (1000 U/kg) kaptak. Az anesztézia alatt torakotómiát végeztünk, izoláltuk a szíveket, majd jéghideg módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferbe (KHB) (tartalma: 118 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, és 5,0 mM glükóz) helyeztük. Ezt követően az aortán át kanüláltuk a szíveket és 5 percen keresztül nem dolgozó módban, módosított KHB pufferrel perfundáltuk 100 vízcentiméter nyomás mellett azért, hogy kimossuk a vért a vaszkulaturából. A puffert a kísérlet időtartama alatt karbogén gázzal (95% O₂ és 5% CO₂) buborékolattuk és 37°C-on tartottuk. A pulmonáris vénát kanüláltuk az 5 perces mosási szakasz alatt, majd a készüléket átkapcsoltuk dolgozó módba 10 percre. Dolgozó mód során az aortás beáramlást elzártuk, a vena pulmonális felől perfundáltuk a szíveket 17 vízcentiméteres nyomással. A 10 perces dolgozó módot követően rögzítettük az alapértékeket. A teljes kísérlet időtartama alatt az

aortanyomást egy nyomásmérő segítségével mértük. (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Australia), amelyet minden kísérlet előtt kalibráltunk. A szívfrekvenciát (HR) és az aorta nyomás idő szerinti első deriváltja (AOdP/dT) a folyamatosan rögzített aortanyomásból számolta a szoftver. A koronária áramlást (CF) a koronáriákból kiáramló folyadék 1 percig tartó összegyűjtésével mértük. Az aorta kiáramlást (AF) az utóterhelés után 1 perc alatt mért visszacsöpögő puffer mennyiségével adtuk meg. A perctérfogatot (CO) az AF és a CF összegeként, a verőtérfogatot (SV) pedig a CO és a HR hányadosaként határoztuk meg. A verőtérfogat változást úgy számoltuk, hogy az SV reperfúzió utáni értékét elosztottuk a hozzátartozó alapértékkel, majd szoroztuk 100-zal. Az alapértékek rögzítését követően 30 perc globál iszkémiát váltottunk ki, amit 120 perc reperfúzió követett. A fatális kimenetelű kamrai fibrillációk elkerülése érdekében a reperfúzió első 10 perces szakaszát Langendorff módban indítottuk el. A szívfunkciós értékeket regisztráltuk 30, 60 és 120 perc reperfúzió után.

4.1.6. Infarktusos terület meghatározása

A miokardiumot ért infarktusos terület meghatározásához TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) festést végeztünk. TTC festés során az élő sejtekben lévő dehidrogenázok hatására a TTC molekula redukálódik. Az enzimatikusan aktív sejteknél az átalakulás során így a sárga színű, vízben oldható TTC festék vörös színű, vízben oldhatatlan trifenil-formazán csapadékká alakul át. Azonban az elhalt sejtek nem képesek redukálni a TTC festéket, így ezen sejteknél nem figyelhető meg a színváltozás. Az iszkémia/reperfúziót követően 50 ml 1%-os trifenil-tetrazólium-klorid oldattal perfundáltuk a szíveket. Ezt követően -70°C-on fagyasztottuk, majd a kamrai szövetet transzverzálisan 1-2 mm-es szeletekre vágtuk az apico-bazális axisra merőlegesen. Szkennelést követően lemértük a tömegüket. A veszélyeztetett és az infarktusos zóna területének nagyságát Fiji planimetriás szoftverrel határoztuk meg [114]. Az egész "risk" zónához hasonlítottuk az infarktusos terület nagyságát és ezek arányának a szeletek tömegéhez viszonyított értékeit ábrázoltuk a grafikonon.

4.1.7. Vér paraméterek

A 4 hetes kezelést követően, az állatok altatása után a bal oldali juguláris vénából vért gyűjtöttünk a vérparaméterek meghatározása érdekében. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézete végezte. Az alábbi paraméter értékeket vizsgálták: alanin aminosztransferáz (ALT), alkalikus foszfatáz (ALP), aszpartát aminosztransferáz (ASTL), összkoleszterin (CHO), alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL),

triglicerid (TRIG, nagy sűrűségű lipoprotein (HDL), laktát dehidrogenáz (LDH), C-reaktív protein (CRP), and kreatin-kináz-myoglobin (CK-MB).

4.1.8. Fehérje izolálás

A fehérje izolálást során a szívszövet bal kamrájából kb. 300 mg-ot használtunk fel. A homogenizáló puffer összetétele a következő volt: 25mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM pirofoszfát, 10 mM okadánsav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1x proteáz inhibitor koktél, majd polytron homogenizátorral jégen tartva a mintát homogenizáltuk. A homogenizáló oldat valamennyi összetevője a Sigma Aldrich-től származott. Ezt követően 2000 rpm-en 4°C-on 10 percig centrifugáltuk mintákat. A felülúszót átpipettáztuk egy új Eppendorff csőbe és 10000 rpm-en 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót, amely a citoszolikus frakciót tartalmazta egy új csőbe tettük át. A fehérjék koncentrációjának meghatározásához BCA Protein Assay Kit-et (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) használtunk. Standardként marha szérum albumint (BSA) használtunk. A mintákhoz Laemmli puffert adtunk és 10 percig 98°C-on denaturáltuk.

4.1.9. Western blot analízis

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

Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével exponáltuk Chemidoc digital imagers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékben. Az eredmények kiértékelése Image Lab Szoftverrel történt. Az általunk vizsgált egyes fehérjék expressziójának szintjét a vizsgált célfehérje chemiluminescence intenzitása / teljes fehérje mennyisége alapján számoltuk. A teljes fehérje normalizációs módszer alkalmazásával eliminálni tudjuk az instabil háztartási fehérjékkel történő normalizálás hibáját.

4.1.10. Statisztikai elemzés

A kapott adatokat a számtani átlag és a középérték standard hibájával (SEM) adtuk meg. A statisztikai adatok elemzését GraphPad Prism 7 szoftverrel (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA) végeztük. Egyutas ANOVA teszttel néztük az eltéréseket, majd Kruskal-Wallis vagy Dunnett próbát végeztünk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p kisebb volt, mint 0,05.

4.2. Módszerek II. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata

4.2.1. In vitro kísérletek

4.2.1.1. Oxidatív stabilitás

Kémiai Fenton reakció

Fenton reakciót Jurva és munkatársai által leírt módon végeztük kisebb módosításokkal [115]. A vizsgálandó vegyületünkéből 400 μL 2,5 mM-os oldatot elegyítettünk 50 μL 20 mM-os FeCl_3 oldattal, 50 μL 20 mM-os EDTA- Na_2 oldattal és 500 μL 10 mM-os aszkorbinsav oldattal. Ezt követően a reakciót 1 μL 30%-os H_2O_2 hozzáadásával indítottuk el. Az oldatot 1 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. A kísérlet során vakként ERJ-500-at nem tartalmazó oldatot használtunk. A kontrollként használt minta nem tartalmazott H_2O_2 -t. Az oldatokból 1 óra kevertetés után mintát vettünk, amit off-line elemeztünk egy ESI ionforrással és fecskendőpumpával felszerelt API2000 triplet kvadrupól tömegspektrométerrel (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). A tömegspektrumot m/z 100-500 tartományban, pozitív módban vettük fel Analyst 1.5.1. Szoftver (AB SCIEX, Concord, ON, Canada) segítségével.

Szintetikus porfirin rendszer

A kísérletet Johansson és munkatársai által leírt módon végeztük kisebb módosításokkal [116]. A kísérlethez 50 μL 10 mM-os ERJ-500 oldatot használtunk. Vizsgálati anyagunk oldatát elegyítettük 35 μL acetonitrillel (ACN), 315 μL 100 mM-os

hangyasav oldattal, 50 μL 10 mM-os Fe(III) mezo-tetra(4-szulfonatofenil)porfin-klorid oldattal és 50 μL 30 %-os H_2O_2 -al, majd 37 °C-on rázattuk 30 percig 700 fordulat/perccel ThermoMixer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) használatával. Az off-line LC-MS analízist (Kinetex XB-C18 2,6 μm kolonna, 0,1% hangyasavval elegyített ACN és 0,1% hangyasav eluensek, gradiens elúció) LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) lineáris ioncsapda analizátorral és ESI ionforrással szerelt tömegspektrométerrel végeztük pozitív módban.

Az oxidatív stabilitási vizsgálatok során a tömegspektrometriás méréseket Dr. Szabados-Fürjesi Péter végezte.

4.2.1.2. A sejtek életképességének vizsgálata MTT assay-vel

Az ERJ-500 vegyület toxicitását kolorimetriás MTT assay-vel vizsgáltuk H9c2 sejtvonalon. A H9c2 kardiomiocita sejtvonal az ATCC-től (CRL-1446, LGC Standard GmbH Wesel, Németország) származott. Az életképes sejtek mitokondriális dehidrogenázai a sárga színű 3-(4,5-dimetil-thiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot (MTT) lila színű formazán kristályokká redukálják, amelyek szolubilis formája fotometriásan mérhető. A lila szín erőssége az életképes sejtek arányával korrelál. A vizsgálathoz a sejteket 96 lyukú TPP plate-re szélesztettük, lyukanként 3000 db-ot. A kísérleteket 24 óra elteltével, a sejtek letapadását követően kezdtük el. A sejteket 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM koncentrációjú ERJ-500-al, valamint 100 μM molszidominnal, 100 μM aszpirinnel kezeltük. Pozitív kontrollként 1 %-os H_2O_2 kezelést alkalmaztunk. A sejteket a kezelést követően 24 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. Majd hozzáadtunk 20 μl sárga színű 5 mg/ml koncentrációjú PBS-ben oldott MTT oldatot, amivel 3,5 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően eltávolítottuk a sejtekről az oldatot és 200 μl izopropilalkohollal oldottuk fel a képződött formazán kristályokat, amellyel 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően az abszorbanciát mértük 570 nm-en és 690 nm-en a plate olvasó (FLUOstar Optima, BMG Labtech) segítségével. Az 570 nm-en mért érték az oldott formazán abszorpciós maximuma. A 690 nm-en mért érték a háttér értéket adta meg, amelyet korrigálásképpen kivontunk az 570 nm-en mért értékből. Az így kapott értékeket hasonlítottuk a kezeletlen kontroll csoportéhoz.

4.2.1.3. Hemolitikus aktivitás mérés

A hemolízis teszthez elvégzéséhez SD patkányok vérért használtuk. A vért K_3EDTA -t tartalmazó vérvételi csövekbe (BD, Plymouth, UK) vettük le. A vér alakos elemeinek

elválasztásához 2500 g-n 10 percig centrifugáltuk a koagulált vért, majd háromszor mostuk PBS-el és végül szuszpendáltuk az oldatban. Az ERJ-500-at különböző koncentrációban PBS-ben oldottuk: 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ERJ-500, valamint 100 μ M MOL és ugyanilyen koncentrációjú ASA oldatot készítettünk. Az oldatokhoz 5×10^7 számú eritrocitát adtunk, majd, 37°C-on 10 percig inkubáltuk, végül 5000 g-n centrifugáltuk. A felülúszóból mértük a hemolízist követően kiszabadult hemoglobin abszorbanciáját 540nm-en a FLUOstar OPTIMA Microplate Reader-el. A kontroll kísérletként az eritrocitákat duplán desztillált vízzel kevertük össze. A hemolízis százalékát a mintákat tartalmazó oldatok felülúszójából mért hemoglobin és a vizet tartalmazó oldat felülúszójából mért hemoglobin abszorbancia hányadosaként határoztuk meg és ábrázoltuk a koncentráció függvényében.

4.2.2. Ex vivo kísérletek

4.2.2.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket nőstény SD patkányokon végeztük. Az állatokoknak szabad hozzáférést biztosítottunk a standard rágcsáló táphoz (R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) és a vízhez. Az állatok 12 órás sötét-fény periódusú környezetben voltak tartva, amelynek a hőmérséklete 25 ± 2 °C és relatív páratartalma $55\% \pm 5\%$ volt. Az állatok kezelését és a kísérleti elrendezését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DEMAB) engedélyezte. Az állatkísérleti engedély száma 13/2017/DEMAB–Új vasoaktív hatóanyag vizsgálata. Kísérletünk során a DEMAB irányelveit tartottuk szem előtt az Európai Unió és a „Principles of Laboratory Animal Care” valamint a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival (NIH 85-23, revised 1996) összhangban

4.2.2.5. Langendorff szívizoláció, izolált dolgozó mód

A 4.1.5. Izolált dolgozó szív preparátum, szívfunkciós paraméterek című fejezetben leírtak szerint történt néhány módosítással. Az ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásait nőstény SD patkányokon tanulmányoztuk. A patkányok testtömege 248 ± 6 g volt. Az 5 perces átmosási periódus követően Langendorff módban 10 percen keresztül adagoltuk az ERJ-500-at tartalmazó puffert, amit egy 10 perces kimosási szakasz követett, majd ismét 10 percig az ERJ-500-at tartalmazó puffer áramlott át a szíven. A kísérlet során 100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, illetve 1 μ M-os koncentrációkban tartalmazta a puffertartály az ERJ-500-at.

