

**Az ösztrogén hormon, a hem-oxigenáz enzimrendszer és az életmódbeli tényezők
prevenciós szerepe a kardiovaszkuláris rendszert érintő folyamatokban**

Pósa Anikó

2024

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Célkitűzések.....	8
Anyagok és módszerek.....	9
Eredmények és diszkusszió	22
A HO enzimrendszer és a nemi dimorfizmus a kardiovaszkuláris rendszerben	22
Az endogén ösztrogén hiány és a HO enzimrendszer közvetítette gyulladásos folyamatok .	22
A testmozgás kardioprotektív szerepe és a MMP2.....	23
A testmozgás hatása a HO enzimrendszerre magas triglicerid tartalmú diétán tartott ösztrogén-hiányos állatmodellben.....	25
A testmozgás hatása 2-es típusú cukorbetegség (GK) állatmodellben.....	26
A testmozgás hatása miokardiális infarktust követően ösztrogén-hiányos állatmodellben	27
A testmozgás protektív hatása a kardiovaszkuláris rendszert érintő öregedési folyamatokban	27
Az úszás hatása a férfi reproduktív rendszerre	28
Az iszkémiás prekondicionálás kardiovaszkuláris protektív hatása malac modellben	29
A paclitaxel hatásossága gyógyszerkibocsátó ballon alkalmazásakor malac modellben	30
Következtetések	31
Köszönetnyilvánítás.....	34
Irodalomjegyzék	36
A Disszertáció alapjául szolgáló publikációk	39

Bevezetés

A szív- és érrendszeri betegségek (CVDs, Cardiovascular Diseases) világszerte a vezető halálozási okot jelentik, így ezen betegségcsoport patomechanizmusainak ismerete, valamint a helyes terápia megválasztása az orvostudomány egyik fontos kihívása. A gyógyszeres kezeléseken túl, sok egyéb hatékony stratégia létezik a primer és szekunder prevencióra. Számos preklinikai és klinikai vizsgálat adatai bizonyítják, hogy a testmozgás és a megfelelően megválasztott étrend jótékony hatással bír a kardiovaszkuláris egészségre, míg a fizikai inaktivitás, a nem megfelelő diéta és az elhízás a CVDs kialakulásának, súlyosbodásának kritikus kockázati tényezőinek tekinthetők. A nemi dimorfizmust tekintve is különbségek vannak a kardiovaszkuláris rendszert érintő megbetegedések gyakoriságában. Ismeretes, hogy a pre-menopauzában lévő nőknél a koszorúér betegségek előfordulása és progressiója alacsonyabb, mint a hasonló korú férfiaknál. A CVDs kockázata a menopauza beállta után jelentősen emelkedik. Az ösztrogénekről bebizonyosodott, hogy antioxidáns hatásúak és a farmakológias dózissal kapcsolatos tromboembolikus szövődményektől eltekintve, alapvetően kedvezően befolyásolják a kardiovaszkuláris rendszert. Ezzel szemben az ösztrogén hiány összefüggésbe hozható a növekvő oxidatív stresszel, valamint a szív- és érrendszert érintő egyéb kockázati tényezők emelkedésével. A kardiovaszkuláris kockázatot ezeken felül számos egyéb tényező is befolyásolja, mint például az etnikai hovatartozás, a társadalmi-gazdasági státusz és az iskolai végzettség. Ezek a jellemzők megnehezítik a férfiak és nők között meglévő biológiai kardiovaszkuláris kockázati faktorok mértékének elemzését. Ezzel szemben állatmodellekben, ahol a nem biológiai tényezőket kizárjuk, a vizsgálatok továbbra is azt mutatják, hogy számos kockázati tényező szexuális dimorfizmust mutat, ami a nemi hormonoknak és az általuk regulált biokémiai folyamatoknak a következménye is lehet. Irodalmi adatok igazolják, hogy a nemi hormonok fontos vasoaktív kardiovaszkuláris kockázatot befolyásoló folyamatokat is szabályoznak. Az egyik meghatározó vasoaktív rendszer, számos kísérlet tárgya, a nemi hormonok által is modulált a nitrogén-monoxid kaskád. Az endotélsejtekben keletkező nitrogén-monoxid az érrendszeri simaizomsejtekbe diffundál, ahol aktiválja a guanilát-ciklázt, hogy a guanozin-trifoszfát katalitikus átalakulását ciklikus guanozin-monofoszfáttá indukálja. Ez utóbbi tovább aktiválja a protein kináz G-t, ami a simaizomsejtek relaxációjához vezet. Egy másik fontos, kevésbé vizsgált vasoaktív szabályozó, amely a kardiovaszkuláris és a gyulladásos folyamatok modulálásában is kulcsszerepet játszik, a hem-oxigenáz (HO) enzimrendszer. Két fő izoforma került mások és saját kutatásaim látóterébe; a HO-1 indukálható és a HO-2 konstitutív izoforma. A HO felelős

a hem lebontásáért, ami ekvivalens mennyiségű szén-monoxid, vas és biliverdin képződését eredményezi, amelyet azután a biliverdin-reduktáz bilirubinná alakít. A bilirubin és a biliverdin hatásos antioxidánsok. A fiziológiás antioxidáns/oxidáns homeosztázis fenntartásához hozzájáruló fő tényezők közül, a HO enzimrendszer kulcsszerepet játszik az oxidatív stressz által kiváltott folyamatok ellensúlyozásában. Disszertációm fontos célkitűzése a HO rendszer és az azzal összefüggő kardiovaszkuláris állapotok különbözőségének vizsgálata az eltérő nemekben, valamint az endogén ösztrogénhiány HO rendszert érintő hatásainak tanulmányozása. Elsőként hím, nőstény és ovariektómizált nőstény patkányokban a szív és aorta szövetek HO expresszióját/aktivitását vizsgáltam, *in vivo*, *in vitro* és *ex vivo* körülmények között. A fizikai aktivitás és a megfelelő diéta kardioprotektív jelentőségének megítélése menopauzában is számos vizsgálat tárgyát képezi. Így kutatócsoportunk a HO rendszer mellett számos más metabolikus és gyulladási paraméterek befolyásolását, valamint az oxidáns/antioxidáns homeosztázis szerepét is vizsgálta poszt-menopauzás kísérleti modellben (Varga, Veszelka et al. 2018).

További munkámban célul tűztem ki a fizikai aktivitás kardioprotektív szerepének vizsgálatát más megközelítésben. A szívizom extracelluláris mátrix fontos alkotóelem és hangsúlyos jelentőséggel bír patológiás állapotokban, a szív sérülést követő átépülése során (remodellingben). Az extracelluláris mátrix legelterjedtebb szerkezeti komponensei a kollagének, különösen az I. típusú és a III. típusú kollagén. Ezek szintézisének és lebomlásának egyensúlya elengedhetetlen a normál szívszerkezethez és -működéshez. A koronária betegségekkel gyakran együtt járó szívelégtelenséget a nem kielégítő remodelling és a következményes kollagén felhalmozódás, miocita vesztés és ily módon a szív szerkezetének patológiás átrendeződése jellemzi. A fibrilláris kollagének és más extracelluláris mátrix fehérjék lebomlását a mátrix metalloproteinázok (MMP) katalizálják. A MMP-2 az egyik legismertebb a fent említett fehérjék közül, és szinte minden sejttípusban konstitutívan jelen van. Más enzimekhez hasonlóan az MMP -at is a természetben előforduló szöveti inhibitorok (TIMP) szabályozzák, megakadályozva a túlzott extracelluláris mátrix lebomlást. A MMP-ok és a TIMP-ok funkcionális egyensúlya meghatározza a szív remodellingjét. Munkáimban a figyelmem a MMP-ok működésére és a fizikai terhelés hatásaira irányult. Célul tűztük ki továbbá a szív anginás érzékenységének vizsgálatát, valamint meghatároztuk a kísérletes szívinfarktus méretét iszkémia/reperfúziót követően.

A primer prevención túl indokolt volt miokardiálisan sérült, valamint 2-es típusú cukorbeteg állatmodelleket is tanulmányozni, hiszen a primer mellett a szekunder prevenció, illetve a rehabilitáció is fontos tudományos és orvosi kihívás. Vizsgáltuk a fizikai aktivitás

hatását a szív iszkémia/reperfúziós károsodás mértékére, valamint a kardiális HO és konstitutív nitrogén-monoxid szintáz (cNOS) aktivitásra Goto-Kakizaki (GK) 2-es típusú cukorbeteg patkányban. Az izoproterenol (ISO) egy szintetikus β -adrenoceptor agonista, amely patkányokban szívizom sérülést okoz. Az általa kiváltott akut reaktív oxigén szabadgyök (ROS, reactive oxygen species) képződés csökkenti a redukált glutation/oxidált glutation arányát (GSH/GSSG). Ezenkívül az ISO indukálta szívizom károsodások növelik a pro-inflammatorikus citokinek expresszióját, amelyek további szerkezeti és funkcionális károsodásokat okoznak a szívizomban. Kimutattuk, hogy az önkéntes testmozgás potenciális megelőző stratégia lehet a kardiometabolikus paraméterek javítására kísérletes menopauzában (Posa, Szabo et al. 2015) és pozitív hatást gyakorol a remodellingre, jelentősen csökkentve az iszkémia/reperfúziós sérüléseket (Szabo, Karacsonyi et al. 2018, Szabo, Borzsei et al. 2019), így célul tűztük ki a fizikai aktivitás az ISO által kiváltott szívkárosodás antioxidáns és gyulladáscsökkentő profiljára gyakorolt hosszabb távú hatásainak vizsgálatát fertilis és ösztrogénhiányos patkánymodellekben.

A kardiovaszkuláris prevenció lehetőségei és hatásosságai a genetikai, nemi, környezeti és életmódbeli tényezőkön kívül nagyban függenek a kortól is. A szív öregedését először molekuláris és sejtszintű változások jellemzik, amelyek azután szerkezeti, morfológiai és funkcionális rendellenességekhez vezetnek. Emellett az idősebb egyének hajlamosak krónikus gyulladásban, az úgynevezett „gyulladásos öregedésben” szenvedni, amely gyulladáscsökkentő citokinek fokozott megjelenésében és oxidatív stresszben nyilvánul meg. Bár a gyulladás kialakulása önmagában is erős kockázati tényező, a kóros szív remodelling tovább növeli a CVDs esélyét és a szív sebezhetőségét. A szív patológiás átépülésének folyamata a kardiomiociták elvesztésének kompenzációs mechanizmusa, amely hatással van az extracelluláris mátrix szerkezetére (Szabo, Karacsonyi et al. 2018). A molekuláris és genetikai markerek jellemzése ezekkel a patofiziológiai rendellenességekkel kapcsolatban kulcsfontosságú a szív öregedésének mélyebb megértéséhez. Vizsgáltuk a rekreációs testmozgás szív funkcionális tulajdonságaira gyakorolt hatását, valamint a fontos szereppel bíró Comt, Ogn, Pcp4 és Esm1 gének és fehérjék expresszióját idős patkányokban nemtől függően (Borzsei, Priksz et al. 2021).

A CVDs-en túl klinikai és kísérletes vizsgálatok alátámasztják, hogy a mozgásszegény életmód jelentős szerepet játszik a meddőség arányának gyors növekedésében, hatással van a férfiak reprodukzív állapotára, hozzájárulva a férfi hipogonadizmushoz, amelyet csökkent tesztoszteronszint, gyenge libidó, merevedési zavarok és csökkent spermium életképesség okoz. Eredményeink bizonyítják, hogy az „ülő életmód” az oxidáns/antioxidáns homeosztázis

zavarát eredményezi, ami következésképpen oxidatív károsodást okoz (Szabo, Borzsei et al. 2019, Borzsei, Szabo et al. 2021). A gyulladásos paraméterek közül a TNF- α és az IL-6 kulcsfontosságú pro-inflammatorikus citokinek, amelyek összefüggésbe hozhatók a férfi termékenységgel. Vizsgáltuk a mozgás (úszás) hatását a gyulladásos mechanizmusok és a férfi meddőség tekintetében.

Széles körben elfogadott, hogy a sport gyógyszer, és valódi “polipill” -ként szolgálhat számos betegség, köztük a CVDs megelőzésére és kezelésére. A testmozgás által szabályozott jelátviteli útvonalak egyre bővülő ismerete olyan potenciális terápiás célpontok és stratégiák vizsgálatához fog vezetni, amelyek kísérleti modellekben védőhatással bírnak a CVDs-el szemben. Jelenleg a futópados futás, a futókerekes mozgás és az úszás a leggyakrabban használt állati testmozgás modellek, amik megkönnyítik a különböző kutatócsoportok által végzett fizikai aktivitásra irányuló vizsgálatok szabványosítását, összehasonlítását és népszerűsítését világszerte.

