

juhasz.bela.1_180_24
MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Természetes forrásból származó bioaktív anyagok és
derivátumaik hatásainak vizsgálata kardiovaszkuláris, illetve
metabolikus betegségek preklinikai modelljein**

Juhász Béla

DEBRECEN

2024

juhasz.bela.1_180_24
MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Természetes forrásból származó bioaktív anyagok és
derivátumaik hatásainak vizsgálata kardiovaszkuláris, illetve
metabolikus betegségek preklinikai modelljein**

Juhász Béla



**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET
DEBRECEN**

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	1
Előszó.....	10
Bevezetés.....	12
Diszlipidémia és az ateroszklerózis.....	12
A miokardiális és vaszkuláris PDE9A upregulálódik az ateroszklerózis eredetű szív- és érrendszeri betegségekben.....	17
Statinok és a resveratrol	18
Bromelain (Br)	20
Niacinhoz kötött króm-komplex alapú Energia formula (Ef)	20
Görögszéna (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	21
Meggy (<i>Prunus cerasus</i>)	25
Medvehagyma (<i>Allium ursinum</i>).....	26
Pulmonális artériás hipertenzió (PAH)	28
BGP-15.....	30
Célkitűzés	32
Anyagok és módszerek.....	33
Kísérleti elrendezések	33
A resveratrol hatásának vizsgálata a kardiális diszfunkcióra streptozotocin-indukálta diabétesz modellen	33
A resveratrol és statinok hatásai hiperkoleszterinémias patkány modellen	33
A niacin-kötött-króm bázisú Energia formula (Ef) hatásai	34
A meggy-mag-kivonat és a hiperkoleszterinémia szívműködésre gyakorolt hatása	35
Az <i>Allium ursinum</i> liofilizátum, wild garlic leaf lyophilisate (WGLL) antiaterogén hatásainak vizsgálata	35
A pulmonális artériás hipertenzió (PAH) kezelése WGLL-lel	35
A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai.....	36
BGP-15 hatása a Goto-Kakizaki és Wistar patkányok metabolikus paramétereire	37
A miokardiális és vaszkuláris PDE9A enzim expressziójának változása a hiperkoleszterinémias tápon tartott nyulakban.....	37
Echokardiográfia	38
Szérumparaméterek meghatározása	40
Izolált dolgozó szív preparátum és az iszkémia/reperfúzió létrehozása patkány és nyúl modelleken	41
Az izolált aortagyűrű preparátum.....	44
Infarktus méretének becslése <i>in vitro</i> modellen.....	45
Az ateroszklerotikus plakkok elemzése	45

juhasz.bela.1_180_24

Az aorta szövettani elemzése	46
A szívizomzat és tüdő szövettani elemzése.....	46
A kardiomiociták apoptózisának meghatározása	47
A miokardiális fehérjék kivonása.....	47
A nukleáris és citoszolikus fehérjefrakciók elválasztása	48
Western blot	48
Immunhisztokémia β -catenin transzlokációjáról és a kapilláris denzitásról.....	50
A nagy energiájú foszfátvegyületek vizsgálata.....	51
Az <i>Allium ursinum</i> liofilizációja (WGLL) és analízise.....	51
Citokróm c oxidáz (COX) aktivitás meghatározása.....	51
A vízdoldékony vegyületek antioxidáns kapacitásának (ACW) meghatározása	52
A lipiddoldékony vegyületek antioxidáns kapacitásának (ACL) meghatározása	52
cGMP assay.....	52
Statisztikai elemzés	53
Eredmények.....	54
Eredmények I.	54
Resveratrol hatása a vércukorszintre.....	54
Resveratrol hatása a szívfunkciós paraméterekre.....	55
Resveratrol hatása a miokardiális infarktus méretére, illetve a kardiomiociták apoptózisára TUNEL assay-vel vizsgálva.....	57
Resveratrol hatása az Akt és eNOS foszforilációjára, illetve a Trx-1, HO-1 és VEGF fehérjék expressziójára.....	58
Eredmények II.	60
Resveratrol és statinok hatása a lipidszintekre.....	60
Resveratrol és statinok hatása a szívfunkciókra.....	61
Resveratrol és statinok hatása az infarktus méretére.....	62
Resveratrol és statinok hatása a kardiomiociták apoptózisára	63
Resveratrol és statinok hatása az Akt és eNOS foszforilációjára.....	65
Resveratrol és statinok hatása a β -catenin transzlokációra	66
Resveratrol és statinok hatása a kapilláris denzitás mértékére.....	66
Eredmények III.....	67
A bromelain hatása a miokardiális funkciókra.....	67
A bromelain hatása az infarktus kiterjedésére és a miokardiális sejtek apoptózisára	68
A bromelain hatása az Akt és a FOXO3A foszforilációjának mértékére	69
Eredmények IV.	72
Niacinhoz kötött króm-komplex alapú Energia formula (Ef)	72
Az Ef hatása a miokardiális infarktus kiterjedésére	73
Az Ef hatása az ATP és kreatin-foszfát (CP) szintekre.....	74