Ezt követően izolált dolgozó módban is vizsgáltuk az ERJ-500 hatásait. A kontroll csoport 6 állatot, míg a kezelt csoport 11 állatot tartalmazott. Az előzőekben ismertetett szívizolációt követően a „nemdolgozó” módból „dolgozó” módba állítottuk át a készüléket.

Dolgozó mód során elzárjuk az aorta felőli perfúziós oldat beáramlási lehetőségét és megnyitjuk a pulmonális véna felől. Ezzel lehetőséget biztosítunk a szívnek, hogy az aorta irányából a kontrakció következtében ki tudja pumpálni az egy összehúzódásra eső verőtér fogatot. A dolgozó módba való átkapcsolást egy 10 perces kimosási periódus követett. Majd regisztráltuk az alap dolgozó szív A kezelt csoportban az ERJ-500 vegyületet a KHB pufferhez adtuk hozzá 100 μ M koncentrációban 5 percig, majd ismét mértük a szívfunkciós értékeket. Majd 30 perc globál iszkémiát váltottunk ki, amit 90 perc reperfúzió. A fatális kimenetelű kamrai fibrillációk elkerülése érdekében a reperfúzió első 10 perces szakaszát Langendorff módban indítottuk el.

4.2.2.6. TTC festés

A **4.1.6. Infarktusos terület meghatározása** című fejezetben leírtak szerint történt.

4.2.2.7. Statisztikai elemzés

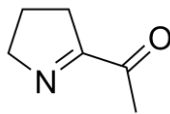
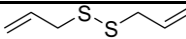
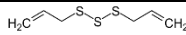
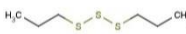
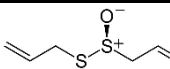
Az eredményeink kiértékelése során számtani átlagot és középérték standard hibáját adtuk meg. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. A statisztikai elemzéshez és az eredmények ábrázolásához GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).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

5. EREDMÉNYEK

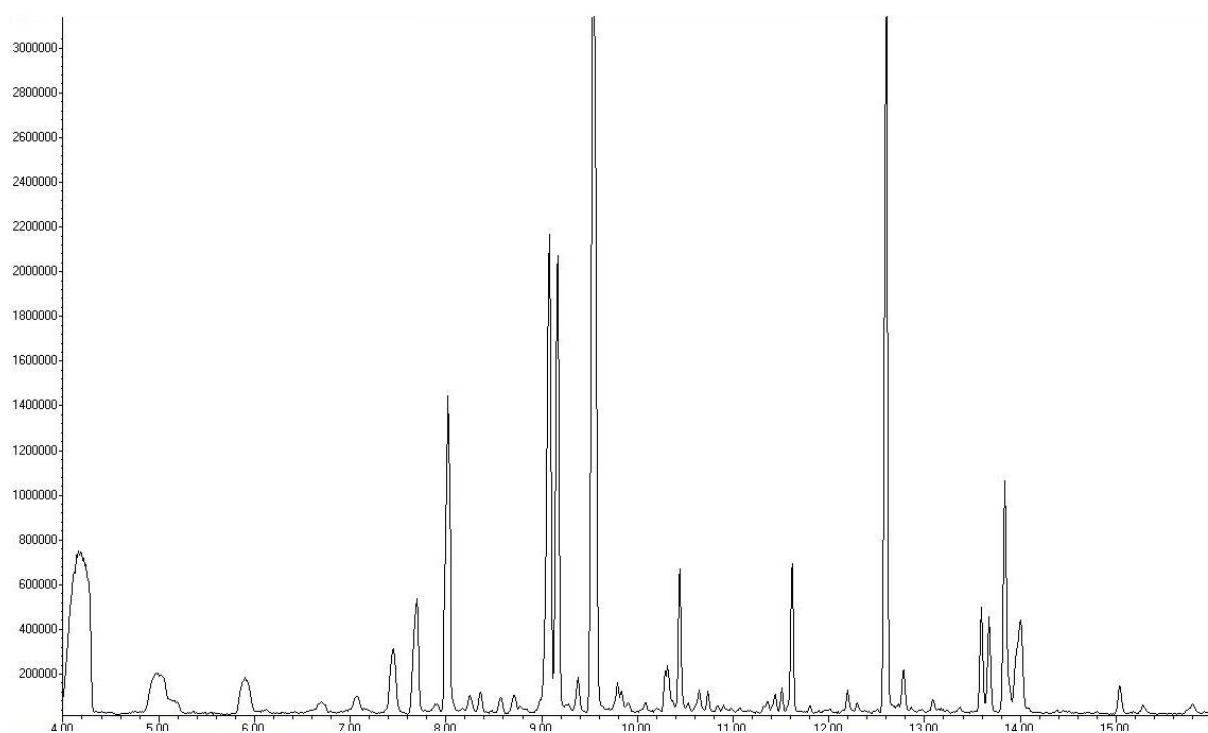
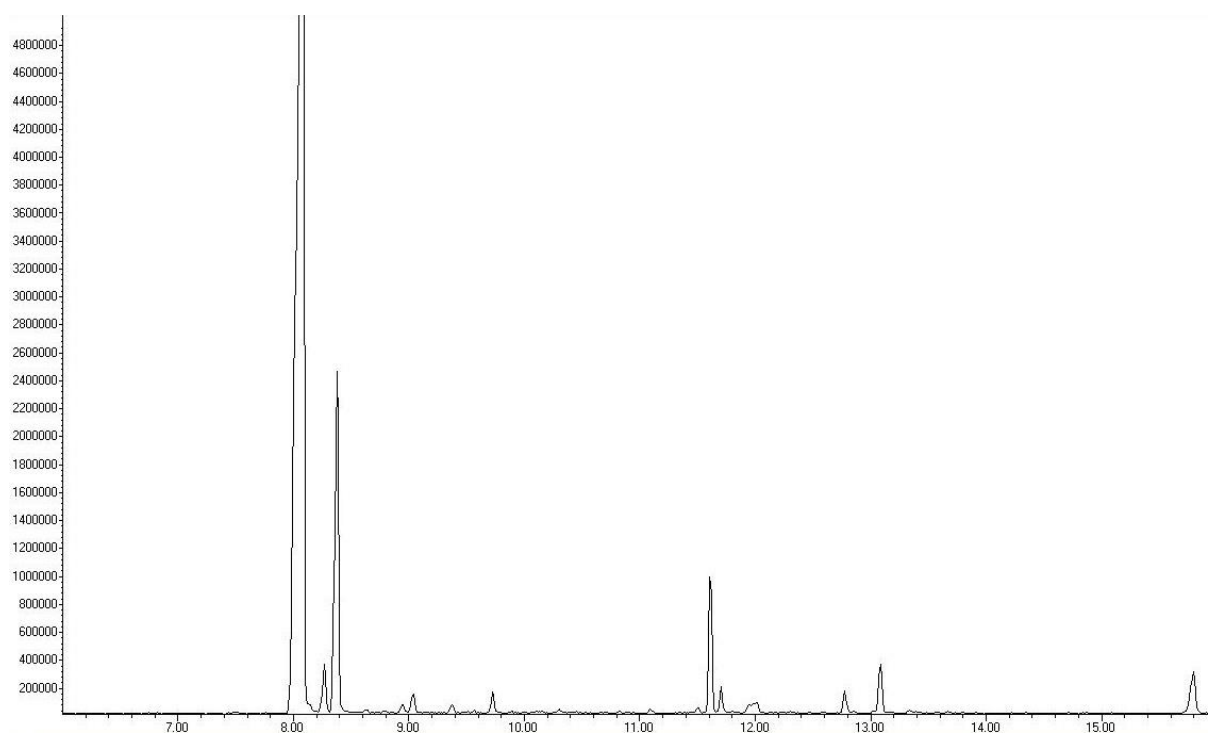
5.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma szív-és érrendszeri hatásainak vizsgálata iszkémia/reperfundált kamrai szívizomban

5.1.1. A fokhagyma és a fekete fokhagyma komponenseinek vizsgálata

Az 1. táblázatban és az 8. ábrán láthatóak a kén tartalmú komponensek mindkét fokhagyma készítményben. A mérési eredmény alapján elmondható, hogy a kéntartalmú vegyületek száma és mennyisége nagyobb a fekete fokhagymában, mint a fokhagymában. A fekete fokhagymában nem volt detektálható az allicin. A fekete fokhagyma öregedési folyamata során, Maillard reakció ment végbe, melyet a 2-acetil-1-pirrolin keletkezése támaszt alá.

Vegyület	Retenciós idő (perc)	Fokhagyma	Fekete fokhagyma	Képlet
2-acetil-1-pirrolin	7.6	-	+	
diallil diszulfid	8.0	+	+	
diallil triszulfid	9.1	+	+	
dipropil triszulfid	11.6	+	+	
allicin	11.7	+	-	

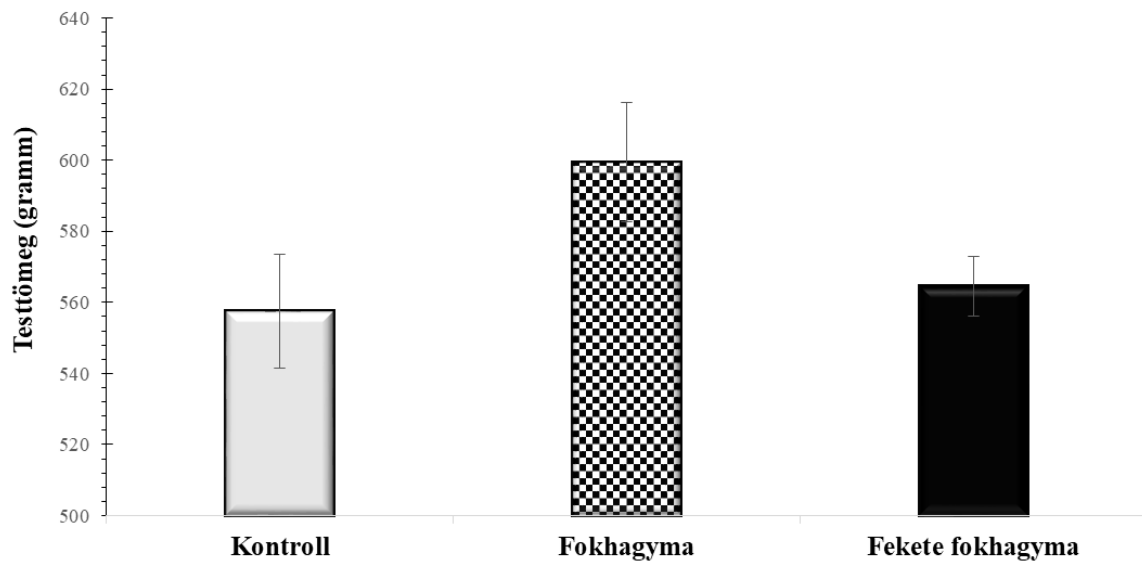
1. táblázat: A fokhagymában és a fekete fokhagymában azonosított vegyületek. A '+' jelentése – detektálható; '-' pedig a nem detektálható vagy csak nagyon alacsony koncentrációt jelent.



8. ábra: Fokhagyma (felső ábra) és a fekete fokhagyma (alsó ábra) reprezentatív kromatogramja.

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

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



9. ábra: Kontroll csoport, fokhagyma és fekete fokhagyma kezelést kapott állatok testtömeg átlaga a 4 hetes kezeléseket követően. Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájával (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk.