Vizsgálataim további szakaszaiban malac modelleket használtam a kardiovaszkuláris rendszert érintő protektív molekuláris mechanizmusok megértésére. Az iszkémiás prekondicionálást, mint kísérletes invazív prevenciót alkalmaztam arra, hogy a háttérmechanizmusok egy részét tanulmányozzam. Az iszkémiás prekondicionálás egy rövid iszkémiás és reperfüziós epizód indukciója a szívizomban, amely jelentősen csökkenti a hosszan tartó iszkémia által okozott szöveti károsodást. Munkacsoportunk az iszkémiás prekondicionálás nitrogén-monoxid szintáz (NOS) közvetítette védő hatását vizsgálta. Igazoltuk, hogy az iszkémiás prekondicionálás szerepet játszik a koszorúér-átjárhatóság jobb fenntartásában a (konstitutív nitrogén-monoxid szintáz) cNOS mediálásán keresztül. Eredményeink összhangban vannak azokkal a klinikai eredményekkel is, amelyek szerint a magasabb szérum mieloperoxidáz (MPO) koncentrációjú betegeknél nagyobb a kardiovaszkuláris események, a reperfüzió utáni szív működési zavarok és a kedvezőtlen kamrai remodelling kockázata.

A kialakult koronária szűkületet kezelése gyakran intravaszkuláris koronária revaszkularizációs módszerekkel történik, amelyek során a mechanikus tágítás mellett fontos szerepet játszanak a lokálisan bejuttatott, a beavatkozás során kiváltott sérülést csökkentő gyógyszerkészítmények. Napjainkban a paclitaxellel bevont sztenteket és ballonokat gyakran alkalmaznak koronária revaszkularizációs eljárásokban azzal a céllal, hogy csökkentsék a standard eljárásoknál megfigyelhető magas posztintervenciós restenózis arányát. Egy metaanalízis azonban kérdéseket vetett fel a paclitaxel hosszú távú biztonságosságával kapcsolatban, ami arról számolt be, hogy az alternatív terápiákkal összehasonlítva a

gyógyszerrel bevont eszközök két és öt év múlva megnövelték a halálozás kockázatát a perifériás artériás beavatkozásokon átesett betegeknél. A szerzők azonban nem tudták megmagyarázni a késői halálozás lehetséges mechanizmusait. A paclitaxel ér- és szívsejtekben kifejtett molekuláris hatásmechanizmusainak tisztázása támpontokat adhat a hatóanyag biztonságosságával, hatékonyságával és a kardiovaszkuláris gyógyászatban való konkrét alkalmazásával kapcsolatban. A területen végzett korábbi kutatások azonban kimutatták a gyógyszer jótékony antioxidáns funkcióit, valamint károsító hatásait is. Egy vizsgálatban a paclitaxel potenciális kardioprotektív tulajdonságainak elemzése volt a célunk ISO indukált szívkárosodásnak kitett patkányok szívizomzatában. Feltételeztük, hogy a paclitaxel adása megvédi a szívet az oxidatív és gyulladásos folyamatok, például a TNF- α és az NF- κ B kanonikus pro-inflammatorikus jelátviteli útvonal elnyomása, valamint a védő molekulák, például a HO-1 és a SOD expressziójának serkentése révén (Matusovits, Murlasits et al. 2023). Továbbá vizsgáltuk a paclitaxel ballonból a szisztémás keringésbe történő időfüggő felszabadulásának és az érfalon belüli felhalmozódás biztonságát sertés modellben és meghatároztuk az optimális expozíciós időt.

Célkitűzések

1. A HO expresszió és aktivitás nemi alapú különbségeinek vizsgálata és a HO enzimrendszer kardioprotektív szerepének elemzése HO enzim gátló alkalmazásával patkányban.
2. Az ösztrogénhiány hatásainak vizsgálata a HO enzimrendszerre, egyes gyulladásoz jelzőmolekulákra és a szívizom iszkémiára kísérletes menopauzában, idős korban, nőstény patkányban.
3. A fizikai terhelés kardioprotektív szerepével kapcsolatos egyes tényezők elemzése patkányban: MMP-2 aktivitás, szív anginás érzékenység, nyugalmi vérnyomás, aortakontrakció, szívinfarktus mérete iszkémia/reperfúziós sérülést követően.
4. A magas zsírtartalmú diéta és a mozgásszegény és aktív életmóddal összefüggő antioxidáns és gyulladásoz állapotok vizsgálata, ezek kardiális kockázattal kapcsolatos szerepének elemzése patkányban.
5. A fizikai aktivitás hatásának vizsgálata a szív iszkémia/reperfúziós károsodás mértékére, valamint a kardiális HO és konstitutív nitrogén-monoxid szintáz (cNOS) aktivitásra Goto-Kakizaki (GK) 2-es típusú cukorbeteg GK patkányban.
6. Az ISO által kiváltott szívkárosodás antioxidáns és gyulladásoz profiljára gyakorolt hosszú távú hatásainak vizsgálata fertilis és ösztrogénhiányos patkánymodellekben.
7. A kardiális funkciók, valamint a Comt, Ogn, Pcp4 és Esm1 gének expressziójának vizsgálata a fizikai aktivitással összefüggésben idős, különböző nemű patkányokban.
8. A mérsékelt intenzitású fizikai testmozgás hatásainak vizsgálata a herék antioxidáns státuszára és gyulladásoz paramétereire, valamint a spermiumok vitalitására és a tesztoszteron koncentrációra patkányban.
9. Iszkémiás prekondicionálás hatásának vizsgálata a mikrovaszkuláris perfúzióra, NOS aktivációra sertés modellben.
10. A paclitaxel koronária ballon dilatáció effektivitása és biztonságosságának vizsgálata, a hatóanyag érfalon belüli felhalmozódása és szisztémás keringésbe történő időfüggő felszabadulásának alapján sertés modellben.

Anyagok és módszerek

1. célkitűzés kísérleti elrendezése

Állatházban tenyésztett hím és nőstény Wistar patkányokat (230-250 g) használtunk. Minden kontroll nőstény patkány a proösztrusz stádiumban volt, amelyet a 0,1%-os Giemsa oldattal festett és fénymikroszkóppal ($\times 100$) megfigyelt nukleált hámsejtek egyedi jelenléte jellemez. A HO enzimeket SnPP IX (30,0 mg/kg, s.c., pH 7,4, 24 órával és egy órával a kezelés előtt) gátolta (Posa, Kupai et al. 2013).

2. célkitűzés kísérleti elrendezése

A nőstény Wistar patkányokat négy csoportra osztottuk: 4 hónapos áloperált kontroll állatok, gyógyszeresen ovariektómizált állatok, sebészileg ovariektómizált állatok és 24 hónapos (idős) állatok. 750 $\mu\text{g/kg}$ triptorelint (Decapeptyl depot, Ferring, Németország) i.m. 4 hetente alkalmaztunk a farmakológiai ovariektómia elérése érdekében. 6 hetes pihenőidő után Giemsa festési módszerrel biztosítottuk, hogy minden állat az ivarzási fázis ugyanabban a szakaszában kerüljön terminálásra (minden kontroll patkány proösztrusz fázisban volt). Az ösztrogénszintet ELISA módszerrel (Quantikine patkány ösztrogén ELISA kit, R&D Systems Inc.) ellenőriztük (Posa, Szabo et al. 2015).

3-5. célkitűzés kísérleti elrendezése

A hím Wistar és GK patkányokat ($n = 70$, súlyuk 200-230 g; Toxi-Coop Zrt., Magyarország) véletlenszerűen osztottuk be a kontroll és a futó csoportokba. Az edző állatokat egyenként futókerékkel (Acellabor Kft., Budapest, Magyarország) felszerelt ketrecekben helyeztük el, így 6 héten keresztül napi 24 órán keresztül szabad hozzáférést kaptak a kerékhez (Posa, Szabo et al. 2015).

4. célkitűzés kísérleti elrendezése

A tízhetes nőstény Wistar patkányokat két csoportra osztottuk és altatásban áloperációnak vagy kétoldali petefészek-eltávolításnak (OVX) vetettük alá. A korábban leírt ciklus és ösztrogénszint ellenőrző vizsgálatokat elvégeztük.

A 4. hét végén mind az OVX, mind az áloperált patkányokat véletlenszerűen két alcsoportra osztottuk. Az edző patkányok alcsoportjait futókerékkel felszerelt ketrecekben helyeztük el. Napi 24 órán keresztül szabad hozzáférést tettünk lehetővé a futókerékhez 12 héten keresztül, azaz a fizikai aktivitás (futás) az állatok napi rutinjának szerves részét képezte. Mindkét csoportban az állatokat standard vagy magas triglicerid (HT, 40% zsírtartalom) tápon tartottuk, és szabad hozzáférésük volt a vízhez. A 12 hetes edzés protokoll végén az állatokat termináltuk (Szabo, Karacsonyi et al. 2018, Varga, Veszélka et al. 2018).

6. célkitűzés kísérleti elrendezése

Kutatásunkban 180-200 g tömegű nőstény Wistar patkányokat (Toxi-Coop) használtunk. 1 hetes akklimatizációs időszak után a patkányokat kontroll és farmakológiailag indukált ösztrogénhiányos állatcsoportokra osztottuk. Az ösztrogénhiányos állapot elérése érdekében a korábban leírt 750 g/kg triptorelint kaptak (Decapeptyl depot, Ferring) minden negyedik héten. A kontroll csoport patkányai fiziológiás sóoldatot kaptak intramuszkuláris injekcióban (minden negyedik héten). Két triptorelin injekciós kezelés után (56 nap) a szérum ösztradiol szintet kvantitatív ösztradiol ELISA-val (Rat E₂ ELISA Kit, SunRed Biological Technology, Shanghai, Kína) ellenőriztük.

A miokardiális infarktus indukálását ISO (Sigma Chemicals) szubkután adagolásával, egyszeri 0,1 mg/kg dózisban végeztük. 20 órával az ISO indukció után meghatároztuk a szérum laktát-dehidrogenáz (LDH) és miogloblin értékeket, és a szívkárosodást 1%-os 2,3,5-trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) festéssel igazoltuk.

Három héttel az ISO kezelés után az állatokat véletlenszerűen futó és nem futó alcsoportokra osztottuk. Száz nőstény patkányt egységesen nyolc alcsoportra osztottunk a különböző kezelések alapján. A kísérleti protokoll végén a boncolást követően a szíveket TTC-festéshez használtuk, vagy -80°C-on porított állapotban tároltuk a biokémiai mérésekig (Szabo, Borzsei et al. 2019).

7. célkitűzés kísérleti elrendezése

Ebben a vizsgálatban 20 hónapos hím és nőstény Wistar patkányokat használtunk. A vizsgálat kezdetén a nőstény és hím patkányokat két fő csoportra osztottuk: kontroll és futó állatokra. A 12 hetes kísérleti időszak végén altatásban echokardiográfiás méréseket végeztünk. Az eljárást követően az összes patkányt elaltattuk, és a szívüket eltávolítottuk. A szíveket véletlenszerűen

két alcsoportra osztottuk: -80°C -on tároltuk a biokémiai mérésekig, vagy azonnal *ex vivo* vizsgálatnak vetettük alá (Borzsei, Priksz et al. 2021).

8. célkitűzés kísérleti elrendezése

Ebben a vizsgálatban 8 hónapos hím Harlan-Wistar patkányokat használtunk. A vizsgálat kezdetén a patkányokat öt csoportra osztottuk az alábbiak szerint: (1) beavatkozás nélküli kontrollok, (2) izoproterenollal kezelt (ISO), (3) kezelés előtti úszás + ISO (PRE+ISO), (4) ISO + kezelés utáni úszás (ISO+POST) és (5) kezelés előtti úszás + ISO + kezelés utáni úszás (PRE+ISO+POST) csoportok. Ezután a patkányokat heti 5 napon át, 3 héten keresztül egyénileg edzettük egy $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ -es medencében, amely $\sim 60\text{ cm}$ mély, $32\text{-}33^{\circ}\text{C}$ -os vízzel volt tele. Minden egyes úszóedzés 25 percig tartott, és minden edzést reggelente végeztünk. A PRE+ISO csoportba tartozó állatok az ISO beadása előtt 3 hétig edzettek, míg az ISO+POST csoportba tartozó állatok az ISO injekció beadása után 3 hétig úsztak, amit egy pihenő időszak követett. A PRE+ISO+POST csoportban lévő patkányokat 3 hétig edzettük az ISO kezelés előtt, illetve után. A teljes kísérleti időszak végén spermamintákat gyűjtöttünk. A mesterséges ejakulációt elektroejakulációval, standardizált módszerrel értük el. Az ondóból $7\text{-}10\ \mu\text{l}$ -t azonnal felhasználtunk a hialuronsav kötési vizsgálathoz, a fennmaradó mennyiséget pedig -20°C – on tároltuk a további biokémiai elemzésekhez. A sperma funkcionális értékelését a kereskedelemben kapható HBA® tesztekkel (Biocoat Inc., Horsham, PA, USA) végeztük el. A vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük el (Osvath, Szucs et al. 2022).