Eredmények V.....	75
A meggy-mag-kivonat (SCSE) és a hiperkoleszterinémia szívizomra gyakorolt hatásának követése ultrahangos képalkotó eljárással.....	75
Az SCSE hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére.....	75
A 2%-os koleszterin diéta és SCSE hatása a szérumszintekre.....	76
Az SCSE hatása az ateroszklerotikus plakk méretére.....	77
Az SCSE hatása az infarktusos terület nagyságára.....	77
Az SCSE hatása a COX enzim aktivitására.....	78
Az SCSE hatása a COXIII, HO-1, VEGF expresszióra.....	78
Eredmények VI.	79
A medvehagyma liofilizátum (WGLL) HPLC analízise.....	79
A WGLL hatásai a szívműködésre.....	80
A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása a szívműködés biomarkereire.....	82
A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása az ateroszklerózis kialakulására.....	83
A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása a szérum paraméterekre.....	84
Eredmények VII.	85
A WGLL hatása az in vivo szívfunkciós paraméterekre.....	85
WGLL hatása az in vitro szívfunkciós paraméterekre.....	86
Mikroszkópos vizsgálatok.....	87
WGLL hatása a PDE5 expresszióra.....	88
Eredmények VIII.....	90
A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai a testsúly-növekedésre.....	90
A noradrenalinra adott válasz izolált éren.....	90
Az acetil-kolinra adott válasz izolált éren.....	91
Eredmények IX.	94
BGP-15 hatása a Goto-Kakizaki és Wistar patkányok metabolikus paramétereire.....	94
BGP-15 hatása az endotél-függő vazorelaxációra.....	95
A BGP-15 javítja a diasztolés funkciót.....	96
A BGP-15 emeli a foszfolamban és a VASP fehérjék foszforilációs szintjét.....	99
Eredmények X.....	100
A hiperkoleszterinémia hatása a szívfunkciós paraméterek változására echokardiográfia segítségével.....	100
HC hatása a morfometriai paraméterekre.....	102
Szérum paraméterek.....	103
Endotél-függő vazorelaxáció.....	104
Hiperkoleszterinémia hatása a szövettani elváltozásokra.....	105
VASP, foszforilált VASP, és PDE9A expressziója.....	105
Diszkusszió.....	107

juhasz .bela .1_180_24

I. A resveratrol szív működésre gyakorolt hatásai STZ indukált diabéteszben	107
II. Resveratrol és statin kardioprotektív hatása hiperkoleszterinemiában	109
III. A bromelain (Br) kardioprotektív hatásai	111
IV. Niacinhoz kötött króm komplex alapú Ef hatásai az iszkémia/reperfúziós károsodás során	113
V. A meggymag-kivonat (SCSE) és a hiperkoleszterinémia szívizomra gyakorolt hatása	114
VI. Medvehagyma liofilizátum (WGLL) vizsgálata hiperkoleszterinemiában.....	115
VII. Az <i>Allium ursinum</i> liofilizátum (WGLL) hatásainak vizsgálata a PAH-ra.....	119
VIII. A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai	122
IX. A BGP-15 hatása különböző állatmodelleken	126
X. A miokardiális és vaszkuláris PDE9A enzim és az ateroszklerózis kapcsolata.....	131
Következtetések	136
Transzlációs szempontok és jövőbeli irányok.....	139
Köszönetnyilvánítás	141
Irodalomjegyzék.....	146
A disszertáció alapjául szolgáló közlemények.....	166
Tudományometriai adatok.....	168

juhasz .bela .1_180_24
Rövidítések jegyzéke

%MWT	medial wall thickness percentage	érfal vastagság százalékos értéke
5-LOX	5-lipoxygenase	5-lipoxigenáz
A	mitral inflow late velocity	mitrális beáramlás késői (pitvari) diasztolés sebessége
A'	late diastolic tissue Doppler velocity of the lateral mitral anulus	késői (pitvari) beáramlási csúcshullám szöveti elmozdulási sebesség
ACC	acetyl-CoA carboxylase	acetyl-CoA karboxiláz
ACE	angiotensin-converting enzyme	angiotenzin konvertáló enzim
ACEi	angiotensin-converting enzyme inhibitor	angiotenzin konvertáló enzim gátló
Ach	acetylcholine	acetyl-kolin
ACL	antioxidant capacity of lipid-soluble substances	lipidoldékony vegyületek antioxidáns kapacitása
ACW	antioxidant capacity of water-soluble substances	vízoldékony vegyületek antioxidáns kapacitása
ADP	adenosine diphosphate	adenozin-difoszfát
AF	aortic flow	aortakiáramlás
AFI	automatic functional imaging	automatikus funkcionális képalkotás
AFC	aberrant crypt foci	aberráns kripta fókusz
AGE	advanced glycation end-products	késői fehérje glikációs végtermékek
Akt	protein kinase B	protein kináz B
ALT	alanine transaminase	alanin-transzamináz
AMI	acute myocardial infarction	acut miokardiális infarktusz
AMPK	adenosine mono phosphate-activated protein kinase	adenozin-monofoszfát aktivált proteinkináz
ANOVA	analysis of variance	varianciaanalízis
ANP	atrial natriuretic peptide	pitvari nátriuretikus peptid
Ao	aortic root diameter	aortagyök átmérője
AoP	aortic pressure	aortanyomás
ApoA	apolipoprotein A	apolipoprotein A
ApoB	apolipoprotein B	apolipoprotein B
ApoB100	apolipoprotein B-100	apolipoprotein B-100