5.1.3. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása vérparaméterekre

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

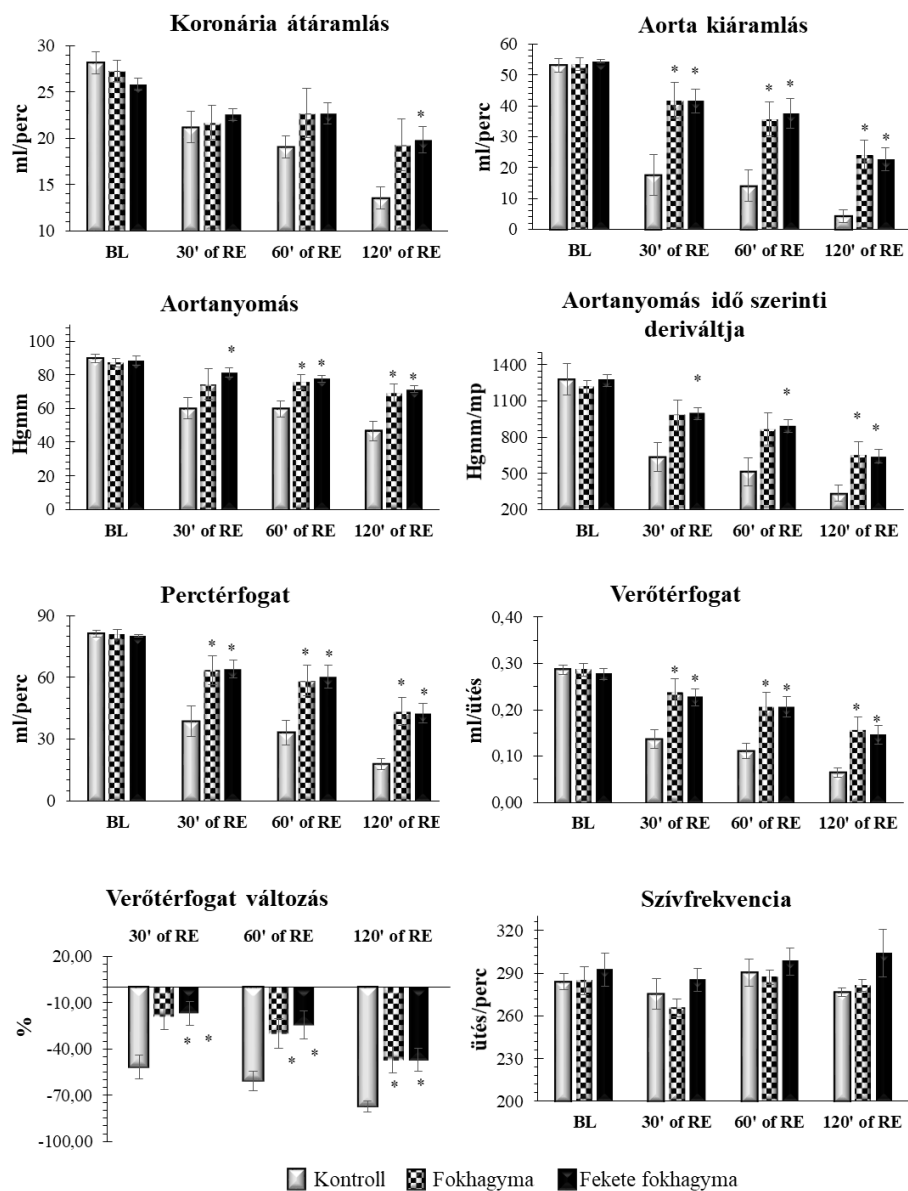
	Kontroll	Fokhagyma	Fekete fokhagyma
ALT (U/L)	45 ± 3.28	47.1 ± 1.89	44.1 ± 1.43
ALP (U/L)	91.28 ± 9.19	90.20 ± 1.27	84.78 ± 4.42
ASTL (U/L)	89.13 ± 9.14	89.6 ± 3.83	87.89 ± 4.31
CHO (mmol/l)	1.30 ± 0.12	1.41 ± 0.07	1.58 ± 0.05
LDL (mmol/l)	0.224 ± 0.020	0.294 ± 0.019 *	0.35 ± 0.021 *
TRIG (mmol/l)	1.35 ± 0.23	1.073 ± 0.12	1.32 ± 0.10
HDL (mmol/l)	1.09 ± 0.11	1.19 ± 0.04	1.25 ± 0.06
LDH (U/L)	811.5 ± 173.7	772.5 ± 88.54	801.8 ± 81.64
CRP (mg/L)	1.35 ± 0.23	1.07 ± 0.12	1.32 ± 0.10
CK-MB (U/L)	765.73 ± 154.68	656.86 ± 66.15	746.26 ± 89.18

2. táblázat: A fokhagyma és fekete fokhagyma kezelés hatása a vérparaméterekre. N=9 állat csoportonként. Az eredményeket a középérték ± középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk.

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

Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a fokhagyma és a fekete fokhagyma hatását 4 hetes kezelést követően az izolált szíveket 30 perces iszkémiának és 120 perces reperfúciónak vetettük alá. A preisztkémiai szívfunkciós értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást az egyes csoportok között. Azonban az iszkémiát követő reperfúzió során jelentős változást regisztráltunk a szívfunkciók értékében. A reperfúzió során a koronária átáramlás a kezelt

állatoknál magasabb volt, mint a kontroll csoportnál. A kezeletlen állatoknál az átáramló puffer mennyisége folyamatosan csökkent a reperfúzió 120. percéig, azonban a kezelt csoportokban az iszkémia előtti értékhez képest csökkent, de ezt követően a reperfúzió során nem változott lényegesen. A szívfrekvencia nem változott lényegesen a kísérlet során. A kontroll csoportnál $283,8 \pm 14,8$ ütés/perc, a fokhagymával kezelt csoportnál $284,4 \pm 26,1$ ütés/perc, míg a fekete fokhagymával kezelt esetben $292,4 \pm 30,4$ ütés/perc volt. A kezeletlen és a fokhagymával kezelt állatoknál a tendencia a reperfúzió során is megmaradt. A fekete fokhagymával kezelt állatoknál a szívfrekvencia a reperfúzió végére kis mértékben növekedett ($303,8 \pm 44,1$ ütés/perc), azonban nem volt jelentős a változás. A perctérfogat szignifikánsan magasabb volt a kezelt állatok esetében a reperfúzió 30., 60. és 120. percénél, mint a kezeletlen csoporté. Iszkémia előtt mindhárom csoport perctérfogat értéke közel azonos volt. Az aorta kiáramlás jelentősen emelkedett a kezelt csoportokban, szám szerint a fokhagyma kezelést követően $24,1 \pm 4,6$ ml, fekete fokhagyma kezelést követően $22,7 \pm 3,8$ ml-re nőtt, amíg a kontroll csoportban $4,3 \pm 2,0$ ml volt.

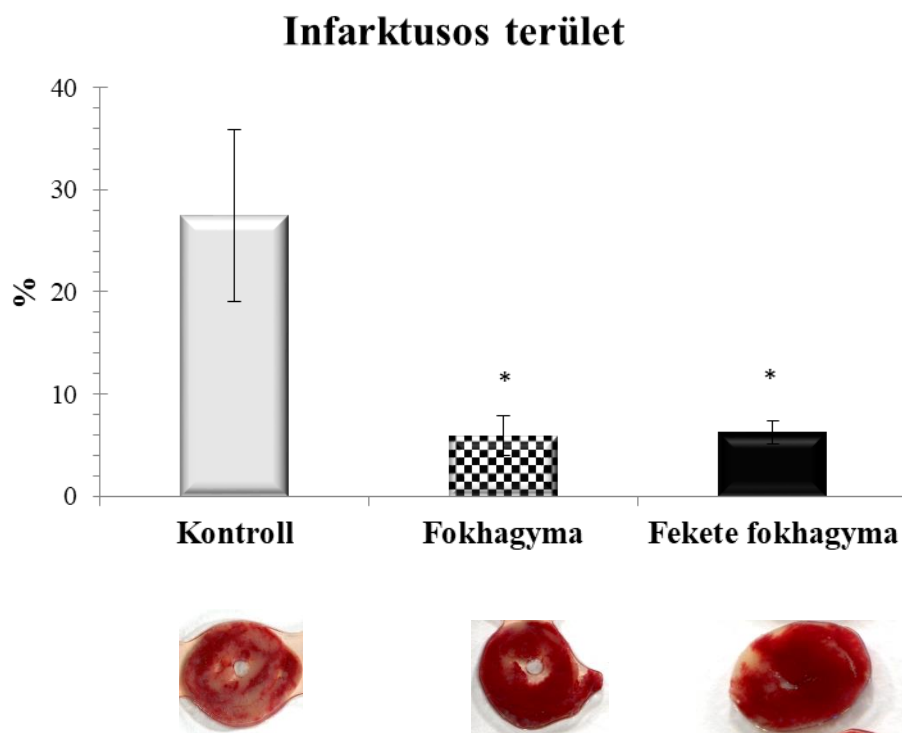


10. ábra: Szívfunkciók alakulása iszkémia előtt (BL) és a reperfúzió 30., 60., és a 90. percében. Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. $N=9$ minden csoportban.

5.1.5. A fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása az infarktusos területre

A fokhagyma és a fekete fokhagyma kardioprotektív hatásának vizsgálatához az I/R-t követően TTC festést alkalmaztunk, amellyel megvizsgáltuk az élő és az elhalt szívszövet arányát. A 11. ábrán látható, hogy a kontroll csoportnál az infarktusos terület $27,5 \pm 8,4\%$ -nak adódott. A fokhagymával és a fekete fokhagymával kezelt csoportokban azonban szignifikánsan

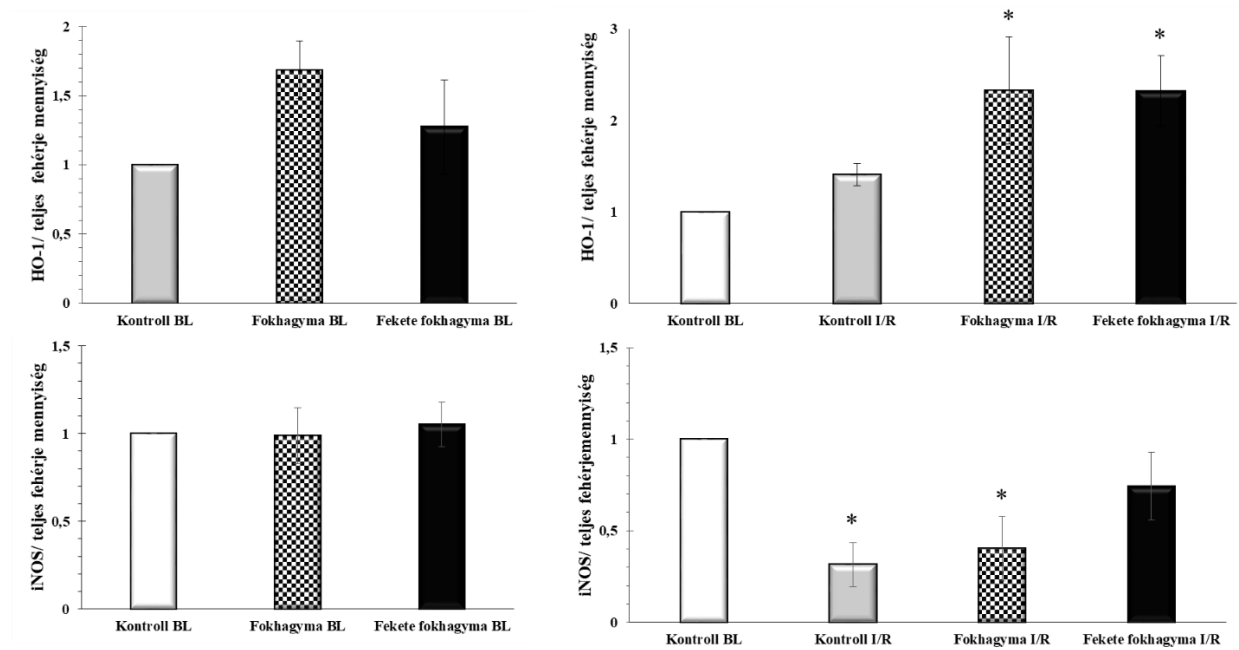
alacsonyabb volt az elhalt területek aránya. A fokhagyma kezelés $5,9 \pm 2,0\%$ -ra csökkentette, míg a fekete fokhagyma kezelés $6,2 \pm 1,2$ -re csökkentette az elhalt szívszövet arányát.



11. ábra: Fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása az infarktusos területre. Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk. $n=4$ minden csoportban

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

Kísérletünk során kíváncsiak voltunk, hogy a fokhagyma és a fekete fokhagyma iszkémia/reperfúziót követő kardioprotektív hatásának molekuláris mechanizmusára, ezért vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a kezelés a HO-1 és az iNOS fehérje szintjét. Amint az a 12. ábrán látható az I/R-t megelőzően a kezelt csoportokban növekedett a HO-1 expressziós szintje. Az I/R-t követően azonban HO-1 expressziós szintje szignifikánsan növekedett mindkét fokhagymával kezelt csoportban. Az iNOS expressziós szintjében nem tapasztaltunk különbséget az I/R-t megelőzően az egyes csoportokban. Az I/R-t követően szignifikánsan csökkent az iNOS szintje a kontroll és a fokhagymával kezelt csoportban. Azonban a fekete fokhagyma kezelés képes volt ezt a csökkenést megelőzni az I/R-t követően.