Etikai engedélyek: XX.4802/2015, XX. /1405/2021, XX/4801/2015, 25/2013 DEMÁB, I.74-40/2017, XXXIX. /3546/2022.

Szérum LDH és mioglobín mérése

Vérmintákat vettünk a vena safenából, melyeket 2000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltunk 20 percig 4°C -on. A felülúszót kereskedelmi forgalomban lévő kitekkel (GenAsia Biotech, Shanghai, Kína) 450 nm -en (Benchmark Microplate olvasó, Bio-Rad, Hercules, CA) vizsgáltuk. Az LDH értékeket U/literben, a mioglobín értékeket pedig nanogramm/literben fejeztük ki (Szabo, Borzsei et al. 2019).

A glutamát-oxálacetát aminotranszferáz (GOT), glutamát-piruvát aminotranszferáz (GPT) és alkalikus foszfatáz (ALP) mérése

Az enzimek szérumszintjét Biolis 24i Premium rendszerrel (Siemens) mértük. A GOT és a GPT reakcióit a NADH NAD-dá történő oxidációja következtében 340 nm-en mért abszorbancia csökkenés mértékének mérésével követtük. Az ALP mérési módszere 4-nitro-fenil-foszfátot használtunk szubsztrátként, és az ALP aktivitást 405 nm-en mértük. A GOT, GPT és ALP értékek U/literben vannak kifejezve (Szabo, Borzsei et al. 2019).

HO aktivitás mérése

A szöveteket 4 °C-on homogenizáltuk. A homogenizáló puffer 10,0 mM HEPES-t, 32,0 mM szacharózt, 1,0 mM ditiotreitolt 1,4-bisz-(szulfanil) -bután-2,3-diolt (DTT), 0,10 mM etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), 10,0 µg/ml tripszin inhibitort, 10,0 µg/ml leupeptint és 2,0 µg/ml aprotonint tartalmazott, pH 7,4. 15 000 g-vel 20 percig 4 °C-on végzett centrifugálás után a felülúszó folyadékot összegyűjtöttük. A reakcióelegy a következő vegyületeket tartalmazta 1,50 ml össztérfogatban: 2,0 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, 15,0 µM hemin, 120,0 µg/ml patkánymáj citoszol, 2,0 mM magnézium-klorid-hexahidrát (MgCl₂·6H₂O), 100,0 mM kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄) és 150,0 µl felülúszó. A reakciót 100,0 µl redukált béta-nikotinamid adenin-dinukleotid-foszfát (β-NADPH) hozzáadásával és sötétben, 37 °C-on 60 percig tartó inkubálással indítottuk. A reakciót jeges hűtéssel állítottuk le. A bilirubintartalmat a következőképpen határoztuk meg: 465 és 530 nm-en mértük az optikai denzitást és kiszámítottuk a két denzitás közötti különbséget. A HO aktivitást az óránként termelt bilirubin mennyiségeként határoztuk meg (nmol-ban) milligramm fehérjére vonatkoztatva (Szabo, Borzsei et al. 2019).

HO-1 tartalom mérése

A szívszöveteket RIPA pufferben homogenizáltuk, majd 10 percig szonikáltuk. A homogenizátumokat 12 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 4 °C-on 10 percig, majd 5 percig forraltuk. Egyenlő mennyiségű fehérjét (80 µg) választottunk el (90 V/2 gél) 10%-os poliakrilamid gélen, és vittük át (35 V/2 gél 2,5 órán át) nitrocellulóz membránokra. 0,10% Ponceau vörös jelenlétében meg tudtuk határozni a fehérjeterhelés egyenértékűségét. A végső HO-1 jelérzékenység növelése érdekében a membránokat Pierce Western Blot Signal

Enhancer-rel (ThermoFisher Scientific) inkubáltuk, majd egy éjszakán át blokkoltuk 5%-os zsírmentes száraz tejben Tris-pufferelt sóoldatban- Tween 20-ban. Anti-HO-1-et (ab82219, Abcam) és az anti- β -aktin antitesteket (ab20272, Abcam) használtunk. A fehérjéket úgy mutattuk ki, hogy a membránokat 4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk anti-HO-1 nyúl poliklonális primer antitesttel (1:500, ab82219, Abcam). Mosás után a membránokat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk szarvasmarha anti-nyúl IgG-torma peroxidázzal (1:5000, sc-2370, Santa-Cruz Biotechnology). A HO-1 immunoblottunknál a β -aktin szolgált kontrollként. Az aktin kimutatásához a membránokat egy éjszakán át blokkoltuk 5%-os BSA-ban. Mosás után a membránokat egér anti- β -aktin antitesttel (1:4 000, 2 óra, ab20272, Abcam), majd poliklonális nyúl anti-egér torma-peroxidázzal (1:2 000, 1 óra, Dako) inkubáltuk. A kényelmes fehérje meghatározáshoz MagicMark XP Western protein standardot (In-vitrogen, ThermoFisher Scientific) használtunk. A sávokat az Uvi Chemi Pro vizualizálta, és a Quantity One szoftverrel (Bio-Rad) elemeztük (Szabo, Borzsei et al. 2019).

Redukált glutation (GSH) + oxidált (GSSG) tartalom mérése

A szöveteket 0,25 M szacharóz, 1 mM DTT és 20 mM Tris oldatában homogenizáltuk, majd 15 000 g-vel centrifugáltuk 30 percig 4 °C-on. A felülúszó frakciókat összegyűjtöttük, és 0,1 M CaCl₂-ot, 0,25 M szacharózt, 20 mM Tris-t és 1 mM DTT-t pipettáztunk a mintákba. 30 perces 0 °C-on végzett inkubálás után a mintákat tovább centrifugáltuk 21 450 g-vel 60 percig 4 °C-on. Hígító pufferként 125 mM nátrium-foszfát és 6,0 mM EDTA keverékét használtuk a GSH, GSH-reduktáz, 5,5'-ditio-bisz-2-nitrobenzoesav (DTNB) és β -NADPH törzsoldatához. Minden mintából összesen 40 μ l térfogatot, valamint azonos térfogatú DTNB törzsoldatot (20 μ l) és β -NADPH-t (140 μ l) adtunk, majd 25 °C-on inkubáltuk. A reakció elindításához 10 μ l térfogatú GSH-reduktázt használtunk, és az abszorbanciát 405 nm-en mértük a reakció kezdetétől számított 10 perc elteltével. A teljes GSH spektrofotometriás vizsgálatában a GSH-t egymás után DTNB oxidálta, majd NADPH redukálta GSH reduktáz jelenlétében. A teljes GSH értékeket nmol/mg fehérje egységben fejeztük ki (Szabo, Borzsei et al. 2019).

GSH és tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α) meghatározása

A mintákat foszfát pufferben homogenizáltuk (Ultra-Turrax T8, 2 30 s) (pH 7,4), majd 2000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on. A GSH-t és a TNF- α -t a GenAsiától vásárolt kereskedelmi kitékkel vizsgáltuk és az optikai denzitást 450 nm-en mértük (Benchmark

Microplate olvasó, Bio-Rad). A GSH-szinteket mg/literben, a TNF- α értékeket pedig pg/mg fehérje egységben adtuk meg (Szabo, Borzsei et al. 2019).

A mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérése

A mintákat jéghideg foszfátpufferből és 0,5% hexadecil-trimetil-ammónium-bromidból (pH 6,0) álló oldatban homogenizáltuk. Háromszori fagyasztás és olvasztás után 15 000 g-vel centrifugáltuk 15 percig 4 °C -on. A felülúszót eltávolítottuk és egy 12 μ l alikvot részt pipettáztunk 280 μ l PBS (pH 6,0) és 0,167 mg/ml O-dianizidin-dihidroklorid keverékébe. A reakciót 10 μ l 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk, majd a MPO aktivitását spektrofotometriásan mértük 490 nm-en. (Szabo, Borzsei et al. 2019).

Fehérje meghatározás

A kereskedelemben kapható protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) segítségével a hígított minták alikvotjait (20 μ l) összekevertük 980 μ l desztillált vízzel és minden mintához 200 μ l Bradford reagenst adtunk. Keverés és 10 perces inkubálás után a mintákat spektrofotometriásan vizsgáltuk 595 nm-en. A fehérjeszinteket mg fehérje/ml-ben fejezzük ki (Szabo, Borzsei et al. 2019).

MMP-2 aktivitás mérése

Az MMP-2 aktivitást szívminákból mértük zselatin zimográfia segítségével. 50 mikrogramm fehérjemintát elektroforetizáltunk zselatinnal kopolimerizált 8%-os poliakrilamid gélen (20 mg/ml; A típusú sertésbőről; Sigma). Elektroforézis után a géleket 2,5%-os Triton X-100-zal mostuk, és 20 órán át 37 °C -on inkubáltuk inkubációs pufferben. A festést 0,05%-os Coomassie Brilliant Blue-val, majd vizes 4%-os metanollal és 8%-os ecetsavval végeztük. Fehérje markert (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) használtunk a két enzim izoforma (MMP-2, 72 kDa és 64 kDa) azonosítására. A zimogramokat digitálisan szkenneltük és a sávok intenzitását Quantity One szoftverrel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) számszerűsítettük (Szabo, Karacsonyi et al. 2018).

Iszkémia/reperfúziós protokoll

A szívszöveteket gyorsan kimetsztük, és jéghideg Krebs-Henseleit pufferoldatba helyezük, majd Langendorff perfúziós rendszerre szereltük fel. Retrográd perfúziót alkalmaztunk a szívekben az aortán keresztül, 75 Hgmm nyomáson 5% CO₂-ot és 95% O₂-t tartalmazó Krebs-Henseleit pufferrel 37 °C -on. A perfúziót követően iszkémiát váltottunk ki a LAD 30-45 perces elzárásával, majd ezt 120 perces reperfúzió követte. Minden kísérlet végén a LAD-t újra elzártuk, a perfúziót leállítottuk és a szíveket 1%-os Evans-kék oldattal megfestettük. A szív mintákat egy éjszakán át –20 °C -on lefagyasztottuk. A fagyasztott szívszövet-mintákat 2 mm vastag keresztmetszetű szeletekre vágtuk. A TTC festést követően a szövetszeleteket formalin (10%-os) oldatba vittük át 10 percre, majd foszfátpufferbe (pH 7,4) helyeztük. Ezt az inkubálást követően minden szelet mindkét oldalát lefényképeztük digitális fényképezőgéppel (Kupai, Szabo et al. 2015, Szabo, Karacsonyi et al. 2018).

Az aorta és a szív HO-1, plazma IL-6 és TNF- α koncentrációjának mérése

A HO-1 szöveti szintjét, valamint a plazma TNF- α és IL-6 koncentrációit ELISA kittel mutattuk ki a gyártó utasításai szerint (SunRedBio patkány HO-1, SunRedBio patkány IL-6 és SunRedBio patkány TNF- α ELISA kitek). A koncentrációkat ng/mg fehérje (HO-1), pg/ml fehérje (IL-6) és ng/ml fehérje (TNF- α) formájában fejeztük ki. Az optikai denzitást 450 nm-en mértük (Benchmark Microplate olvasó; Bio-Rad) (Varga, Veszélka et al. 2018).

A szív Comt, Esm1, Ogn, Pcp4 koncentrációjának meghatározása

A szöveteket foszfátpufferben (pH 7,4) 20 másodpercig homogenizáltuk, és 20 percig centrifugáltuk 3000 fordulat/perc sebességgel, 4 °C-on. A centrifugált felülúszót összegyűjtöttük és enzimhez kötött immunsorbens vizsgálathoz (ELISA; GenAsia, Shanghai) használtuk. A mérés során követtük a gyártó utasításait. A fehérjemeghatározást Bradford módszerrel végeztük, és spektrofotometriásan mértük 595 nm-en. A Comt, Ogn és Pcp4 szinteket pg/ μ g fehérjeként fejeztük ki; Az Esm1 értékeket pg/mg fehérjeként határoztuk meg (Borzsei, Priksz et al. 2021).

Tesztoszteronszint mérése

A kísérleti időszakok végén vérmintákat $1000\times$ g-vel, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig centrifugáltuk. Ezután a teljes tesztoszteronszintet az Immulite 2000XPi (Siemens, München, Németország) kemilumineszcens immunoassay-vel mértük, és ng/dl-ben fejeztük ki (Osvath, Szucs et al. 2022).

Az adrenalin és fentolamin által kiváltott angina modell

A felszíni EKG standard végtagi II. elvezetését a HAEMOSYS rendszer (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) rögzítette. Az ST szegmens változását mértük és az angina súlyosságának indexeként használtuk. Az epinefrin plusz fentolamin modellben egyetlen adag epinefrint ($10,0\text{ }\mu\text{g/kg}$) és 30 mp-el később az α -adrenoreceptor antagonistá fentolamint ($15,0\text{ mg/kg}$) adtuk be a patkány farokvénájába. Az EKG-t egyidejűleg rögzítettük. A HO enzimaktivitás gátlás ST szegmens változásaira gyakorolt hatásának vizsgálatára SnPP IX-et ($30,0\text{ }\mu\text{mol/kg}$, s.c., pH 7,4) adtunk be 24 órával és 1 órával a kezelés előtt (Posa, Szabo et al. 2015).

A bazális vérnyomás mérése és az AVP-re adott vérnyomásválasz

Az állatokat 30%-os uretánnal ($0,50\text{ ml}/100\text{ g}$, i.p.) altattuk, majd fentolaminnal ($10,0\text{ mg/kg}$, i.p.) kezeltük. A vérnyomás stabilizálódását követően a farokvénába arginin-vazopresszin (AVP; $0,02$; $0,06$; $0,12\text{ }\mu\text{g/kg}$, i.v.) egyszeri bolus injekciót adtunk be. A vérnyomás emelkedését (a bázisértékhez viszonyított maximális emelkedés százalékában kifejezve) a jobb arteria carotisban mértük a HAEMOSYS számítógépes komplex hemodinamikai elemző rendszerhez (Experimetria UK, London) csatlakoztatott vérnyomásmérőn keresztül. A patkányok maghőmérsékletét $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk egy homeotermikus vezérlőegységgel (Harvard Instrument, Egyesült Királyság) (Posa, Kupai et al. 2013).

Túlélő aorta kontrakciójának mérése

A patkányokat cervikális diszlokációval termináltuk, majd a hasi aortákat eltávolítottuk és Krebs-Henseleit bikarbonátos oldatba helyeztük. A gyűrűket két 25 mm -es rozsdamentes acélhuzalra szereltük; az alsót egy álló rozsdamentes acélrúdhoz, a felsőt pedig egy erő-

elmozdulás jelátalakítóhoz erősítettük az izometrikus feszültség méréséhez. A transzducer egy ISOSYS számítógépes programrendszerhez (Experimetria, UK, London) volt csatlakoztatva az érkontrakció folyamatos rögzítéséhez.

Az aortagyűrűket 37°C-on tartott szervfürdőkbe függesztettük, amelyeket folyamatosan 95% O₂ és 5% CO₂ gázzal buborékoltattunk. Az inkubációs oldathoz az AVP azonos dózisát (2 µg/ml) adtuk. A vazopresszinre adott kontraktilis választ az aorta gyűrű feszülésében (g/mg gyűrűtömeg) fejeztük ki (Posa, Kupai et al. 2013).

9-10. célkitűzés kísérleti elrendezése és vizsgálati módszerei

Sertés modellek

Éjszakai éheztetés után a házi sertések (18-30 kg súlyú) intramuszkuláris injekcióban részesültek (12 mg/kg ketamin-hidroklorid, 1 mg/kg xilazin és 0,04 mg/kg atropin). Az érzéstelenítést izofluránnal és O₂-vel egészítettük ki, majd intratracheális intubációt végeztünk. A vérnyomást és az EKG folyamatosan ellenőrizve volt. 200 NE/kg heparin-nátrium beadása után a bal és a jobb koszorúér szelektív angiográfiáját végeztük, és katétert vezetünk be a bal elülső leszálló (LAD) és bal cirkumflex (LCx) koszorúerek disztális részébe. A ballonkatétereket a LAD-ba és az LCx-be helyeztük, majd ballontágítást végeztünk. A koszorúér angiográfia megerősítette a ballon teljes érfallal való érintkezését minden ballon felfújásakor. A felfúvási időt a protokollnak megfelelően választottuk meg, pl. a vizsgálat biztonságossági vagy hatékonysági szakaszában. A kísérleteket a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében végeztük. Az állatkísérletek megfelelnek az AHA által 1984. november 11-én elfogadott „Az Amerikai Szív Szövetség álláspontja a Kutatási Állatok Felhasználásáról” előírásainak, és a vonatkozó magyar jogszabályokat követték (Posa, Nyolczas et al. 2010).

Az iszkémiás prekondícion sertésmodellnél az állatok előkészítése a fentiek szerint valósult meg. Az okklúzió kiváltásához Maverick ballonkatétert (átmérő: 3,0 mm, hossz: 15 mm; Boston Scientific, Natick, MA, USA) helyeztünk be a LAD-ba. Ezután a LAD-ot elzártuk a ballon lassú, 4–6 atm nyomáson 90 percig tartó felfújásával. Az elzárás után a ballont leeresztettük, és a reperfúziót 60 percig tartottuk.

Ezenkívül a 28 sertésből 14-et a 90 perces elzáródás előtt iszkémiás prekondicionálásnak vetettük alá. A koszorúér-ballont a LAD-ba helyeztük, és 4–6 atm nyomással 5 percig fújtuk fel. A reperfúziót a ballon leeresztése indította el. 5 perces reperfúzió után megismételtük az 5

perces elzárást, majd az 5 perces reperfüziót. A telített kálium-klorid adagolásával végrehajtott eutanáziát követően a szívet kimetszettük, az infarktusz és nem infarktusz területről szövetmintákat vettünk, és folyékony nitrogénben frissen lefagyasztottuk a szöveti NOS aktivitás és expresszió meghatározása céljából. A kísérleteket a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében végeztük. „A laboratóriumi állatok gondozásának alapelvei” (NIH 86–23. sz., átdolgozott 1985. évi kiadvány) és a vonatkozó speciális magyar jogszabályokat követve (Posa, Pavo et al. 2010).

Lokális gyógyszer szállító eszköz

A 2. generációs ballon egy emberi használatra szánt koszorúér-tágító ballon $3,0 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ballonfelületi paclitaxel bevonattal. A ballon felfújása utáni szöveti paclitaxel koncentráció méréséhez a ballont a LAD-ba és az LCx-be helyeztük. A szöveti paclitaxel-koncentráció növekedésének a ballon felfújódási idejének függvényében történő értékeléséhez a DIOR ballonok 15 másodpercig voltak fújva 10 koszorúér szegmensben, 20 másodpercig hat koszorúér szegmensben, 30 másodpercig hat koszorúér szegmensben, 45 másodpercig hét koszorúér szegmensben, hat koszorúér szegmensben pedig és 2×30 másodpercig, 6-14 atm nyomáson (1,3:1 ballon/artéria arány). Vérmintát vettünk 5, 10 és 30 perccel a ballon felfújása után. Az eutanáziát telített kálium-kloriddal végeztük 45 perccel vagy 12 órával a ballon felfújása után. A ballonokat ezután tároltuk a maradék felszíni paclitaxel mennyiségének mérésére. A LAD és LCx dilatált koszorúér szegmenseket további proximális és disztális referencia szegmensekkel (max. 10 mm proximálisan vagy disztálisan a kitágult szegmenstől) kimetszettük, és frissen lefagyasztottuk a szöveti paclitaxel koncentráció meghatározásához. Az artéria alatt 1, 2 és 3 mm-rel szövetmintákat (kötőszövet, zsír és szívizom) vettünk a paclitaxel szövetbe történő függőleges behatolási mélységének meghatározásához (Posa, Nyolczas et al. 2010).

A szövetek, ballonfelületek és a plazma paclitaxel koncentrációjának mérése

A paclitaxel koncentrációját az artériák falában, az alatta lévő szövetben 1, 2 és 3 mm mély rétegekben, a ballon felületén és a plazmában nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) mértük (AnaKat Institut für Biotechnologie GmbH, Berlin, Németország). Felolvasztás után a szöveteket szobahőmérsékleten lemértük, és a tömegtől függően különböző térfogatú etanolt adtunk a mintákhoz. A mintákat ezután 40 percig ultrahanggal kezeltük, majd

a 200 µL-es alikvotokat centrifugáltuk. Egy kalibrációs vonalat állítottunk elő 50 és 5000 ng/mL közötti tartományban. A kalibrációs sor mintáit 1000 µg/mL koncentrációjú törzsoldat hígításával készítettük. Az összes minta alikvot részeit (a szövetből és a kalibrációs vonalból vett mintákat) automatikus mintavevő fiolákba helyeztük, és azonos térfogatú 0,1%-os hangyasavat adtunk hozzá. A HPLC rendszer áramlási sebessége 0,2 mL/perc volt egy ODS Hypersil (ThermoElectron Corporation) oszlopon keresztül, részecskeméret 5 µm, pórusméret 120 Å. Az izokratikus mozgófázis 70% metanolt és 30% 0,1%-os hangyasavat tartalmazott. A paclitaxelt tömegspektrometriával detektáltuk. A szöveti paclitaxel koncentrációt µM/L-ben fejeztük ki, ami független a minta tömegétől. A plazma paclitaxel mennyiségét ng/mL-ben adtuk meg (Posa, Nyolczas et al. 2010).

Hatékonysági tanulmány

Mindegyik sertést mind a hagyományos, mind a DIOR ballonokkal kezeltük randomizált módon (DIOR LAD vagy LCx esetén). A ballonokat (2,75-3 mm átmérőjű, 15 mm hosszúságú) 10-18 atm nyomáson 30 másodpercig fűjtük fel, hogy elérjük az 1,3:1 ballon: artéria arányt. A kontroll angiográfiát kéthetes nyomon követésnél végeztük. A kórszöveti és hisztomorfometriai analízisekhez a koszorúereket 100 mL sóoldattal öblítettük, majd fixáltuk 2%-os pufferolt formaldehidben. Ezt az előkészítést követően az artériás metszeteket paraffinba ágyasztuk, 4-6 µm vastag szeletekre vágtuk és rutinszerűen hematoxin-eozinnal és Verhoeff-van Gieson-elasztinnal megfestettük (Posa, Nyolczas et al. 2010).

Az artériák hisztopatológiája és hisztomorfometriája

A következő kórszöveti paramétereket mértük: sérülési pontszám, fibrin és gyulladás pontszámok, valamint endotelizáció. A sérülés súlyosságától függően számértéket rendeltünk hozzá (Posa, Nyolczas et al. 2010).

Az infarktus méretének mérése

Miután a szívből mintát vettünk a NOS méréshez, a szívet 1 cm vastag szeletekre vágtuk, és 1%-os TTC oldatba helyeztük, hogy megfessük az infarktusos területet. Az infarktus méretét számítógépes planimetriával (ImageJ Version 1.3) mértük (Posa, Pavo et al. 2010).

Laboratóriumi mérések

Vénás vérmintát vettünk a mioglobin szint meghatározása céljából az OPUS Immunoassay System (Behrings Diagnostic Inc., Bécs, Ausztria) (normál tartomány 12–76 ng/ml) használatával. Ezen túlmenően a vérgáz- és rutinparamétereket (vese- és májfunkciók és vérzéscsillapítási paraméterek) ellenőriztük az érzéstelenítés beindítása után és a kísérlet teljes időtartama alatt. A vérlemezkék számát és a thrombocita aktiváció paramétereit (átlagos thrombocita térfogat [MPV], thrombocita nagy sejt arány [P_LCR] és thrombocita megoszlási szélesség [PDW]) minden vérvétel alkalmával Sysnex laboratóriumi elemző rendszer használatával (Sysnex Co Ltd, Daejeon, Korea), és abszolút sejtszám/l, fl, % és fl értékben fejeztük ki. A plazma MPO aktivitás mérésére a szérumot 280 µl foszfát pufferrel (50 mM, pH 6) kevertük, amely 0,167 mg/ml O-adenozin-dihidrokloridot tartalmazott, és a reakciót 10 µl 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk, és spektrofotometriásan vizsgáltuk 490 nm-en. (Benchmark Microplate olvasó, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 90 másodperces rázás után. Az MPO-tartalmat U/l-ben fejeztük ki (Posa, Pavo et al. 2010).