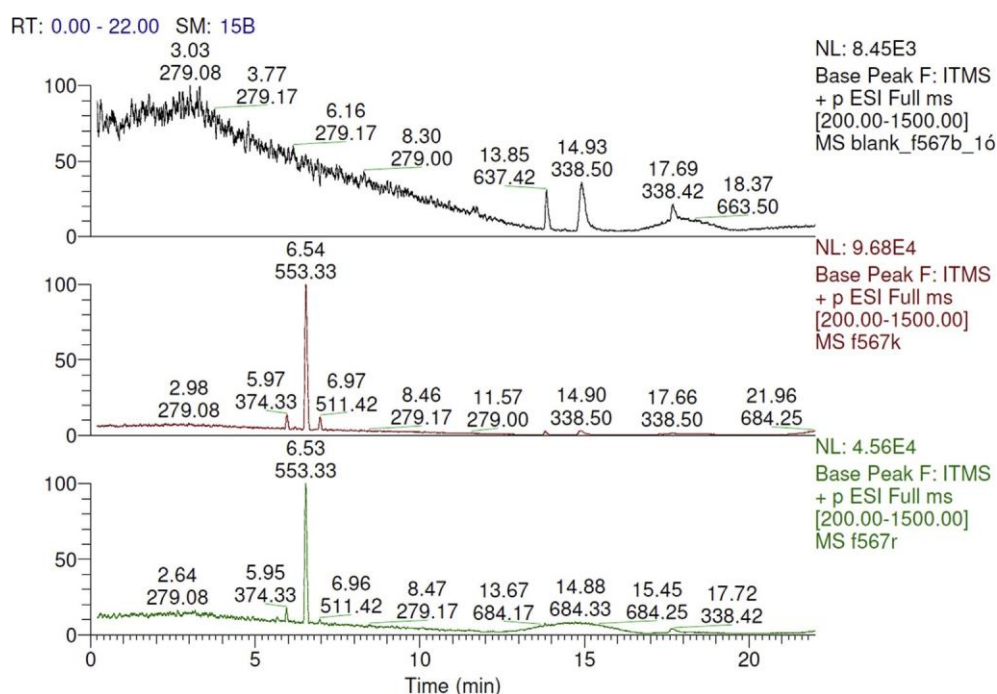
12. ábra: Fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés hatása a HO-1 és az iNOS expressziós szintjére. Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. A * $p < 0,05$ értéket jelöl a kontroll csoport értékeihez viszonyítva. N=5-7

5.2. ERJ-500 kardiovaszkuláris hatásainak vizsgálata H9c2 sejtvonalon és patkánymodellel

5.2.1. Oxidatív stabilitás

Fenton reakció

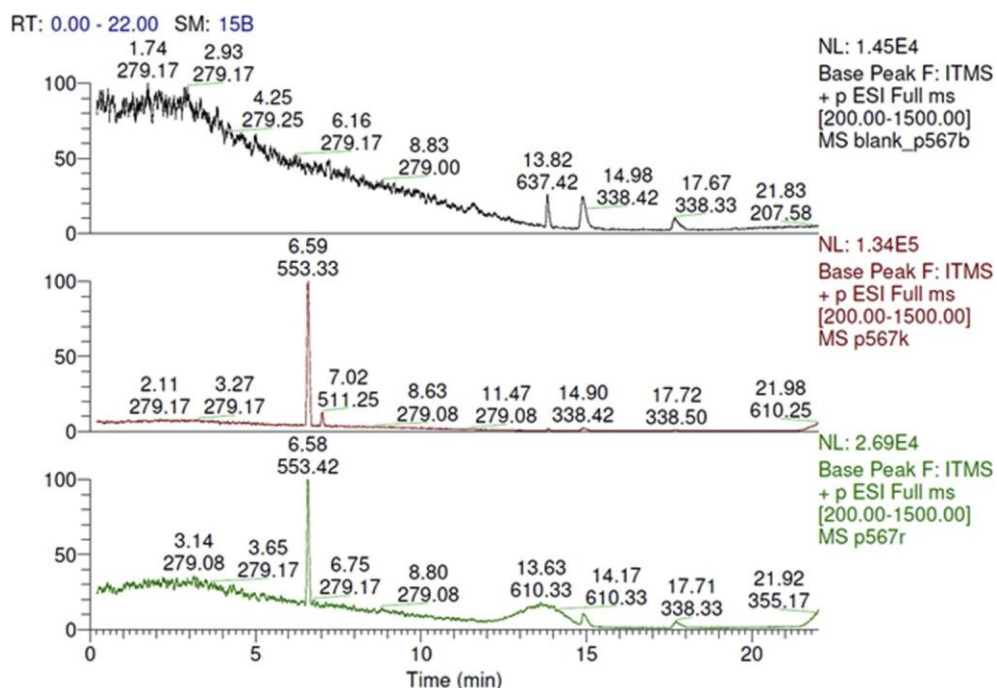
A 13. ábrán látható az ion kromatogram reprezentatív ábrái a kémiai Fenton reakciót követően. A kontroll és a H₂O₂-t tartalmazó minta kromatogramjai nem térnek el egymástól számottevően.



13. ábra: Reprezentatív ion kromatogram. Piros jelöléssel: kontroll. A 6,54-nél lévő csúcs az ERJ-500 vegyület. Zöld jelölés: oxidációt követően. 6,53-nál látható az ERJ-500, változatlanul.

Szintetikus porfirin rendszer

A 14. ábrán látható az ion kromatogram reprezentatív ábrái, amely alapján a kontroll és a vizsgált minta kromatogramjai nem térnek el egymástól számottevően. Egyéb csúcs nem jelent meg a kontroll mintához képest. Az oxidatív stabilitási vizsgálatok alapján stabilnak bizonyult az ERJ-500 vegyület.

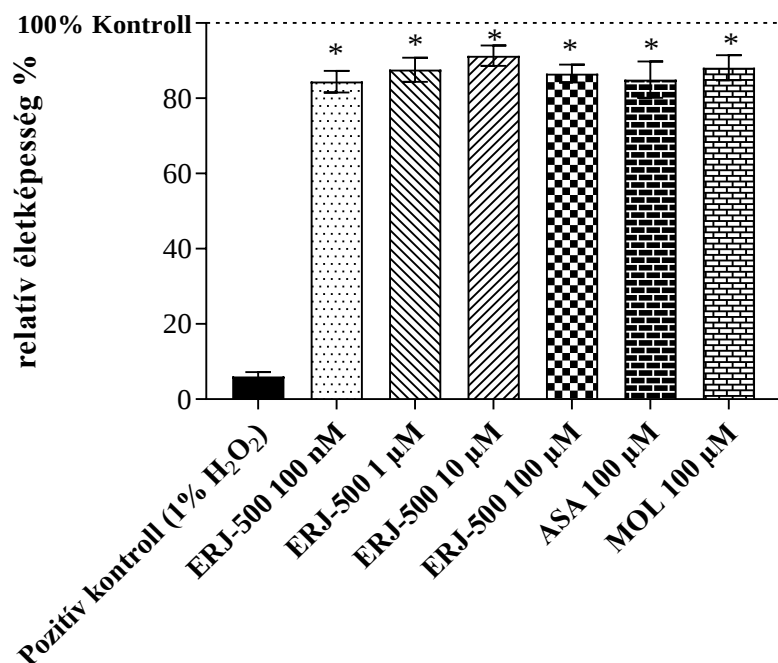


14. ábra: Reprezentatív kromatogram: Piros jelöléssel a kontroll minta látható. A 6.59-nél lévő csúcs az ERJ-500 vegyület. Zöld jelölés az oxidációt követően, változatlanul 6,58-nál látható az ERJ-500.

5.2.2. ERJ-500 molekula hatása a sejtek életképességére

MTT teszt

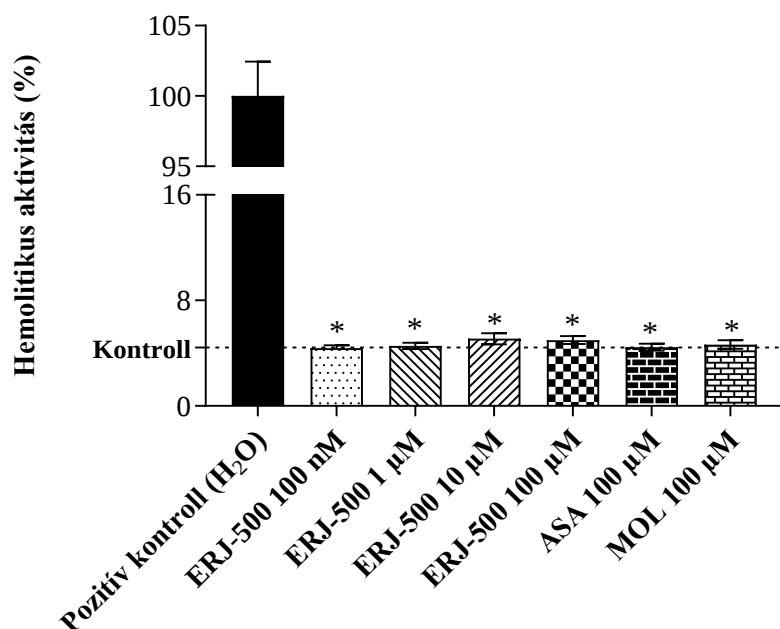
A különböző koncentrációjú ERJ- 500 kezelések, valamint a két alkotóelemének, az aszpirinnek és molszidominnak hatását a sejtek életképességére MTT módszer segítségével vizsgáltuk. Kontrollként kezeletlen csoportot, pozitív kontrollként pedig 1%-os H_2O_2 -dal kezelt csoportot alkalmaztunk. A kontroll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



15. ábra: Sejtéletképesség vizsgálat. Kontroll csoport sejtjeinek életképessége (100%). Különböző koncentrációjú (100nM- 100µM) ERJ-500, 100µM aszpirin és 100µM molszidomin kezelések hatása a sejtek életképességére. MTT módszer n=20-67. Az eredményeket a középérték ± középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. *p <0,05 a pozitív kontrollhoz hasonlítva

Hemolitikus aktivitás

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



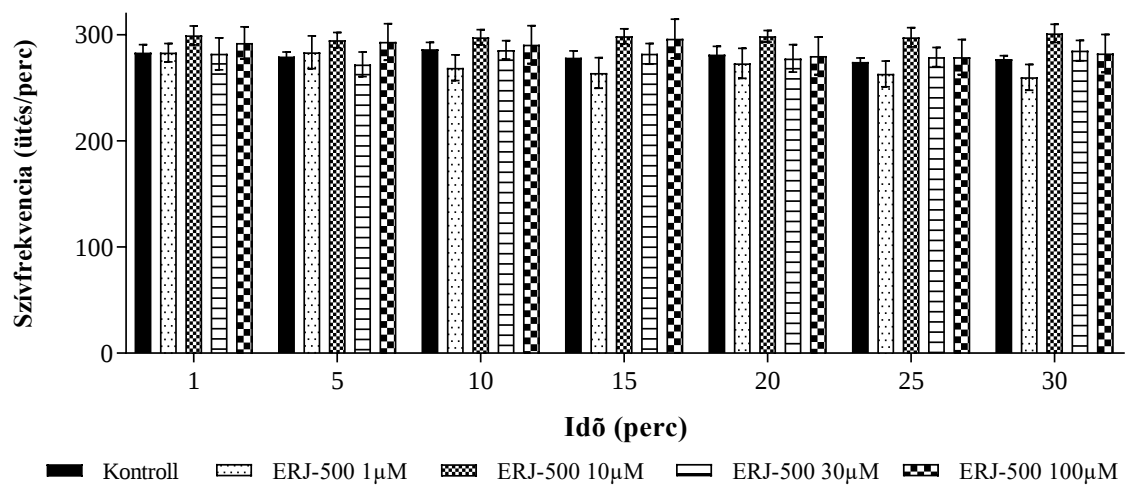
16. ábra: ERJ-500, aszpirin és a molszidomin hemolizáló tulajdonságainak vizsgálati eredménye. Kontroll, pozitív kontroll és a különböző koncentrációjú (100nM- 100µM) ERJ-500, 100µMaszpirin és 100µM molszidomin hemolizáló hatása Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. * $p < 0,05$ a pozitív kontrollhoz hasonlítva. N=8-11/csoport