NOS aktivitás mérése

A szöveteket homogenizáltuk (szövet 250 mg/ml, HEPES 10 mM, szacharóz 32 mM, ditiotritol 1 mM, EDTA 0.1 mM, tripszin inhibitor 10 mg/ml, leupeptin 10 µg/ml és aprotonin 2 µg/ml), majd centrifugáltuk 20 percig 10 000 g-vel 4 °C-on. A felülúszó 40 µg/ml-es mintáját 10 percig 37 °C-on inkubáltuk 110 µg/ml reakciópufferben, amely a következőket tartalmazza: kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄) 50 mM, magnézium-klorid (MgCl₂) 1 mM, kalcium-klorid (CaCl₂), valin 50 mM, ditiotritol 1 mM, L-arginin 15 nM, citrullin 1 mM, nikotinamid adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) 0,3 mM, flavin-adenin-dinukleotid (FAD) 3 µM, flavin-mononukleotid (FMN) 3 µM és ⁻¹⁴C] arginine 157 pM (110,000 d.p.m. /ml). A reakciót az L-arginin szubsztrát eltávolításával állítottuk le Dowex (AG 50W-8) 1:1 arányú vizes szuszpenziójának (0,5 ml) hozzáadásával. Az elegyet diszpergáltuk és 0,85 ml desztillált vízzel hígítottuk (teljes térfogat 1,5 ml). Miután hagytuk a gyantát leülepedni, a felülúszót

eltávolítottuk, hogy szcintillációs számlálással (2 ml Pico-Fluor) megbecsüljük a radioaktívan jelölt termékeket. A minta fehérjetartalmát spektrofotometriás vizsgálattal (Bio-Rad Protein Assay) határoztuk meg, és a NOS aktivitást pmol/perc/mg/protein értékben fejeztük ki. A NOS aktivitást citrullin képződésként határoztuk meg, amelyet *in vitro* N^G-monometil-L-argininnal (L-NMMA) (700 µM) végzett inkubáció megszüntetett, és az etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA)-val (1 mM) végzett *in vitro* inkubáció hatásaival is jellemeztük. Így az alap L-NMMA-érzékeny aktivitást, amelyet az EGTA megszüntetett cNOS-nak, míg azt, amelyet az EGTA inkubáció nem gátolt, kalcium-független iNOS-aktivitásnak tekintettük (Posa, Pavo et al. 2010).

Western blott analízis

A szívsvövetet lemértük, TRIS-mannit pufferrel (pH 7,4, 1:50) hígítottuk, amely 2% nátrium-dodecil-szulfátot, 50 mM ditiotreitolt, 10% glicerint, 0,1% brómfenol kéket, 62,5 mM TRIS-t és 50 mM mannitot tartalmaz. A sejtörmeléket centrifugálással ülepítettük 12 000 fordulat/perc mellett 20 percig 4 °C -on. 25 µg teljes sejtfehérje alikvotjait denaturáltuk 20,0 mM TRIS-sel, 3,0 mM EDTA-val, 2% SDS-sel, 10% merkaptotetanollal, 20% glicerinnel és nyomnyi mennyiségű brómfenol kékekkel való keveréssel és forralással. Egyenlő mennyiségű fehérjemintát elektroforetizáltunk (100 V) 7,5%-os SDS-PAGE gélen. Elektroforézis után a fehérjéket elektroforetikusán átvittük a festetlen gélről nitrocellulóz membránra (Amersham, Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, Egyesült Királyság). A blottokat ezután iNOS elleni primer antitestekkel és eNOS 1:2000 hígítással (H-174 és H-159, Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) vizsgáltuk. A HRP-vel konjugált másodlagos antitestet (Biotechnology Inc.) 1:2000 hígításban alkalmaztuk. Az immunreaktív sávokat az ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA) segítségével tettük láthatóvá, és X-omat AR Filmre (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) tettük ki. A filmeket az ImageQuant Software (Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, Egyesült Királyság) segítségével elemeztük a GelAnalst 3.01 Software-el (Iconix, Toronto, ON, Kanada) való szkennelés után. Az iNOS és az eNOS expresszióját a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (Santa Cruz) expresszióra normalizáltuk (Posa, Pavo et al. 2010).

Eredmények és diszkusszió

A HO enzimrendszer és a nemi dimorfizmus a kardiovaszkuláris rendszerben

Az ösztrogén sokféle módon hozzájárulhat a nemek között megfigyelhető kardiovaszkuláris morbiditási és mortalitási különbségekhez. Egyik fontos, közvetett szerepe az érrendszeri tónusra gyakorolt hatása lehet, valószínűleg az endotél és a simaizomzat közötti kommunikáció modulálásán keresztül. Vizsgálatainkban a hím állatokhoz képest a HO enzimrendszer emelkedett expresszióját és aktivitását mutattuk ki nőstény patkányokban. Elsőként vizsgáltuk a HO aktivitását szívben és ennek következményeit számos vazoreaktív funkcionális tesztben, a nemi dimorfizmus tekintetében. Eredményeink szerint a magasabb HO aktivitás nőstényekben alacsonyabb vérnyomást, kisebb fokú indukált aorta-összehúzódást, csökkentebb ST-depressziót, valamint mérsékeltebb vazopresszin által kiváltott vérnyomás-emelkedést és szívperfúzió csökkenést okozott. Ezek a HO enzimrendszer működésében kimutatott nemi különbségek szerepet játszhatnak a női nemben megfigyelhető csökkentebb kardiovaszkuláris kockázatban. Kísérleteinkben elsőként alkalmaztunk HO enzim-inhibítort annak elemzésére, hogy az emelkedett HO aktivitás gátlása nőstényekben hogyan befolyásolja a HO -zal kiváltott kardioprotekcióra utaló megfigyeléseket szexuális dimorfizmus és ösztrogén moduláció tekintetében. Eredményeink arra utalnak, hogy a HO aktivitás specifikus gátlása megakadályozza a kardioprotekcióra utaló jelenségek kialakulását pre-menopauzában lévő nőstényekben, illetve súlyosbítja a hímeiben tapasztalt vazopresszinre adott szívperfúziót, vérnyomásválaszt, aortakontrakciót és súlyosbítja az ST depresszió mértékét. Az emelkedettebb HO enzimaktivitások összefüggésben lehetnek a humán női populációban megfigyelhető alacsonyabb kardiovaszkuláris morbiditással. Valószínűsíthetően a HO emelkedettebb expressziója és aktivitása nőstényekben, a szívben és a hasi aortában nagyobb mennyiségű szén-monoxid keletkezését és a szén-monoxid indukálta kaszkád aktivitását váltja ki (Posa, Kupai et al. 2013).

Az endogén ösztrogén hiány és a HO enzimrendszer közvetítette gyulladási folyamatok

A menopauzában lévő nők morbiditási és mortalitási rátáival foglalkozó kiterjedt epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy esetükben a kardiovaszkuláris mortalitás jelentősen megnőtt a még fertilis nőkhöz képest. A menopauza után ugyanis a nők elveszítik

azt a relatív védelmet, amelyet korábban a férfiakkal szemben élveztek. A nőstény patkányokban leírt emelkedettebb HO enzim aktivitás fenntartásában az ösztrogén fontos szerepet játszhat. A HO aktivitás ösztrogénszinttel összefüggő változását, valamint ennek hatásait a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterekre mi vizsgáltuk elsőként. Eredményeink azt mutatják, hogy az ösztrogén hiánya csökkenti HO aktivitást és expressziót, ezzel együtt növeli az IL-6, TNF- α szintjét, valamint az MPO aktivitását és csökkenti a szívizom perfúzióját. A HO enzimgátló adása mellett, mindezen negatív hatások felerősödtek. Kimutattuk, hogy a HO-1/HO-2 expressziójának és a HO rendszer aktivitásának csökkenése hozzájárul a szív iszkémiával szembeni fokozott érzékenységéhez. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az ösztrogénhiány kardiovaszkuláris kockázatot növelő hatásait részben a csökkent HO aktivitás közvetíti. A keringő ösztrodiolszint csökkenése és az öregedéssel járó egyéb folyamatok következtében a pre-menopauzában megfigyelhető kardiális védelem menopauzában csökken. A HO aktivitás életkorral összefüggő változását korábban nem vizsgálták. Eredményeink azt mutatják, hogy az idős patkányok HO aktivitása a fiatalabb, ösztrogénhiányos állatokhoz hasonló mértékben csökken. Növekszik az IL-6, TNF- α szint, az MPO aktivitás és csökken a szívizom perfúzió mértéke. Mindezen elváltozás tovább súlyosbodik, ha az idős patkányok HO enzimgátló kezelésben részesülnek. Nem kizárt, hogy az öregedéssel járó fokozott kardiovaszkuláris kockázatban a HO rendszer csökkenő aktivitása is szerepet játszik (Posa, Szabo et al. 2015).

A testmozgás kardioprotektív szerepe és a MMP2

Az antioxidáns rendszerek, így a HO enzimrendszer nemek közötti eltérése és ezeknek a nőstény állatokban az ösztrogénnel összefüggően megfigyelhető védő szerepe klinikai vonatkozással bírhatnak. Mindemelllett a fizikai aktivitás, nemtől függetlenül is kardioprotektív lehet, számos védelmi rendszer aktiválódik ezzel összefüggésben. Ezek között az egyik, amelyik fontos kardiovaszkuláris jelentőséggel rendelkezik az az MMP-2. Több tanulmány közölt ugyan MMP aktivitásra vonatkozó adatokat különböző edzésmodelleket alkalmazva váz- vagy szívizomzatban, azonban kevesebb információ áll rendelkezésre az edzés által regulált MMP-2 szisztémás keringésben való jelenlétéről vagy aktivitásáról. Az MMP-2 fokozott aktivitása a perfuzátumban hozzájárul az endotélréteg felbomlásához, negatívan befolyásolja az érpermeabilitást és koszorúér betegséghez, valamint szívelégtelenséghez vezet. Több kísérleti elrendezésünkben olyan futó edzésmodellt használtunk, amelyben az állatok

stresszmentes környezetben maguk választhatták meg a testmozgás idejét, időtartamát és intenzitását. Mivel más kutatócsoportok kimutatták, hogy 3-4 hetes futás fiziológiás hipertrófiát idéz elő, ami a szív- és érrendszer kedvező adaptív válaszát váltja ki, mi minimum 6 hetes edzésprotokollt alkalmaztunk, hogy elegendő időt biztosítsunk az adaptációhoz. E kérdés vizsgálatára a szérumban és a perifériás vérben felszabaduló MMP-2 aktivitást elemeztük. Eredményeink szerint a 6 hetes önkéntes testmozgás kardioprotektív hatású és csökkenti a szérumban MMP-2 aktivitását. A fizikai aktivitás továbbá csökkentette a kísérletes angina modellben az ST-segmens depresszió mértékét, így a szív iszkémiára való érzékenységet. A megfigyelés klinikai relevanciájára utal, hogy az ST-segmens elemzése a terheléses tesztet követő normalizációs periódusban prognosztikai értékű lehet (Lanza, Mustilli et al. 2004). A Langendorff szív perfúziós modellünkben az AVP által provokált perfúziócsökkenés mértéke jelentősen kisebb mértékű volt az edzőcsoportban. Mindemellett a kísérletes infarktus kiterjedése is szignifikánsan redukálódott az edzést követően. Ezek a fokozott fizikai aktivitással összefüggő kardioprotekcióra utaló hatások együtt jártak az iszkémia-reperfúziót követően tapasztalt jelentősen csökkentebb koronária flow MMP-2 aktivitással. Vizsgálatainkban elsőként mutattuk ki, hogy a hosszabb idejű mérsékelt intenzitású aerob jellegű testmozgás kardioprotektív szerepében az MMP-2 aktivitás csökkenése is szerepet játszhat. Az MMP-2 csökkenést nem csak a szisztémás keringésben, hanem a provokált szívizom hipoxiát követő akut fázisban a koronária flowban is leírtuk (Posa, Szabo et al. 2015). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a MMP-2 aktivitás meghatározó kóroki szerepet játszik a szívizom sérülések súlyosbodásában vagy, hogy a ROS, gyulladási paraméterek és egyéb komplex anyagcsere-változások egyik fontos biológiai jelzője-e. Vizsgálatainkban megmértük az AVP által kiváltott aortagyűrű összehúzódást és a bazális vérnyomást is. A 2,0 µg/ml AVP dózis korábban a leghatékonyabbnak bizonyult a nemi különbségek kimutatására, ezért jelen vizsgálatban ezt a kezelést alkalmaztuk (Posa, Kupai et al. 2013). Az alapvérnyomásban, valamint az aorta kontrakciójában nem észleltünk különbséget kontroll és edző állatok között. Eredményeink összességében kedvező kardiovaszkuláris adaptációt mutattak az önkéntes edzést követően (Posa, Szabo et al. 2015).

A testmozgás hatása a HO enzimrendszerre magas triglicerid tartalmú diétán tartott ösztrogén-hiányos állatmodellben

Vizsgáltuk az elhízás, az antioxidáns/oxidáns állapot és a gyulladásos folyamatok mögött meghúzódó mechanizmusokat, magas triglicerid diétán tartott ovariektómizált patkányokon. Míg az ösztrogén védi a sejteket az oxidatív károsodástól, és antioxidáns mechanizmusokat indukál, az ösztrogén hiánya elősegíti a szuperoxid termelést. Az ösztrogén hiánya önmagában és elhízással társulva csökkenti a HO enzim aktivitását és expresszióját (Posa, Szabo et al. 2015). Elsőként vizsgáltuk az elhízás, az antioxidáns/oxidáns állapot és a gyulladásos folyamatok háttérében meghúzódó patomechanizmusokat, magas triglicerid tartalmú diétán tartott ösztrogén hiányos patkányokon. Az ösztrogén hiánya önmagában és zsírdús diétával/elhízással társulva csökkenti a HO enzim aktivitását és expresszióját. A zsírdiéta legkifejezettebben a kontroll állatokban csökkentette a HO aktivitásokat, míg az egyébként is csökkent HO aktivitású, ösztrogénhiányos állatokban a diéta csak kisebb mértékben szupresszálta azt. A fizikai aktivitás pedig az ovariektómizált állatokban a diétától függetlenül szinte teljes mértékben visszaállította a nem ösztrogénhiányos állatokban tapasztalt HO aktivitást. Mi is igazoltuk, hogy a HO enzim aktivitásának és expressziójának csökkenése szorosan összefügg a gyulladásos folyamatokkal, amelyet a zsírfelhalmozódás tovább súlyosbít (Varga, Veszelka et al. 2018). Először vizsgáltuk a MPO enzim aktivitás változását ösztrogénhiányos állapotban, illetve a HO aktivitás és a gyulladásos paraméterek egyidejű változását ösztrogénhiányban, elhízásban vagy egészségtelen diétában. Eredményeink azt mutatják, hogy az ösztrogén hiány szignifikánsan növeli mind az IL-6, mind a TNF- α szintjét a plazmában. Ezenkívül zsírdúsán táplált ösztrogén hiányos patkányok mutatják a legmagasabb szintű gyulladási marker koncentrációt. Vizsgálatainkban az ösztrogénhiány és a magas zsírtartalmú diéta jelentősen megnövelte a MPO enzim aktivitását is mind aortaiban, mind szívszövetben. Ezzel együtt a testmozgás normalizálta az aorta és a szív HO enzim aktivitását, amit az ösztrogén hiány és a zsírdús diéta csökkentett. Testmozgás hatására továbbá mind a TNF- α , IL-6 szintjében és MPO aktivitásban szignifikáns csökkenést figyeltünk meg. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a menopauza bizonyos előnytelen, a kardiovaszkuláris kockázatot emelő következményei rendszeres testmozgással jelentősen ellensúlyozhatók. Így a rekreatív testmozgást és a megfelelő diétát joggal tekintjük a felsorolt anyagcserebetegségek fontos megelőző és kiegészítő kezelésének (Posa, Szabo et al. 2015), amely minimalizálhatja az I/R sérüléseket (Szabo, Karacsonyi et al. 2018, Varga, Veszelka et al. 2018).

A testmozgás hatása 2-es típusú cukorbetegség (GK) állatmodellben

Megállapítottuk, hogy az *ex vivo* I/R sérülést megelőző 6 hetes rekreációs testedzés mérsékelte a miokardiális infarktus méretét diabéteszes Goto-Kakizaki patkánymodellben. A mozgás megnövekedett szív- és aorta cNOS aktivitást okozott, valamint növelte a szív HO aktivitását. Ezen túlmenően javultak a metabolikus paraméterek, mint például a plazma leptin és vércukor koncentrációja. Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, amelyben kardioprotekció volt kimutatható 6 hét fizikai aktivitást követően cukorbeteg állatmodellben (Kupai, Szabo et al. 2015). A Goto-Kakizaki egy fokozottan inzulin rezisztens beltenyésztett törzs, amelyeknél spontán 2-es típusú cukorbetegség alakul ki az életkor első néhány hetében. Hat független genetikai lókuszt felelős a glükóz- és inzulinanyagcsere hibáiért ezekben a patkányokban, így a spontán 2-es típusú diabetes mellitus egyik legjobban jellemzett állatmodellje. Jelen vizsgálatban az éhomi vércukorszint szignifikánsan magasabb volt a GK patkányoknál, mint egy egészséges állatnál. A 2-es típusú cukorbetegség egy komplex endokrin/metabolikus betegség, számos kapcsolódó szövődménnyel, köztük mikro- és makrovaszkuláris problémákkal. Ezt általában a hiperglikémia és az oxidatív stressz érrendszerre gyakorolt káros hatásainak tulajdonítják. A magas glükózkoncentráció következményeként endotélsejt diszfunkció alakul ki. Az endotélsejtek diszfunkcióját a következők jellemzik: a csökkent endotél-függő vazorelaxáció, károsodott fibrinolitikus képesség, növekedési faktorok túltermelődése, adhéziós molekulák és gyulladásgépek fokozott expressziója, a ROS túlzott termelődése, fokozott oxidatív stressz és a sejtréteg fokozott permeabilitása. Vizsgálatunk azt mutatta, hogy 6 hetes futás a cNOS aktivitás up-regulációját indukálta és fokozott endotél-függő vasorelaxációt okoz GK modellben. Steensberg és munkatársai megállapították, hogy a NOS gátlása jelentősen csökkentette a HO-1 mRNS edzésindukált expresszióját humán vázizomzatban, és az NO-donor nitroglicerin infúziója fokozta a NOS blokkolóval elnyomott HO-1 mRNS expresszióját (Steensberg, Keller et al. 2007). Ez azt sugallja, hogy a NO egy proximális jel, amely jelentős mértékben szabályozza az edzés által kiváltott HO-1 mRNS expressziót humán vázizomzatban. Így az edzés által indukált NO a HO potenciális induktora lehet. Feltételezzük, hogy a rendszeres testmozgás prekondicionáló stimulus lehet, amely aktiválja a cNOS/HO rendszert. Ezek az eredmények rávilágítanak a cNOS/HO kölcsönhatás fontos szerepére 2-es típusú diabetes mellitus kardiovaszkuláris következményeiben.

A testmozgás hatása miokardiális infarktust követően ösztrogén-hiányos állatmodellben

Egy másik kísérleti modellünkben az ösztrogénhiányt triptorelin adásával, a miokardiális sérülést pedig ISO injekció alkalmazásával indukáltuk. Túlélő patkánymodellünkben az ISO szubkután beadása szignifikánsan növelte a szérum LDH, mioglobint, GOT és ALP szintjét, amely enzimek emelkedett koncentrációja a szívizom károsodás diagnosztikus markere. 0,1 mg/kg ISO egyszeri beadása 15,83%-os infarktus méretet okozott a kontroll ISO kezelt állatokban, míg a farmakológiai ovariektómizált ISO állatok szívében 23,54% -os nekrotikus arány volt megfigyelhető. Bebizonyosodott, hogy az ISO beadása gyulladást okoz és aktiválja a ROS termelő rendszert. Vizsgálatainkban a patkányok önkéntes futó edzést végeztek 3 héttel a miokardiális károsodást követően. Igazoltuk, hogy ebben a kísérleti elrendezésben a kardioprotektív hatást a HO enzimrendszer fokozott aktivitása és expressziója is közvetíti mind kontroll, mind triptorelin kezelt állatmodellben. Kutatásunkból kiderült, hogy az ISO beadása hosszú távú hatást gyakorolt a szív GSH tartalmára. Csökkent GSH szintet eredményezett a kontroll és különösen a farmakológiai ovariektómián átesett állatokban. Hasonlóan a HO enzimhez, a GSH értékeket is növelte a fizikai aktivitás. Vizsgálatunkban a triptorelin által kiváltott ösztrogénhiány okozta a legnagyobb gyulladáshoz vezető választ, melyet igazolt a TNF- α és MPO-aktivitás növekedése (Szabo, Borzsei et al. 2019).

A testmozgás protektív hatása a kardiovaszkuláris rendszert érintő öregedési folyamatokban

A szív öregedésének jobb megértése feltárhatja a szív patofiziológiájával kapcsolatos molekuláris utakat, és hozzájárulhat a CVDs kockázatának csökkentéséhez. E célokkal összhangban egy másik kísérleti elrendezésünkben igazoltuk, hogy a 12 hetes testmozgás protektív szereppel bír az idős nőstény és hím patkányok korrall járó kardiovaszkuláris diszfunkcionalitásának javításában. Kimutattuk, hogy a 12 hetes testmozgás protektív szereppel bír az idős mind a nőstény és a hím patkányok korrall járó kardiovaszkuláris diszfunkcionalitásának javításában. Eredményeink azt mutatják, hogy a rendszeres fizikai aktivitás javítja a szív funkcionális paramétereit. Vizsgálatunkban a nyomon követés ideje alatt az idős hím állatok szívfunkciója jelentősebb mértékben romlott, mint a nőstényeké. Ezzel együtt a szisztolés és diasztolés szívfunkció javulása és az infarktusos terület csökkentése az iszkémiás sérülést követően szembetűnőbb volt az idős hím állatokban testedzés után. Az echokardiográfiás mérések eredményei szerint a nem futó társaikhoz képest a futó hím és futó

nőstény állatokban mért bal kamrai EF és FS szignifikánsan megnőtt. Ezenkívül a futó csoportok MAPSE értékei is szignifikánsan megemelkedtek az idősebb kontrollokhöz képest. Ezek a paraméterek együttesen jelentős javulásra utalnak a bal kamra szisztolés funkciójában mind a hím, mind a nőstény patkányoknál, akik edzettek. A Doppler képalkotásból nyert adatok azt mutatják, hogy a bal kamra diasztolés funkciója szignifikánsan javult futó hím patkányokban, amit a megnövekedett E/A arány (csökkent pitvari hullámsebesség), a normalizált DecT és az IVRT igazol. Mivel a hosszan tartó DecT és IVRT a szívizom relaxációjának károsodását jelzi, ezeknek a paramétereknek a viszonylag rövidebb időtartama a futó hímcsoporthoz az edzéshez kapcsolódó diasztolés funkció javulására utal. Ezek a változások nem voltak megfigyelhetőek a futó nőstény csoportban az idősebb nőstény kontrollokhöz képest; Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az idősebb nőstény patkányok diasztolés funkciója viszonylag megőrzött volt. Emelkedett MPI értékeket találtunk azonban az idősebb nőstény csoportban, amit a testmozgás szignifikánsan ellensúlyozott, jelezve az edzés jótékony hatását a globális szív működésre ebben az állatcsoportban is. Nemi különbségeket figyeltünk meg a gének és fehérjék (Comt, Ogn, Pcp4, Esm1) expressziójában is a szívizomszövetben öregedés és testmozgás hatására. Megállapítottuk, hogy a kedvező kardiális változásokat a Comt és Ogn gének szívizomban mért expressziójának csökkenése kísérte, míg a Pcp4 expressziója szignifikánsan megnövekedett (Borzsei, Priksz et al. 2021).