5.2.3. ERJ- 500 molekula hatása a koronária erekre

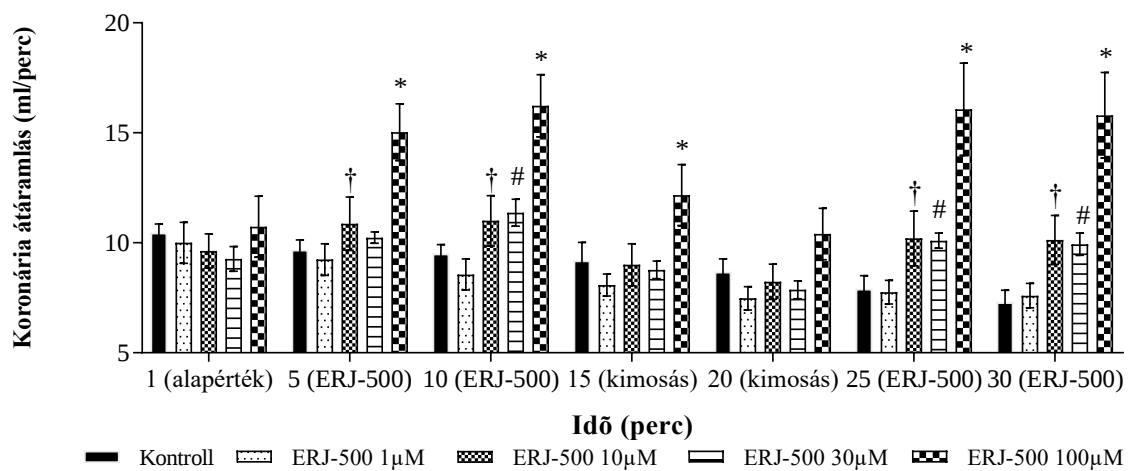
Az ERJ-500-at különböző koncentrációkban oldottuk a perfúziós tartályban 1 µM és 100 µM koncentrációs tartományban. A Langendorff perfúzió során az ERJ-500 vegyület az alkalmazott koncentrációkban nem okozott kamrai tachikardiát vagy kamrai fibrillációt. Továbbá a kontroll csoporttal összehasonlítva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

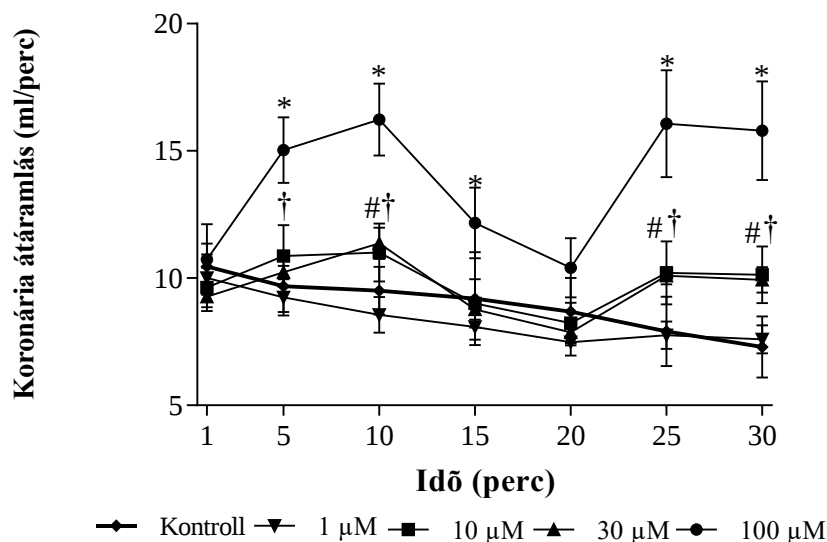
Langendorff perfúzió során a koronária átváramlást a szívfrekvencia, a perfúziós nyomás és a koronáriák átmérője határozza meg. Kísérleteink során a perfúziós nyomás állandó volt, illetve a szívfrekvencia nem változott meg szignifikánsan, ezért a koronária átváramlás növekedés a koronária erek relaxációjának köszönhető.

A



B





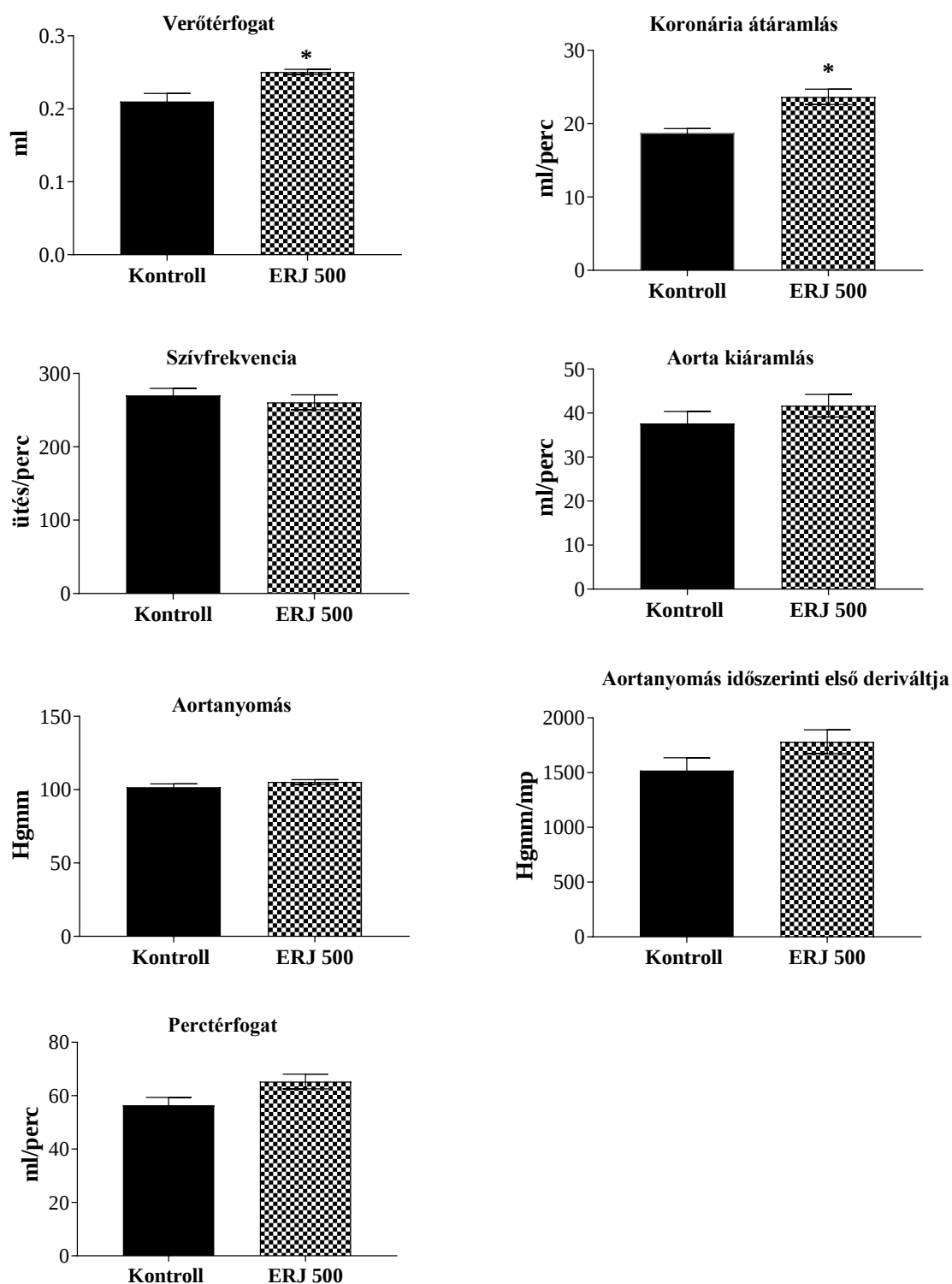
17. ábra: ERJ-500 hatása a nem dolgozó Langendorff módban.

A. 1 µM, 10 µM, 30 µM illetve 100µM koncentrációjú ERJ-500 kezelések hatása a szívfrekvenciára. Az eredményeket a középérték ± középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. *p < 0.05 Kontroll vs. 100 µM; #p < 0.05 kontroll vs. 30 µM; †p < 0.05 kontroll vs. 10 µM. n = 5 minden csoportban.

B. 1 µM, 10 µM, 30 µM illetve 100µM koncentrációjú ERJ-500 kezelések hatása a a koronária átfolyásra. A kimosható tulajdonság szemléletesebb bemutatása kedvéért kétféle ábrázolási módban ábrázoltuk. Az eredményeket a középérték ± középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. *p < 0.05 Kontroll vs. 100 µM; #p < 0.05 kontroll vs. 30 µM; †p < 0.05 kontroll vs. 10 µM. n = 5 minden csoportban.

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

aortanyomás és a perctérfogatban nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kezelés hatására a kontrollhoz képest.

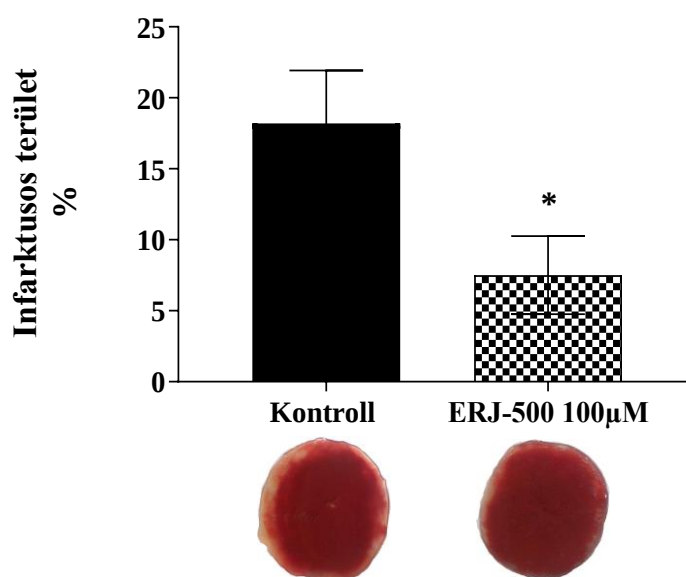


18. ábra: Szívfunkciók változása a 100 μ M-os ERJ-500 kezelés hatására dolgozó módban. Kontroll csoport elemszáma 11, ERJ-500-zal kezelt csoport elemszáma 6. Az eredményeket a

középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk.

5.2.4. Infarktusos terület meghatározása

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



19. ábra Infarktusos terület mértéke és a TTC festett szívszövet reprezentatív ábrája 30 perc iszkémia és 90 perc reperfúzió után a kontroll csoportban és az ERJ-500-zal kezelt csoportban. $n=5$ /csoport Az eredményeket a középérték $\pm$ középérték standard hibájaként (SEM) adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ vagy ettől kisebb értékeket tekintettünk.

6. MEGBESZÉLÉS

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

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

Kísérletünk első részében a fokhagyma régi-új változatának, a fekete fokhagymának a kardiovaszkuláris tulajdonságait vizsgáltuk. A fokhagyma az egyik legnagyobb tápértékű funkcionális élelmiszerünk, amely kiemelt helyet foglal el a szív- és érrendszeri betegségek preventív és akár kuratív kezelésében. A fokhagyma hatóanyagai rendkívül instabilak, feldolgozása során fontos a kíméletes körülmények biztosítása. Sokak által nehezen tolerálható a fokhagyma igen jellegzetes illata. A kellemetlen szájíz órákig, a néhány napos szedése esetén kialakuló testszag akár napokig is érezhető. Ennek a nem kívánatos problémának a megoldására fedezték fel újra és fejlesztették ki modern eljárással a fekete fokhagymát. A fekete fokhagyma a fokhagyma egy fermentált változata, amely egy természetes úton való öregedésen megy keresztül. A fermentáció során a kemény, jellegzetesen csípős fehér gerezdek teljes átalakuláson mennek keresztül. A fekete fokhagyma puha, állaga krémes, fekete, aromás, és nem rendelkezik túl agresszív ízekkel [65]. Az öregedési folyamat során, amikor a fokhagymát magasabb hőmérsékletnek (75°C) és páratartalomnak tesszük ki a γ -glutamil-cisztein csoportja tovább alakul S-allilmerkaptociszteinné (SAC), amely a fő vízzoldékony antioxidáns vegyülete a fekete fokhagymának. A folyamat során az alliin tovább alakul más kén tartalmú