Az úszás hatása a férfi reprodukív rendszerre

Egy másik kísérleti elrendezésünk a mozgás andrológiai értelmében vett protektív hatására irányultak. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az ISO-indukált oxidatív stressz heregyulladás, a hormonális egyensúly felborulását, alacsony tesztoszteron koncentrációt, a herékben lévő antioxidáns kapacitás károsodását és az érett/éretlen spermiumok arányának csökkenését okozza. Ezek a káros változások összefüggésbe hozhatók a férfi meddőséggel. Az oxidatív stressznek a férfi reprodukív rendszerre gyakorolt negatív hatásaira vonatkozó eredményeink összhangban vannak számos olyan vizsgálattal, amelyek szerint az oxidatív stressz herediszfunkciót okoz. Ezek a tanulmányok arra is utalnak, hogy az oxidatív stressz DNS károsodással és rendellenes spermatermeléssel jár együtt, ami a csökkent férfi termékenység növekvő gyakoriságát magyarázza. Patkány modellünkben mind a herében, mind az ISO -al kezelt állatok ondójában szignifikánsan alacsonyabb GSH szintet találtunk, ami arra utal, hogy az ISO által kiváltott herekárosodás tönkretette a szövet antioxidáns védelmét. Ez a

csökkent here GSH szint szerepet játszhat a tesztoszteron bioszintézisének károsodásában az ISO kezelést követően. Az oxidatív stressz gyulladást generál – ezt mutatja az emelkedett MPO, a TNF- α és az IL-6 szint - ami szintén hozzájárulhat a tesztoszteron koncentráció csökkenéséhez és az érett spermiumok csökkent arányához, ami meddőséghez vezet. Patkány modellünkben azonban az ISO negatív hatásait mérsékelni tudtuk testmozgással (úszás). Jelen vizsgálatban mérsékelt intenzitású pre- és/vagy post úszás, ISO által kiváltott fokozódó gyulladós válaszra kifejtett hatásaira kerestük a választ. Figyelemre méltó, hogy más típusú fizikai tevékenységekkel (pl. futás) összehasonlítva az úszás előnye, hogy minimalizálja a herehőmérséklet emelkedést, amelyről ismert, hogy káros hatással van a spermiumokra. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy akár a kezelés előtti, akár a kezelés utáni úszás önmagában is hatékony az ISO negatív hatásainak enyhítésében. A legjobb hatás azonban a kombinált úszás során mutatkozott, ami azt jelzi, hogy a mérsékelt fizikai aktivitás (úszás) erős potenciállal rendelkezik az ISO által kiváltott gyulladásra és antioxidáns kapacitás eltolódás javítására (Osvath, Szucs et al. 2022).

Az iszkémiás prekondicionálás kardiovaszkuláris protektív hatása malac modellben

Malacmodellünkben az iszkémiás prekondicionálás NOS közvetítette védő hatását igazoltuk. Az iszkémiás prekondicionálásnak szerepe van a koszorúér-átjárhatóság jobb fenntartásában a cNOS mediálásán keresztül. Továbbá eredményeink összhangban vannak azokkal a klinikai eredményekkel is, amelyek szerint a magasabb szérumban MPO-szintű betegeknél nagyobb a kardiovaszkuláris események, a reperfüzió utáni szív működési zavarok és a kedvezőtlen kamrai remodelling kockázata. Az iszkémiás prekondicionálás gyengítette a MPO felszabadulását, ezáltal gátolja a trombocita aktivációt. A csökkent cNOS aktivitás közvetlen hozzájárul a neutrofil infiltráció növekedéséhez, ami az aktivált leukociták, a vérlemezkék és a NOS aktivitás közötti kölcsönös kölcsönhatásra utal. Az anterográd véráramlás helyreállítása után a szívizom károsodása és az áramlás hiánya áll fenn. A magas MPV előrejelzője a reperfüziós károsodásnak. Az MPV szignifikáns növekedését mértük az infarktusos nem prekondicionált csoportban, miközben az MPV önmagában mérsékelt emelkedett az ismétlődő iszkémia miatt. Az MPO szint és a mikrovaszkuláris átjárhatóság vagy a szöveti cNOS aktivitás molekuláris mutatói közötti szignifikáns korrelációk arra utalnak, hogy a cNOS preventív mediátor szerepe van a leukocita-trombocita kölcsönhatás okozta mikrovaszkuláris obstrukcióban. Az iszkémiás prekondicionálás gyengítette a trombocita és

leukocita aktivációt és az MPO felszabadulását, ezáltal valószínűleg hozzájárul az ér átjárhatóságának fenntartásához mikrovaszkuláris szinten (Posa, Pavo et al. 2010).

A paclitaxel hatásossága gyógyszerkibocsátó ballon alkalmazásakor malac modellben

Malacmodellben emellett vizsgáltuk az artériás szövetben lokálisan alkalmazott paclitaxel azonnali biohasznosulásának biztonságosságát és hatékonyságát. Kimutattuk a paclitaxel eloszlását, valamint a gyógyszer függőleges behatolását a szövetbe 2 mm-es mélységig; ami alapján hatékony gyógyszerkoncentráció érhető el egy vastag atheroszklerotikus plakk jelenlétében. A 2. generációs ballon az új bevonat technológiájával akár 20-szor magasabb szöveti koncentrációt eredményezett, mint az 1. generációs (Posa, Hemetsberger et al. 2008), ami optimálisabb szöveti koncentráció a simaizomsejtek proliferációjának gátlásához. Az idő-függőségi vizsgálat a szöveti paclitaxel maximális koncentrációját 30 másodperces ballon felfújási idő után mutatta, 45 másodperc után minimális további növekedést mutatott a szöveti gyógyszerkoncentrációban és 1 perces felfújási idő után a hatóanyag bekerült a keringésbe. A ballon 30 másodperces felfújási ideje kevesebb artériás sérülést okoz és a betegek jobban tolerálhatják klinikai helyzetben. Vizsgálatunk azt is bizonyítja, hogy a paclitaxel érfalon történő rövid expozíciójának hatásossága a sérülésmodellben szignifikánsan kisebb neointimális hiperpláziával jár, mint a hagyományos ballon esetében (Posa, Nyolczas et al. 2010).

Következtetések

1. A hím állatokhoz képest a nőstény patkányokban a HO enzimrendszer expressziója és aktivitása emelkedett. A magasabb HO aktivitás nőstényekben alacsonyabb vérnyomást, kisebb fokú indukált aorta-összehúzódást, csökkentebb ST-depressziót, valamint mérsékeltabb vazopresszin által kiváltott vérnyomás-emelkedést és szívperfúzió csökkenést okozott. A HO aktivitás specifikus gátlása megakadályozza a fokozott kardioprotekcióra utaló jelenségek kialakulását pre-menopauzában lévő nőstényekben, illetve súlyosbítja a hímekben. Humán vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy a HO enzimrendszer állatkísérletben általunk igazolt működésében kimutatott nemi különbségek szerepet játszhatnak-e a női nemben megfigyelhető csökkentebb kardiovaszkuláris kockázatban.
2. Az ösztrogén hiánya és az idős kor, nőstény patkányokban csökkenti HO expresszióját és aktivitását, ezzel együtt növekszik az IL-6, TNF- α szintje, valamint a MPO aktivitása, illetve fokozódik a szív iszkémiával szembeni érzékenysége. A HO aktivitás gátlása ösztrogén hiányos és idős nőstény patkányokban tovább növeli az iszkémiára való hajlamot. Vizsgálataink alapján lehetséges, hogy az ösztrogén hiánnyal, valamint az öregedéssel járó fokozott kardiovaszkuláris kockázatban a HO rendszer csökkenő aktivitása is szerepet játszik.
3. A hosszabb idejű mérsékelt intenzitású aerob jellegű testmozgás kardioprotektív szerepében (szívperfúzió, infarktus méret relatív megtartottsága) a szisztémás MMP-2 aktivitás csökkenése és az iszkémia-reperfúziót követően tapasztalt koronária perfuzátum MMP-2 aktivitás redukciója is szerepet játszhat hím patkányokban. Perspektivikusak lehetnek további vizsgálatok annak eldöntésére, hogy a MMP-2 aktivitás kóros szerepet játszik a szívizom sérülések súlyosbodásában vagy, hogy a ROS, gyulladásos paraméterek és egyéb komplex anyagcsere-változások egyik fontos biológiai jelzője-e.
4. Az ösztrogén hiánya önmagában és zsírdús diétával/elhízással társulva fokozott mértékben csökkenti a HO enzim aktivitását és expresszióját nőstény patkányban. A zsírdiéta legkifejezettebben a kontroll állatokban csökkentette a HO aktivitásokat. A fizikai aktivitás pedig az ovariektómizált állatokban a diétától függetlenül szinte teljes

mértékben visszaállította a nem ösztrogénhiányos állatokban tapasztalt HO aktivitást. Az ösztrogén hiány szignifikánsan növeli mind az IL-6, mind a TNF- α szintjét a plazmában. Ezenkívül zsírdúsán táplált ösztrogén hiányos patkányok mutatják a legmagasabb szintű gyulladási marker koncentrációt. Vizsgálatainkban az ösztrogénhiány és a magas zsírtartalmú diéta jelentősen megnövelte a MPO enzim aktivitását is mind aortában, mind szívszövetben. Ezzel szemben a testmozgás normalizálta az aorta és a szív HO enzim aktivitását és csökkentette a plazma TNF- α és az IL-6 plazma koncentrációját, valamint MPO aktivitását. Ezek az eredmények a testmozgás kardiovaszkuláris kockázatot csökkentő, anti-inflammatorikus mechanizmusait igazolják.

5. Megállapítottuk, hogy az *ex vivo* I/R sérülést megelőző 6 hetes rekreációs testedzés mérsékelte a miokardiális infarktus méretét 2-es típusú diabéteszes Goto-Kakizaki patkánymodellben. A mozgás megnövekedett szív- és aorta cNOS aktivitást okozott, valamint növelte a szív HO aktivitását. Ezen túlmenően javultak a metabolikus paraméterek, mint például a plazma leptin és a vércukor koncentrációja.
6. Az ISO következményeként kialakult miokardiális károsodást követően a testmozgás kardioprotektív hatásait részben a HO enzimrendszer fokozott aktivitása és expressziója is közvetíti mind kontroll, mind farmakológiai ovariektómián átesett, ösztrogén hiányos nőstény patkánymodellben. Hasonlóan a HO enzimhez, a GSH értékeket is növelte a fizikai aktivitás. A 6 hét rekreációs testmozgás gyulladáscsökkentő hatású, csökkentette az MPO aktivitását és a TNF- α koncentrációját, javította a szív antioxidáns és gyulladáscsökkentő állapotát is. A testmozgás védőhatásában szerepet játszó lehetséges mechanizmusok magukban foglalják a HO enzim aktivitásának és expressziójának, valamint a GSH szintjének növekedését, amely hozzájárul a gyulladáscsökkentéshez.
7. Rendszeres fizikai aktivitás hiányában a hím patkányok szívfunkciója jelentősebb mértékben romlott a nőstényekhez viszonyítva. A szisztolés és diasztolés szívfunkció javulása szembetűnőbb volt az idős hím állatokban edzés után az infarktusos terület méretének vonatkozásában az iszkémiás sérülésnek kitett szívekben. Ezeket a kedvező változásokat a Comt és Ogn gének expressziójának csökkenése és Pcp4 expressziója növekedése kísérte a szívizomban.

8. Az ISO injekció csökkentette az antioxidáns GSH termelését és indukálta az MPO-IL6-TNF- α gyulladási útvonalat a herékben és az ondóban, ami stressz által kiváltott herekárosodáshoz vezetett. Ez az első bizonyíték arra, hogy a mérsékelt intenzitású fizikai aktivitás (úszás) hatékonyan enyhítheti az ISO által kiváltott gyulladást és növelheti az antioxidáns védelmet a férfi reprodukív rendszerben, így preventív és/vagy terápiás stratégiaként használható a káros következmények, például az oxidatív szövetkárosodás, a gyulladási folyamatok, a csökkent tesztoszteron bioszintézis és a kedvezőtlen érett/éretlen sperma arány ellensúlyozására.

9. Az iszkémiás prekondicionálást követő kardioprotekciót a cNOS aktivitás növekedése is közvetíti, ami javuló koszorúér perfúzióval jár. Eredményeink összhangban vannak azokkal a klinikai eredményekkel is, amelyek szerint a magasabb szérumszintű MPO-szintű betegeknél nagyobb a kardiovaszkuláris események, a reperfüzió utáni szívműködési zavarok és a kedvezőtlen kamrai remodelling kockázata.

10. A 30 másodperces ballonfelfújási/expozíciós idő bizonyult optimálisnak a DIOR bevonattechnológiás paclitaxelt tartalmazó koronária tágító ballon alkalmazásánál. Ez idő alatt sikerült hatékony szöveti paclitaxel koncentrációt elérni, és ezzel egyidejűleg a gyógyszer szisztémás keringésbe történő bejutása minimális maradt. Rövidebb expozíciós idő elégtelen lokális hatást eredményezett, míg hosszabb idő jelentős szisztémás expozícióval járt. Vizsgálatunk állatmodellben elsőként igazolta az újonnan kifejlesztett DEB biztonságosságát és hatékonyságát.

Köszönetnyilvánítás

Ezúttal mély hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni azoknak a kiváló szakembereknek és barátoknak, akik pályám során mellett álltak és segítettek. Kiemelten szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Pávó Imrének, Pávóné Prof. Dr. Gyöngyösi Mariann-nak, és Dr. Varga Csabának, akik bármilyen kérdéssel vagy dilemmával hozzájuk fordulhattam, legyen az szakmai útmutatás vagy baráti tanács. Kutatási eredményeimben jelentős szerepük van, amit témavezetőként vállaltak.

Hálámat szeretném továbbá kifejezni Prof. Dr. Juhász Bélának, Prof. Dr. Gesztelyi Rudolfnak, Dr. Priksz Dánielnek, Dr. Varga Balázsnak, Dr. Bombicz Mariann-nak és Dr. Szűcs Miklósnak. Köszönöm nekik a közös munkát, a szakmai támogatást és barátságukat.

Prof. Dr. Radák Zsoltnak és munkacsoportjának köszönöm a kollaborációt, valamint szakmai tanácsaikat.

Dr. Kupai Krisztinának hálás vagyok feltétel nélküli barátságáért, különösen a válságos pillanatokban nyújtott támogatásáért.

Prof. Dr. Baráth Zoltánnak és Prof. Dr. Madléna Melindának köszönöm, hogy lehetővé tették jelenlegi kutatásaimat, és hálás vagyok a bátorításukért.

Dr. Varga-Matusovits Danicának barátságáért és segítségéért, valamint a közös munkáért szeretnék köszönetet mondani.

Dr. Gombár Angélnak köszönöm a közös munkát és barátságát.

Törökné Bielik Mártának szeretnék kifejezni köszönetemet, aki megtanított arra, hogy a legnehezebb helyzetekben sem adjuk fel.

Dr. Dobos Nikolettának, Hossó Adrienn-nek, Mezőné Dr. Gyenes Andreának, Dr. Bereczki Zsoltnak, Dr. Pardi Norbertnek, Dr. Hatvani Lórántnak, Szalma Évának és Dr. Daróczi Györgynek köszönöm az egyetemi és PhD hallgatói éveim fergeteges hangulatát.

Tóth-Molnár Erikának köszönöm a közös munkát és barátságát.

Dr. Deim Zoltánnak hálás vagyok a barátságáért és szakmai tanácsaiért.

Homolya Ernőnek köszönöm az informatikai támogatást és feltétel nélküli barátságát.

Stafira Árpádnak köszönöm a lektorálást, barátságát és támogatását.

Dr. Petneházy Örsnek, Dr. Hevesi Ákosnak, Dr. Petrási Zsoltnak és Dr. Garamvölgyi Ritának köszönöm a közös munkát, a sok nevetést és az éjszakai kísérletek vidám pillanatait.

PhD hallgatóimnak, Dr. Veszélka Médeának, Dr. Ménesi Rudolfnak, Dr. Szalai Zitának, Dr. Matvon Denisnek, Dr. Szabó Renátának, Dr. Osváth Péternek és Dr. Karácsonyi Zoltánnak köszönöm a közös munkát.

A SZTE FOK összes munkatársának, a SZTE TTIK Élettani Szervezettani és Idegtudományi tanszék dolgozóinak, valamint a Debreceni Egyetem és a Kaposvári Egyetem munkatársainak szeretném megköszönni a húsz éven át tartó kiváló együttműködést és jó hangulatot.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném kifejezni mély hálámat a családomnak, akik mindenben támogattak és segítettek, hogy eljussak ennek a munkának a befejezéséig. Ők azok, akik a legtöbbet tettek értem.

Irodalomjegyzék

1. Borzsei, D., D. Priksz, R. Szabo, M. Bombicz, Z. Karacsonyi, L. G. Puskas, L. Z. Feher, Z. Radak, K. Kupai, A. M. Berko, C. Varga, B. Juhasz and A. Posa (2021). "Exercise-mitigated sex-based differences in aging: from genetic alterations to heart performance." Am J Physiol Heart Circ Physiol **320**(2): H854-H866.
2. Borzsei, D., R. Szabo, A. Hoffmann, A. Harmath, J. Sebestyen, J. Osman, B. Juhasz, D. Priksz, C. Varga and A. Posa (2021). "Multiple Applications of Different Exercise Modalities with Rodents." Oxid Med Cell Longev **2021**: 3898710.
3. Kupai, K., R. Szabo, M. Veszeka, A. A. Awar, S. Torok, A. Csonka, Z. Barath, A. Posa and C. Varga (2015). "Consequences of exercising on ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts: role of the HO/NOS system." Diabetol Metab Syndr **7**: 85.
4. Lanza, G. A., M. Mustilli, A. Sestito, F. Infusino, G. A. Sgueglia and F. Crea (2004). "Diagnostic and prognostic value of ST segment depression limited to the recovery phase of exercise stress test." Heart **90**(12): 1417-1421.
5. Matusovits, D., Z. Murlasits, K. Kupai, Z. Barath, H. L. Kang, P. Osvath, M. Szucs, D. Priksz, B. Juhasz, Z. Radak, T. Varkonyi, I. Pavo and A. Posa (2023). "Paclitaxel Protects against Isoproterenol-Induced Damage in Rat Myocardium: Its Heme-Oxygenase Mediated Role in Cardiovascular Research." Antioxidants (Basel) **12**(5).
6. Osvath, P., M. Szucs, D. Borzsei, R. Szabo, Z. N. Lesi, Z. Turcsan, M. Veszeka, J. Sebestyen, B. Juhasz, D. Priksz, C. Varga and A. Posa (2022). "Andrological Aspects of Exercise: Moderate Swimming Protects against Isoproterenol Induced Testis and Semen Abnormalities in Rats." Antioxidants (Basel) **11**(3).
7. Posa, A., R. Hemetsberger, O. Petnehazy, Z. Petrasi, M. Testor, D. Glogar and M. Gyongyosi (2008). "Attainment of local drug delivery with paclitaxel-eluting balloon in porcine coronary arteries." Coron Artery Dis **19**(4): 243-247.
8. Posa, A., K. Kupai, R. Menesi, Z. Szalai, R. Szabo, Z. Pinter, G. Palfi, M. Gyongyosi, A. Berko, I. Pavo and C. Varga (2013). "Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase." Oxid Med Cell Longev **2013**: 521563.
9. Posa, A., N. Nyolczas, R. Hemetsberger, N. Pavo, O. Petnehazy, Z. Petrasi, G. Sangiorgi and M. Gyongyosi (2010). "Optimization of drug-eluting balloon use for safety and

- efficacy: evaluation of the 2nd generation paclitaxel-eluting DIOR-balloon in porcine coronary arteries." Catheter Cardiovasc Interv **76**(3): 395-403.
10. Posa, A., N. Pavo, R. Hemetsberger, C. Csonka, T. Csont, P. Ferdinandy, Z. Petrasi, C. Varga, I. J. Pavo, F. Laszlo, Jr., K. Huber and M. Gyongyosi (2010). "Protective effect of ischaemic preconditioning on ischaemia/reperfusion-induced microvascular obstruction determined by on-line measurements of coronary pressure and blood flow in pigs." Thromb Haemost **103**(2): 450-460.
 11. Posa, A., R. Szabo, A. Csonka, M. Veszelka, A. M. Berko, Z. Barath, R. Menesi, I. Pavo, M. Gyongyosi, F. Laszlo, K. Kupai and C. Varga (2015). "Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause." Oxid Med Cell Longev **2015**: 429713.
 12. Posa, A., R. Szabo, K. Kupai, Z. Barath, Z. Szalai, A. Csonka, M. Veszelka, M. Gyongyosi, Z. Radak, R. Menesi, I. Pavo, A. M. Berko and C. Varga (2015). "Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2." Oxid Med Cell Longev **2015**: 876805.
 13. Posa, A., R. Szabo, K. Kupai, A. Csonka, Z. Szalai, M. Veszelka, S. Torok, L. Daruka and C. Varga (2015). "Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats." Oxid Med Cell Longev **2015**: 787063.
 14. Steensberg, A., C. Keller, T. Hillig, C. Froisig, J. F. Wojtaszewski, B. K. Pedersen, H. Pilegaard and M. Sander (2007). "Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle." FASEB J **21**(11): 2683-2694.
 15. Szabo, R., D. Borzsei, Z. Karacsonyi, R. Gesztelyi, K. Nemes, A. M. Berko, M. Veszelka, S. Torok, K. Kupai, C. Varga, B. Juhasz and A. Posa (2019). "Postconditioning-like effect of exercise: new paradigm in experimental menopause." Am J Physiol Heart Circ Physiol **316**(2): H400-H407.
 16. Szabo, R., Z. Karacsonyi, D. Borzsei, B. Juhasz, A. Al-Awar, S. Torok, A. M. Berko, I. Takacs, K. Kupai, C. Varga and A. Posa (2018). "Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats." Oxid Med Cell Longev **2018**: 6709742.
 17. Varga, C., M. Veszelka, K. Kupai, D. Borzsei, Z. Deim, R. Szabo, S. Torok, D. Priksz, R. Gesztelyi, B. Juhasz, Z. Radak and A. Posa (2018). "The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: The Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk." J Sports Sci Med **17**(4): 580-588.

A Disszertáció alapjául szolgáló publikációk

1. Posa, A., K. Kupai, R. Menesi, Z. Szalai, R. Szabo, Z. Pinter, G. Palfi, M. Gyongyosi, A. Berko, I. Pavo and C. Varga (2013). "Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase." Oxid Med Cell Longev **2013**: 521563.
2. Posa, A., R. Szabo, A. Csonka, M. Veszelka, A. M. Berko, Z. Barath, R. Menesi, I. Pavo, M. Gyongyosi, F. Laszlo, K. Kupai and C. Varga (2015). "Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause." Oxid Med Cell Longev **2015**: 429713.
3. Posa, A., R. Szabo, K. Kupai, Z. Barath, Z. Szalai, A. Csonka, M. Veszelka, M. Gyongyosi, Z. Radak, R. Menesi, I. Pavo, A. M. Berko and C. Varga (2015). "Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2." Oxid Med Cell Longev **2015**: 876805.
4. Posa, A., N. Nyolczas, R. Hemetsberger, N. Pavo, O. Petnehazy, Z. Petrasi, G. Sangiorgi and M. Gyongyosi (2010). "Optimization of drug-eluting balloon use for safety and efficacy: evaluation of the 2nd generation paclitaxel-eluting DIOR-balloon in porcine coronary arteries." Catheter Cardiovasc Interv **76**(3): 395-403.
5. Posa, A., N. Pavo, R. Hemetsberger, C. Csonka, T. Csont, P. Ferdinandy, Z. Petrasi, C. Varga, I. J. Pavo, F. Laszlo, Jr., K. Huber and M. Gyongyosi (2010). "Protective effect of ischaemic preconditioning on ischaemia/reperfusion-induced microvascular obstruction determined by on-line measurements of coronary pressure and blood flow in pigs." Thromb Haemost **103**(2): 450-460.
6. Varga, C., M. Veszelka, K. Kupai, D. Borzsei, Z. Deim, R. Szabo, S. Torok, D. Priksz, R. Gesztelyi, B. Juhasz, Z. Radak and A. Posa (2018). "The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: The Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk." J Sports Sci Med **17**(4): 580-588.
7. Kupai, K., R. Szabo, M. Veszelka, A. A. Awar, S. Torok, A. Csonka, Z. Barath, A. Posa and C. Varga (2015). "Consequences of exercising on ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts: role of the HO/NOS system." Diabetol Metab Syndr **7**: 85.
8. Szabo, R., D. Borzsei, Z. Karacsonyi, R. Gesztelyi, K. Nemes, A. M. Berko, M. Veszelka, S. Torok, K. Kupai, C. Varga, B. Juhasz and A. Posa (2019).

"Postconditioning-like effect of exercise: new paradigm in experimental menopause."
Am J Physiol Heart Circ Physiol **316**(2): H400-H407.

9. Osvath, P., M. Szucs, D. Borzsei, R. Szabo, Z. N. Lesi, Z. Turcsan, M. Veszeka, J. Sebestyen, B. Juhasz, D. Priksz, C. Varga and A. Posa (2022). "Andrological Aspects of Exercise: Moderate Swimming Protects against Isoproterenol Induced Testis and Semen Abnormalities in Rats." Antioxidants (Basel) **11**(3).
10. Borzsei, D., D. Priksz, R. Szabo, M. Bombicz, Z. Karacsonyi, L. G. Puskas, L. Z. Feher, Z. Radak, K. Kupai, A. M. Berko, C. Varga, B. Juhasz and A. Posa (2021). "Exercise-mitigated sex-based differences in aging: from genetic alterations to heart performance." Am J Physiol Heart Circ Physiol **320**(2): H854-H866.