vegyületekké, amelyek további jelentős antioxidáns tulajdonsággal bírnak [62, 117, 118]. A fokhagyma allicin tartalma, amelynek a jellegzetes íz és szag köszönhető, jelentősen lecsökken a fekete fokhagymában [65]. Ezzel összhangban az általunk végzett mérések során mi is azt tapasztaltuk, hogy a fokhagymában jelenlévő allicin már nem található meg a fekete fokhagymában. A fekete fokhagyma sötétbarna, fekete szín kialakulásának hátterében a Maillard reakció áll, amely a cukrok és az aminosavak között megy végbe. A Maillard reakció során keletkező 2-acetil-1-pirrolin felelős a kialakuló sötét színért és a jellegzetes édeskés illatért [63]. A GC-MS analízisünk alapján az 1. táblázatban látható az általunk alkalmazott körülmények között keletkező fekete fokhagyma összetevői. Jól látható, hogy a 2-acetil-1-pirrolin a fokhagymában nem volt jelen, de a fermentációs folyamatot követően megjelent, mindez bizonyítja, hogy a Maillard-reakció is végbement az öregedési folyamat során. A fekete fokhagyma összetételének vizsgálatát követően, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a fekete fokhagyma is megőrzi-e a fokhagyma kedvező kardiovaszkuláris tulajdonságait. Korábbi megállapításokból jól ismert a fokhagyma kardioprotektív hatása. Ezt bizonyítja Banerjee és munkatársai kutatása is, miszerint 125-500 mg/ttkg fokhagyma fogyasztás jelentősen csökkentette az I/R-t követő oxidatív károsodás mértékét [119]. Eredményeinkből is egyértelműen látszik, hogy a fokhagyma kezelés és a fekete fokhagyma kezelés is jelentős kardioprotektív hatással bír az I/R-t követően, mivel a szívfunkciók szignifikánsan javultak és az infarktusos terület jelentősen csökkent. Azonban a vizsgálataink alapján nem találtunk jelentős különbséget a fokhagyma és a fekete fokhagyma kezelés között, tehát a fokhagyma öregedési folyamata megőrizte a fokhagyma kardioprotektív tulajdonságait. Korábbi tanulmányokban a fokhagyma és a fekete fokhagyma antioxidáns és antiinflammatorikus tulajdonságait hasonlították össze. Yi Yeong Jeong és kutatócsoportja azt tapasztalták, hogy a fekete fokhagyma kezelés csökkentette a prooxidáns H_2O_2 -al vagy LPS által indukált ROS termelést RAW264.7 sejteknél. Azonban a COX-2 és az 5-lipoxigenáz gátló hatás erősebb volt a fokhagyma kivonat tartalmú kezelés hatására, mint a fekete fokhagyma kezelést követően. A kutatók vizsgálatai alapján a háttérben a fekete fokhagyma nagyobb cukor tartalma állhat, amely gátolja az antiinflammatorikus hatást [120]. Az antioxidáns tulajdonság tekintetében viszont Lee és munkatársai azt találták, hogy a fekete fokhagyma magasabb antioxidáns tulajdonsággal rendelkezik 2-es típusú diabéteszes patkány modellen, mivel a szuperoxid-diszmutáz, glutation peroxidáz és a kataláz aktivitás is jelentősebb mértékben nőtt a fekete fokhagyma kezelés hatására, mint a fokhagyma kezelést követően [118].

Az általunk végzett kísérletek során nem tapasztaltunk jelentős változást a testtömegben, illetve a vérparaméterek szintjében. Az értékek a fiziológiás tartományban maradtak. Ahhoz, hogy a kezelések lehetséges metabolikus hatását tanulmányozni tudjuk diabéteszes-, illetve ateroszklerózis tanulmányozására alkalmas állat modellen szükséges végezni a kísérletet, mint ahogy a közelmúltban publikálásra kerülő cikkben, Sara Amor és kollégái tették, akik magas zsír/ magas szukróz étrendű patkányokon végezték a méréseket [121].

Ahhoz, hogy a fokhagyma kezelések kardioprotektív hatásának pontos mechanizmusát felderítsük a HO-1 és az iNOS expressziós szintjét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy fokhagyma kezelés növelte a HO-1 szintet iszkémia előtt. Azonban az I/R-t követően a fokhagyma és a fekete fokhagyma HO-1 expressziós szintje jelentősen emelkedett. A HO-1 enzim indukciója növeli a hem degradációt, mely során Fe^{2+} , endogén CO és biliverdin/bilirubin képződik. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során már bebizonyította, hogy bizonyos természetes hatóanyagok profilaktikus adagolása szignifikánsan csökkenti az I/R-t követő károsodást. Például a meggy-magbél szintén emelte a HO-1 expressziós szintjét a szívszövetben, ezáltal javította a szívfunkciós paramétereket és csökkentette az infarktusos területet [56, 122]. A HO-1 szint emelkedés egy védekezési mechanizmusnak tekinthető, amelyet számos káros stimulus, mint például az iszkémia, vagy a túlzott hem szint kiválthat. Továbbá Qianhui Li és csoportja vizsgálatai szerint a ginzeng egyik származéka a ginenozid aktiválja az Nrf2/HO-1 jelátviteli utat, ezáltal védi a hipoxia/reoxigenáció okozta károsodásoktól a H9c2 sejteket [123]. Issan és munkatársai is igazolták, hogy a kobalt-protoporfirin (CoPPIX) által indukált HO-1 protektív szerepet tölt be a H9c2 sejteknél a hypoxia/reoxigenáció során. Továbbá azt is igazolták, hogy a streptozotocin indukálta diabéteszes patkányoknál bal koronária elülső leszálló ágának az elkötését követően a kobalt-protoporfirin (CoPPIX) (HO-1 induktor) kezelés szignifikánsan javította a szívfunkciókat. Hipotézisük szerint a CoPPIX által indukált HO-1 csökkentette a hipoxiás károsodást a kardiomiocitákban, valószínűleg az Akt/GSK-3 β jelátviteli út modulálásával. Az ön-protoporfirin (HO-1 inhibitor) alkalmazásával pedig megszüntethetők az előzőekben említett kardioprotektív hatások [124]. A HO-1 expressziójának változása után kíváncsiak voltunk arra, hogy az iNOS expressziós szintje hogyan változik meg a kétféle fokhagyma kezelés hatására. Azt tapasztaltuk, hogy a kontroll csoportban és a fokhagyma kezelés hatására jelentős mértékben lecsökkent az iNOS expressziós szintje I/R-t követően. Azonban a fekete fokhagyma kezelés hatására, az iNOS kismértékű csökkenést mutatott, amely nem volt szignifikáns, tehát

a fekete fokhagyma kezelés képes volt a jelentős mértékű iNOS csökkenést megakadályozni az I/R-t követően. Ez irányú eredményeinkkel jól korrelál A.L. García-Villalón és munkatársai által végzett kísérlet, mely szerint az 50 mg/ttkg fekete fokhagyma kezelés növelte az iNOS expressziós szintjét, valamint az eNOS szintjében is jelentős emelkedést tapasztaltak [125]. Alcione Lescano de Souza Junior és munkatársai egy másik fitoterapeutikum, a halolaj vizsgálatokor tapasztaltak hasonló változást az iNOS szintjében. Ugyanis amíg a fiziológias sóoldattal történő kezelésnél a bal kamrai iszkémiát követően csökkent iNOS mRNS expressziót mértek, addig a 20 napon keresztül tartó halolaj adagolása megelőzte az iNOS mRNS expresszió csökkenést, valamint hasonlóan alakult az eNOS változása is [126]. Továbbá, *ex vivo* kísérlet során az eNOS génhíányos egereknél az I/R sérülést követően az iNOS szuperindukciónak köszönhetően az infarktusos terület nagysága jelentősen csökkent. A kardioprotektív hatásokban valószínűsíthetően a NO szerepe áll [127]. Ezzel szemben az *in vivo* kísérletek során éppen ellenkezőleg tapasztalták, mivel az iNOS expresszió fokozása súlyosbította a miokardiális sérülést. Henri Doods tanulmányában a Na^+/K^+ pumpa gátló, sabiporid által mediált kardioprotektív hatás hátterében a csökkent iNOS expresszió állhat [128]. További *in vivo* kísérletek támasztják alá azt, hogy a megnövekedett iNOS aktivitás szerepet játszhat a regionális iszkémia során kialakuló kardiomiocita diszfunkciók kialakulásában [129]. A szakirodalomból jól ismert, hogy a „Janus-arcú” NO és a NOS enzimek szerepe kettős, lehet előnyös és ugyanakkor hátrányos is, amely függ a környezettől és a szövetkárosodás mértékétől is. Mindezen eredményeket együttesen és a szakirodalmat tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy az iNOS expresszió különbözősége a különböző kísérleti elrendezéseknek köszönhető. Tanulmányunkban „*ex vivo*” kísérlet során 30 perc iszkémiát és 120 perc reperfúziót alkalmaztunk, amíg más kísérletekben „*in vivo*” körülmények között 6-24 órás reperfúzió történt. Az általunk alkalmazott izolált dolgozó szív modell egy széles körben elterjedt, laboratóriumunkban is gyakran alkalmazott módszer, amely során az eredményeinket nem befolyásolja a hormonális és a vegetatív idegrendszer [56, 130]. Azonban az *in vivo* körülmények között ezen hatások nem zárhatóak ki.

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

nyitottabbak lehetnek az emberek. Azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a fekete fohagyma hatásait tanulmányozzuk különböző betegségekben, például célszerű lehet diabéteszes vagy ateroszklerotikus elváltozásokkal rendelkező állatmodelleken is megvizsgálni.

Munkánk második részében a Debreceni Egyetemen előállított új hibrid-aszpirin molekula farmakológiai tulajdonságait kívántuk vizsgálni. A miokardiális iszkémia bázisterápiájának fontos eleme a trombocita aggregációt gátló kezelés, kulcs szerepet játszik a recidív iszkémiás események megelőzésében is. A trombocita aggregációt gátló gyógyszerek egyik legrégebbi és legfontosabb képviselője az acetilszalicilsav. Alkalmazásának korlátja a már kis dózisban jelentkező gasztrointesztinális mellékhatások [131]. A nitrátok és nitrátok is hatékony antiiszkémiás szerek, patológiás körülmények között az erek tágításával a kollaterális keringést képesek fokozni. Már 1879-ben William Murrell képes volt az anginát megszüntetni per os nitroglicerint oldattal. Később kiderült, hogy alkalmazásának korlátja a napi többszöri és/ vagy folyamatos nitrát terápia során kialakuló nitrát tolerancia, amely a hatás csökkenésével vagy megszűnésével jár [132]. Packer és munkatársai is jelentős hatáscsökkenést tapasztaltak, amikor intravénás infúzió formájában 48 órán keresztül alkalmazták a nitroglicerint és keresztolerancia alakult ki az izoszorbid dinitráttal [133]. Az általunk vizsgált ERJ-500 vegyület egyik alkotórésze az úgynevezett spontán NO-donor vegyület, a linszidomin, amely a molszidomin aktív metabolitja. Rudolph és Dirschinger vizsgálatai alapján a molszidomin alkalmazása során nem alakul ki tolerancia [113]. Korábbi kísérleti tanulmányok alapján 0,1 μM és 100 μM -os koncentráció tartományban végeztük a vizsgálatokat. Liu és munkatársai is hasonló koncentrációban (0,1-1,0 mmol/liter) vizsgálták a szalicilátok hatását izolált dolgozó szíven [134]. Az oxidatív stabilitási esszék alapján az ERJ-500 vegyület az oxidációval szemben ellenálló volt. *In vitro* kísérleteink alapján továbbá megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM -os koncentrációkban a H9c2 sejtek életképességét kismértékben csökkentette, de szignifikánsan magasabb volt a sejtek életképessége a pozitív kontrollal összehasonlítva. A 100 μM -os aszpirinnel és 100 μM -os molszidomin kezeléssel összehasonlítva hasonlóan bizonyult a sejtek életképességére gyakorolt hatása, ezért ugyanolyan biztonságosnak mondható, mint a hasonló koncentrációban alkalmazott aszpirin és molszidomin. Eredményeink megerősítése céljából az új vegyület hemolitikus aktivitását is vizsgáltuk 100 nM-100 μM -os koncentrációtartományban. Az ERJ-500 vizsgálata során a hemolizált sejtek aránya lényegesen alacsonyabb volt, mint a pozitív kontroll alkalmazása során. A 100 μM -os aszpirin és 100 μM -os molszidomin kezelés során is hasonlóan alacsony

volt a hemolizált sejtek aránya. Eredményeink összhangban állnak James és munkatársai eredményeivel, akik magasabb koncentrációban (278 μ M-2,78mM) sem találták az ASA-t hemolizáló hatásúnak [135]. A fentiek alapján elmondható, hogy az ERJ-500 vegyület nem toxikus és nem okoz hemolízist, hasonlóan az ASA-hoz és MOL-hoz. In vitro vizsgálataink után kíváncsiak voltunk az új vegyület koronária erekre kifejtett hatásaira, amelyet *ex vivo* vizsgáltunk meg. Elsőként a Langendorff perfúziós rendszerben tanulmányoztuk az ERJ-500 kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásait. Watanabe és munkatársai is leírják, hogy a Langendorff perfúziós rendszer kiválóan alkalmas új vegyületek koronária erekre kifejtett hatásainak vizsgálatára [136]. Munkánk során fontos megfigyelés volt, hogy a koronária áramlás jelentősen megnövekedett. A Langendorff perfúzió során a koronária áramlást a szívfrekvencia, perfúziós nyomás és az érátmérő befolyásolja. A megnövekedett koronária áramlás feltehetően a koronária erek dilatációjának köszönhető, mivel kísérletünk során a perfúziós nyomás állandó volt, a szívfrekvenciában pedig nem volt jelentős változás. Habár a NO koncentrációt nem mértük, az eredményeink azt a feltevést támogatják, hogy a koronária erek dilatációja az ERJ-500 vegyületből felszabaduló NO-nak köszönhető. Annál is inkább mivel az ERJ-500 jelenlétében nőtt a koronária áramlás, viszont a „kimosást” követően ez csökkent, majd amikor az ERJ-500-at ismét hozzáadtuk újból fokozódott a koronária áramlás. Ezt támasztja alá Andrieu és munkatársai kutatása miszerint, az aszpirin kis dózisban adva nem rendelkezik a vazodilatátor hatással a miokardiumban [137]. Munkánk során a legpotensebbnek a 100 μ M-os kezelést találtuk, ezért az ERJ-500 hatásait ezen koncentrációban tovább vizsgáltuk dolgozó módban is. A koronária áramlás ezen kísérleteink során is jelentősen nagyobb volt a kezelés hatására. Továbbá, a verőtérfogatot is szignifikánsan magasabbnak találtuk az ERJ-500-al kezelt állatok esetén a kontroll csoporttal összehasonlítva. A perctérfogat és a szívfrekvencia hányadosaként meghatározott verőtérfogat értéke is szignifikáns emelkedést mutatott a kezelés hatására. Az izolált dolgozó szív készüléknél a szívre nehezedő elő és utóterhelés konstans a kísérlet során, ezért a mért paraméterek a szív kontrakciós erejétől függenek. Az ERJ-500 koronária áramlást fokozó hatását alátámasztja az a tény is, hogy az infarktusos terület is szignifikáns csökkenést mutatott az ERJ-500 kezelés hatására.

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

8. SUMMARY

In the first part of our experiments, we investigated aged black garlic obtained from raw garlic, which is used for medicinal purposes for thousands of years. Through the aging process under high temperature and humidity the texture, taste and bioactive components are changed. Male Sprague Dawley (SD) rats were fed with raw garlic, aged black garlic and with vehicle for a period of 4 weeks. Isolated hearts were undertaken to ischemia/reperfusion. No significant differences in body weight and blood parameters were observed after 4 weeks in neither of the groups. Isolated hearts were undertaken to 30 minutes of global ischemia and 120 minutes of reperfusion. After I/R superior postischemic cardiac function and decreased infarct size were found in both garlic treated groups compared to the drug-free control group. We experienced an alteration in the HO-1 expression levels, which has an important antioxidant property. Moreover, in control and raw garlic samples decreased iNOS levels were observed, meanwhile in samples originated from aged black garlic iNOS levels were not significantly reduced after ischemia/reperfusion. Based on these observations not only raw but also aged black garlic have cardioprotective effect.

Furthermore, we also investigated the properties of a nitric oxide (NO) donating acetylsalicylic acid (ASA) derivative (ERJ-500), which is a newly synthesized compound at the University of Debrecen. One of the most commonly used drug for the treatment of ischemic heart disease is the low-dose, prophylactic use of a platelet aggregation inhibitor, acetylsalicylic acid (ASA). However, gastrointestinal toxicity is the major limitation of ASA, which can be avoided by the protective NO. Based on the cell viability assay and hemolysis tests the ERJ-500 not affected negatively the viability of living cells in the concentrations ranged between 100nM and 100μM. By the ex vivo Langendorff method on hearts taken from SD rats experienced that, ERJ-500 displayed a dose-dependent, outwashable vasodilative effect in coronary arteries. Moreover, by focusing on the most potent 100 μM ERJ-500 concentration, we found that vasodilative effect also appeared on isolated working heart model elevated stroke volume. Furthermore, we found that the infarct size significantly decreased in ERJ-500 treated hearts after ischemia/reperfusion. Taken together these results, ERJ-500 may contribute to a new therapeutic tool against ischemic heart conditions and related syndromes

9. FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSOK

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

- Kísérletünk első részében megállapítottuk, hogy a fokhagyma fermentációja során képződő fekete fokhagyma összetétele megváltozik, a fokhagyma jellegzetes ízért és szagáért felelős allicin már nem található meg a feketefokhagymában, azonban 2-acetil-1-pirrolin megjelenik.
- A kezelések hatására javultak a szívfunkciós értékek és az infarktusos terület jelentősen csökkent. Az antioxidáns védelmi rendszer fontos enzime a HO-1 expressziós szintje emelkedett a fokhagyma és fekete fokhagyma kezelés hatására iszkémia/reperfúziót követően. Az I/R-t követően az iNOS expressziós szintje megtartott maradt a fekete fokhagyma kezelés során, míg a fokhagyma kezelésnél csökkent.
- Megállapítottuk, hogy a fokhagyma jótékony kardiovaszkuláris hatása megtartott maradt az érlelési folyamatok során.

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

- Az egyetemünkön szintetizált új aszpirin hibrid molekula, az ERJ-500 citotoxikus és hemolitikus hatása nem különbözik a molszidomin és az aszpirinétól.
- Az ERJ-500 vazodilatatív hatású (indirekt bizonyíték a NO szerepe).
- Az ERJ-500 kardioprotektív hatásokkal rendelkezik (fokozódó koronária áttáramlás, verőtérfogad emelkedés, infarktusos terület csökkenés).

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2021; Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Eurostat, *Causes of death statistics - people over 65*. 2021.
3. Hivatal, K.S., *Egészségügyi Helyzetkép*. 2019.
4. Gyires Klára, F.Z., Ferdinandy Péter *Farmakológia és Klinikai Farmakológia*. 2017: Medicina.
5. Tousoulis, D., et al., *Insight to the pathophysiology of stable angina pectoris*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(9): p. 1593-600.
6. Tsai, C.C., et al., *The association between psychological distress and angina pectoris: A population-based study*. *PLoS One*, 2019. **14**(11): p. e0224451.
7. Picard, F., et al., *Vasospastic angina: A literature review of current evidence*. *Arch Cardiovasc Dis*, 2019. **112**(1): p. 44-55.
8. Daga, L.C., U. Kaul, and A. Mansoor, *Approach to STEMI and NSTEMI*. *J Assoc Physicians India*, 2011. **59 Suppl**: p. 19-25.
9. Shimokawa, H. and S. Yasuda, *Myocardial ischemia: current concepts and future perspectives*. *J Cardiol*, 2008. **52**(2): p. 67-78.
10. Rosano, G.M., et al., *Cardiac metabolism in myocardial ischemia*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(25): p. 2551-62.
11. Fuller, W., et al., *Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress*. *Cardiovasc Res*, 2003. **57**(4): p. 1044-51.
12. Bugger, H. and K. Pfeil, *Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020. **1866**(7): p. 165768.
13. Hausenloy, D.J., *Conditioning the heart to prevent myocardial reperfusion injury during PPCI*. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2012. **1**(1): p. 13-32.
14. Ginks, W.R., et al., *Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion*. *J Clin Invest*, 1972. **51**(10): p. 2717-23.
15. Van de Werf, F., *The history of coronary reperfusion*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(37): p. 2510-5.
16. *Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI)*. *Lancet*, 1986. **1**(8478): p. 397-402.
17. Gonzalez-Montero, J., et al., *Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities*. *World J Cardiol*, 2018. **10**(9): p. 74-86.
18. Neri, M., et al., *Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 7018393.
19. Basso, C. and G. Thiene, *The pathophysiology of myocardial reperfusion: a pathologist's perspective*. *Heart*, 2006. **92**(11): p. 1559-62.
20. Galinanes, M. and A.G. Fowler, *Role of clinical pathologies in myocardial injury following ischaemia and reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 512-21.
21. Abdellatif, M., et al., *Autophagy in Cardiovascular Aging*. *Circ Res*, 2018. **123**(7): p. 803-824.
22. Li, R., Z. Jia, and M.A. Trush, *Defining ROS in Biology and Medicine*. *React Oxyg Species (Apex)*, 2016. **1**(1): p. 9-21.
23. Bardaweel, S.K., et al., *Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body*. *Eurasian J Med*, 2018. **50**(3): p. 193-201.
24. De Rosa, S., et al., *Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach?* *Curr Vasc Pharmacol*, 2010. **8**(2): p. 259-75.
25. van der Weg, K., F.W. Prinzen, and A.P. Gorgels, *Editor's Choice- Reperfusion cardiac arrhythmias and their relation to reperfusion-induced cell death*. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2019. **8**(2): p. 142-152.

26. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(3): p. 909-50.
27. Preston, T.J., W.J. Muller, and G. Singh, *Scavenging of extracellular H₂O₂ by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 9558-64.
28. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. *FASEB J*, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
29. Su, L.J., et al., *Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 5080843.
30. van Dam, L. and T.B. Dansen, *Cross-talk between redox signalling and protein aggregation*. *Biochem Soc Trans*, 2020. **48**(2): p. 379-397.
31. Heymes, C., et al., *Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(12): p. 2164-71.
32. McQuaid, K.E. and A.K. Keenan, *Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide?* *Exp Physiol*, 1997. **82**(2): p. 369-76.
33. Moris, D., et al., *The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox*. *Ann Transl Med*, 2017. **5**(16): p. 326.
34. D'Oria, R., et al., *The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor*. *Oxid Med Cell Longev*, 2020. **2020**: p. 5732956.
35. Hull, T.D., et al., *Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart*. *JCI Insight*, 2016. **1**(2): p. e85817.
36. Ryter, S.W., *Significance of Heme and Heme Degradation in the Pathogenesis of Acute Lung and Inflammatory Disorders*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
37. Padmanaban, G., V. Venkateswar, and P.N. Rangarajan, *Haem as a multifunctional regulator*. *Trends Biochem Sci*, 1989. **14**(12): p. 492-6.
38. Fraser, S.T., et al., *Heme Oxygenase-1: A Critical Link between Iron Metabolism, Erythropoiesis, and Development*. *Adv Hematol*, 2011. **2011**: p. 473709.
39. Ayer, A., et al., *Heme Oxygenases in Cardiovascular Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2016. **96**(4): p. 1449-508.
40. Munoz-Sanchez, J. and M.E. Chanez-Cardenas, *A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 604981.
41. Jozkowicz, A., H. Was, and J. Dulak, *Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend?* *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(12): p. 2099-117.
42. Kim, H.P., et al., *Heme oxygenase-1 comes back to endoplasmic reticulum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(1): p. 1-5.
43. Kim, H.P., et al., *Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells*. *FASEB J*, 2004. **18**(10): p. 1080-9.
44. Ndisang, J.F., *Heme oxygenase in cardiac repair and regeneration*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016. **21**: p. 251-77.
45. Minetti, M., et al., *Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **352**(2): p. 165-74.
46. Galliani, G., et al., *Biliverdin as an electron transfer catalyst for superoxide ion in aqueous medium*. *Experientia*, 1985. **41**(12): p. 1559-60.
47. Stocker, R. and E. Peterhans, *Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid*. *Free Radic Res Commun*, 1989. **6**(1): p. 57-66.
48. Jansen, T. and A. Daiber, *Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?* *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 30.
49. Kim, H.P., et al., *Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2622-9.
50. Chen, H.G., et al., *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages*. *Int J Surg*, 2013. **11**(10): p. 1060-6.

51. Yet, S.F., et al., *Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(8): p. R23-9.
52. Deshane, J., et al., *Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 605-18.
53. Yet, S.F., et al., *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice*. Circ Res, 2001. **89**(2): p. 168-73.
54. Clark, J.E., et al., *Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(2): p. H643-51.
55. Juhasz, B., et al., *Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(9): p. 1973-82.
56. Czompa, A., et al., *Cardioprotection afforded by sour cherry seed kernel: the role of heme oxygenase-1*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **64**(5): p. 412-9.
57. Bak, I., et al., *Cardioprotective mechanisms of Prunus cerasus (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1329-36.
58. El-Saber Batiha, G., et al., *Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (Allium sativum L.): A Review*. Nutrients, 2020. **12**(3).
59. Rouf, R., et al., *Antiviral potential of garlic (Allium sativum) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data*. Trends Food Sci Technol, 2020. **104**: p. 219-234.
60. Song, H., et al., *Bioactive components from garlic on brain resiliency against neuroinflammation and neurodegeneration*. Exp Ther Med, 2020. **19**(2): p. 1554-1559.
61. Petrovska, B.B. and S. Cekovska, *Extracts from the history and medical properties of garlic*. Pharmacogn Rev, 2010. **4**(7): p. 106-10.
62. Ryu, J.H. and D. Kang, *Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review*. Molecules, 2017. **22**(6).
63. Ahmed, T. and C.K. Wang, *Black Garlic and Its Bioactive Compounds on Human Health Diseases: A Review*. Molecules, 2021. **26**(16).
64. Bedrnicek, J., et al., *The Use of a Thermal Process to Produce Black Garlic: Differences in the Physicochemical and Sensory Characteristics Using Seven Varieties of Fresh Garlic*. Foods, 2021. **10**(11).
65. Kimura, S., et al., *Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application*. J Food Drug Anal, 2017. **25**(1): p. 62-70.
66. Ayaz, E. and H.C. Alpsoy, *[Garlic (Allium sativum) and traditional medicine]*. Turkiye Parazitolo Derg, 2007. **31**(2): p. 145-9.
67. Omar, S.H. and N.A. Al-Wabel, *Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer*. Saudi Pharm J, 2010. **18**(1): p. 51-8.
68. Ansary, J., et al., *Potential Health Benefit of Garlic Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(7).
69. Muller, A., et al., *Allicin Induces Thiol Stress in Bacteria through S-Allylmercapto Modification of Protein Cysteines*. J Biol Chem, 2016. **291**(22): p. 11477-90.
70. Rabinkov, A., et al., *Alliin lyase (Alliinase) from garlic (Allium sativum). Biochemical characterization and cDNA cloning*. Appl Biochem Biotechnol, 1994. **48**(3): p. 149-71.
71. Rana, S.V., et al., *Garlic in health and disease*. Nutr Res Rev, 2011. **24**(1): p. 60-71.
72. Ross, Z.M., et al., *Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(1): p. 475-80.
73. Kuda, T., A. Iwai, and T. Yano, *Effect of red pepper Capsicum annum var. conoides and garlic Allium sativum on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow*. Food Chem Toxicol, 2004. **42**(10): p. 1695-1700.
74. Cutler, R.R. and P. Wilson, *Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Br J Biomed Sci, 2004. **61**(2): p. 71-4.

75. Seckiner, I., et al., *Garlic supplemented diet attenuates gentamicin nephrotoxicity in rats*. Int Braz J Urol, 2014. **40**(4): p. 562-7.
76. Mousa, A.M., et al., *Garlic Extract Alleviates Trastuzumab-Induced Hepatotoxicity in Rats Through Its Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antihyperlipidemic Effects*. J Inflamm Res, 2021. **14**: p. 6305-6316.
77. Nasr, A.Y., *Protective effect of aged garlic extract against the oxidative stress induced by cisplatin on blood cells parameters and hepatic antioxidant enzymes in rats*. Toxicol Rep, 2014. **1**: p. 682-691.
78. Hobauer, R., et al., *Garlic extract (allium sativum) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers*. Middle East J Anaesthesiol, 2000. **15**(6): p. 649-58.
79. Gu, X., H. Wu, and P. Fu, *Allicin attenuates inflammation and suppresses HLA-B27 protein expression in ankylosing spondylitis mice*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 171573.
80. Percival, S.S., *Aged Garlic Extract Modifies Human Immunity*. J Nutr, 2016. **146**(2): p. 433S-436S.
81. Lee, E.N., et al., *Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF-alpha-induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF-kappaB activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells*. Phytother Res, 2011. **25**(1): p. 92-100.
82. You, B.R., et al., *Anti-inflammatory effect of aged black garlic on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dermatitis in mice*. Nutr Res Pract, 2019. **13**(3): p. 189-195.
83. Kaur, G., et al., *Garlic and Resveratrol Attenuate Diabetic Complications, Loss of beta-Cells, Pancreatic and Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 360.
84. Anwar, M.M. and A.R. Meki, *Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **135**(4): p. 539-47.
85. Ried, K., et al., *Effect of garlic on blood pressure: a systematic review and meta-analysis*. BMC Cardiovasc Disord, 2008. **8**: p. 13.
86. Asdaq, S.M. and M.N. Inamdar, *Potential of garlic and its active constituent, S-allyl cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captopril*. Phytomedicine, 2010. **17**(13): p. 1016-26.
87. Khatua, T.N., et al., *Novel Sulfur Metabolites of Garlic Attenuate Cardiac Hypertrophy and Remodeling through Induction of Na(+)/K(+)-ATPase Expression*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 18.
88. Zeng, T., et al., *The roles of garlic on the lipid parameters: a systematic review of the literature*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2013. **53**(3): p. 215-30.
89. Shabani, E., K. Sayemiri, and M. Mohammadpour, *The effect of garlic on lipid profile and glucose parameters in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis*. Prim Care Diabetes, 2019. **13**(1): p. 28-42.
90. Ho, X.L., et al., *Aged Garlic Supplement Protects Against Lipid Peroxidation in Hypercholesterolemic Individuals*. J Med Food, 2016. **19**(10): p. 931-937.
91. Srivastava, K.C., *Evidence for the mechanism by which garlic inhibits platelet aggregation*. Prostaglandins Leukot Med, 1986. **22**(3): p. 313-21.
92. Srivastava, K.C. and O.D. Tyagi, *Effects of a garlic-derived principle (ajoene) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1993. **49**(2): p. 587-95.
93. Apitz-Castro, R., et al., *The molecular basis of the antiplatelet action of ajoene: direct interaction with the fibrinogen receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141**(1): p. 145-50.
94. Baigent, C., et al., *ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group*. BMJ, 1998. **316**(7141): p. 1337-43.

95. Jolly, S.S., et al., *Effects of aspirin dose on ischaemic events and bleeding after percutaneous coronary intervention: insights from the PCI-CURE study*. Eur Heart J, 2009. **30**(8): p. 900-7.
96. Mekaj, Y.H., F.T. Daci, and A.Y. Mekaj, *New insights into the mechanisms of action of aspirin and its use in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism*. Ther Clin Risk Manag, 2015. **11**: p. 1449-56.
97. Bernard, N., et al., *Cyclooxygenases 1 and 2 and thromboxane synthase in kidneys of Lyon hypertensive rats*. Am J Hypertens, 2000. **13**(4 Pt 1): p. 404-9.
98. Sellers, R.S., Z.A. Radi, and N.K. Khan, *Pathophysiology of cyclooxygenases in cardiovascular homeostasis*. Vet Pathol, 2010. **47**(4): p. 601-13.
99. Ornelas, A., et al., *Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 289-303.
100. Sahler, J., et al., *Platelet storage and transfusions: new concerns associated with an old therapy*. Drug Discov Today Dis Mech, 2011. **8**(1-2): p. e9-e14.
101. Mogul, A., et al., *Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease: a review of recent literature and updated guideline recommendations*. Expert Opin Pharmacother, 2021. **22**(1): p. 83-91.
102. Meek, I.L., M.A. Vande Laar, and E.V. H, *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(7): p. 2146-2162.
103. Turnbull, C.M., A.G. Rossi, and I.L. Megson, *Therapeutic effects of nitric oxide-aspirin hybrid drugs*. Expert Opin Ther Targets, 2006. **10**(6): p. 911-22.
104. Lancaster, J.R., Jr., *Historical origins of the discovery of mammalian nitric oxide (nitrogen monoxide) production/physiology/pathophysiology*. Biochem Pharmacol, 2020. **176**: p. 113793.
105. Chen, K., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(7): p. 1185-98.
106. Figueroa, X.F., et al., *Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels*. Neuropharmacology, 2013. **75**: p. 471-8.
107. Riddell, D.R. and J.S. Owen, *Nitric oxide and platelet aggregation*. Vitam Horm, 1999. **57**: p. 25-48.
108. Emerson, M., et al., *Endogenous nitric oxide acts as a natural antithrombotic agent in vivo by inhibiting platelet aggregation in the pulmonary vasculature*. Thromb Haemost, 1999. **81**(6): p. 961-6.
109. Bohlen, H.G., *Nitric oxide and the cardiovascular system*. Compr Physiol, 2015. **5**(2): p. 808-23.
110. Masini, E., et al., *The effect of nitric oxide generators on ischemia reperfusion injury and histamine release in isolated perfused guinea-pig heart*. Agents Actions, 1991. **33**(1-2): p. 53-6.
111. Brown, J.F., et al., *Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. G418-22.
112. Lanus, A., *Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract*. Arthritis Res Ther, 2008. **10 Suppl 2**: p. S4.
113. Rudolph, W. and J. Dirschinger, *Clinical comparison of nitrates and sydnonimines*. Eur Heart J, 1991. **12 Suppl E**: p. 33-41.
114. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
115. Jurva, U., H.V. Wikstrom, and A.P. Bruins, *Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(20): p. 1934-40.
116. Johansson, T., L. Weidolf, and U. Jurva, *Mimicry of phase I drug metabolism--novel methods for metabolite characterization and synthesis*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(14): p. 2323-31.

117. Imai, J., et al., *Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents*. *Planta Med*, 1994. **60**(5): p. 417-20.
118. Lee, Y.M., et al., *Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus*. *Nutr Res Pract*, 2009. **3**(2): p. 156-61.
119. Banerjee, S.K., et al., *Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury*. *BMC Pharmacol*, 2002. **2**: p. 16.
120. Jeong, Y.Y., et al., *Comparison of Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects between Fresh and Aged Black Garlic Extracts*. *Molecules*, 2016. **21**(4): p. 430.
121. Amor, S., et al., *Beneficial Effects of an Aged Black Garlic Extract in the Metabolic and Vascular Alterations Induced by a High Fat/Sucrose Diet in Male Rats*. *Nutrients*, 2019. **11**(1).
122. Jayachandran, K.S., A.H. Vasanthi, and N. Gurusamy, *Steroidal Saponin Diosgenin from *Dioscorea bulbifera* Protects Cardiac Cells from Hypoxia-reoxygenation Injury Through Modulation of Pro-survival and Pro-death Molecules*. *Pharmacogn Mag*, 2016. **12**(Suppl 1): p. S14-20.
123. Li, Q., et al., *Ginsenoside Rg1 Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia/Reoxygenation Injury via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of JNK*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(1): p. 21-37.
124. Issan, Y., et al., *Heme oxygenase-1 induction improves cardiac function following myocardial ischemia by reducing oxidative stress*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92246.
125. A.L.García-VillalónS.AmoraL.MongeaN.FernándezM.ProdanovB.M.MuñozC.A.M.Inarejos-GarcíaC.M.Granadoa, *In vitro studies of an aged black garlic extract enriched in S-allylcysteine and polyphenols with cardioprotective effects*. *Journal of Functional Foods*, 2016. **Volume 27**: p. Pages 189-200.
126. Lescano de Souza Junior, A., et al., *Pretreatment with fish oil attenuates heart ischaemia consequences in rats*. *Exp Physiol*, 2017. **102**(11): p. 1459-1473.
127. Kanno, S., et al., *Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2000. **101**(23): p. 2742-8.
128. Doods, H. and D. Wu, *Sabiporide reduces ischemia-induced arrhythmias and myocardial infarction and attenuates ERK phosphorylation and iNOS induction in rats*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 504320.
129. Heinzl, F.R., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression and cardiomyocyte dysfunction during sustained moderate ischemia in pigs*. *Circ Res*, 2008. **103**(10): p. 1120-7.
130. Czompa, A., et al., *Effects of *Momordica charantia* (Bitter Melon) on Ischemic Diabetic Myocardium*. *Molecules*, 2017. **22**(3).
131. Schror, K., *Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis*. *Semin Thromb Hemost*, 1997. **23**(4): p. 349-56.
132. Divakaran, S. and J. Loscalzo, *The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(19): p. 2393-2410.
133. Packer, M., et al., *Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(13): p. 799-804.
134. Liu, X.K., et al., *Salicylate reduces ventricular dysfunction and arrhythmias during reperfusion in isolated rat hearts*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992. **19**(2): p. 209-15.
135. Stockman, J.A., 3rd, B. Lubin, and F.A. Oski, *Aspirin-induced hemolysis: the role of concomitant oxidant (H₂O₂) challenge*. *Pediatr Res*, 1978. **12**(9): p. 927-31.
136. Watanabe, M. and T. Okada, *Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1816**: p. 107-116.
137. Andrieu, S., et al., *Effects of antiaggregant and antiinflammatory doses of aspirin on coronary hemodynamics and myocardial reactive hyperemia in conscious dogs*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999. **33**(2): p. 264-72.

11. TÁRGYSZAVAK

Iszkémia/reperfúzió

Oxidatív stressz

Fekete fokhagyma

Izolált szív

Nitrogén-monoxid

Hibrid-aszpirin

Miokardiális iszkémia

Infarktusos terület

Ischaemia/Reperfusion

Oxidative stress

Black garlic

Isolated heart

Nitrogen monoxide

Hybrid aspirin

Myocardial Ischemia

Infarct size

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Az értekezés elkészítését a OTKA-NKFIH-K-124719, GINOP- 2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)", GINOP-2.3.4-15-2020-00008 „Komplex Egészségipari Multidiszciplináris Kompetencia Központ kialakítása a Debreceni Egyetemen új innovatív termékek és technológiák fejlesztése érdekében” című projektek támogatták. A közölt munka az Európai Unió és az Európai Szociális Alap által támogatott EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 és a EFOP-3.6.1-16-2016-00022 projekt keretében valósult meg. További támogatások: „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj” NTP-NFTÖ-16, NTP-NFTÖ-18, NTP-NFTÖ-19.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Szőke Kitti

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,882

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

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

Debrecen, 2022.02.16.