juhasz.bela.1_180_24

ARNI	angiotensin receptor-neprilysin inhibitor	angiotenzin receptor-neprilysin inhibitor
AST	aspartate transaminase	aszpartát-transzamináz
ATP	adenosine triphosphate	adenozin trifoszfát
Bad	Bcl-2-associated death promoter	Bcl-2-asszociált sejthalál promóter
BCA	bicinchonic acid	bicinkonin sav
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	B-sejtes limfóma 2 fehérje
BGP-15	O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl) nicotinic amidoxime	O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim
BMI	body mass index	testtömegindex
BNP	B-type natriuretic peptide	B-típusú nátriuretikus peptid
Br	bromelain	bromelain
BSA	bovine serum albumin	szarvasmarha szérum albumin
CAD	coronary artery disease	koszorúér betegség
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	ciklikus adenzin monofoszfát
CETP	cholesteryl ester transfer protein	koleszterin-észter transzfer protein
CF	coronary flow	koronária átáramlás
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	ciklikus guanozin monofoszfát
CHD	coronary heart disease	koronária betegség
CK	creatine kinase	kreatin kináz
CK-MB	creatine kinase myocardium band isoform	kreatin-kináz szívizom eredetű izoforma
CO	carbon monoxide	szén-monoxid
COX	cytochrome c oxydase	citokróm c oxidáz
COXIII	cytochrome c oxydase subunit III	citokróm c oxidáz III alegység
COXIV	cytochrome c oxydase subunit IV	citokróm c oxidáz IV alegység
CRP	C-reactive protein	C-reaktív protein
CV	cardiovascular	kardiovaszkuláris
DCM	diabetic cardiomyopathy	diabéteszes kardiomiopátia
DD	diastolic dysfunction	diasztolés diszfunkció
DecT	deceleration time	decelerációs idő
DFP	diisopropyl fluorophosphate	diisopropil-fluorofoszfát
DM	diabetes mellitus	diabétesz mellitusz
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid

juhasz.bela.1_180_24

dp/dt	the first derivative of developed pressure	bal kamrai nyomás első deriváltja
dp/dtmax	maximum rate of rise in intraventricular pressure	a dp/dt maximális értéke
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	5,5'-ditionitrobenzoesav
DTT	dithiothreitol	ditiotreitól
E	mitral inflow late velocity	mitrális beáramlás korai diasztolés sebessége
E/c	concentration-response curve	koncentráció-válasz görbe
E'	early diastolic tissue Doppler velocity of the lateral mitral annulus	korai beáramlási csúcshullám szöveti elmozdulási sebesség
EC ₅₀	half maximal effective concentration	félmaximális effektív koncentráció
ECL	enhanced chemiluminescence	felerősített kemilumineszcencia
ECLIA	sandwich electrochemiluminescence immunoassay	szendvics elektrolumineszcens immunoassay
ED	external diameter	külső átmérő
EDV	end-diastolic volume	végdiasztolés térfogat
EF	ejection fraction	ejekciós frakció
Ef	energy formula	energia formula
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatikus retikulum
ESC	European Society of Cardiology	Európai Kardiológiai Társaság
ESV	end-systolic volume	végszisztolés térfogat
ETA	endothelin A receptor	endothelin A receptor
ETB	endothelin B receptor	endothelin B receptor
EVG	Elastica van Gieson staining	Elastica van Gieson festés
FDA	Food and Drug Administration	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatala
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluoreszcein-izotiocianát
FOXO	forkhead box transcription factor/protein	forkhead box transzkripció faktor/protein
FS	fractional shortening	frakcionális rövidülés
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GLS	global longitudinal strain	globális longitudinális strain

juhasz.bela.1_180_24

GLUT	glucose transporter	glükóz transzporter
GLUT4	glucose transporter 4	glükóz transzporter 4
GotoK	Goto-Kakizaki	Goto-Kakizaki
GPx	glutathione peroxidase	glutation peroxidáz
GR	glutathione reductase	glutation reduktáz
GSH	reduced glutathione	redukált glutation
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 beta	glikogén szintáz kináz 3 béta
GSSG	oxidized glutathione	oxidált glutation
HbA1C	hemoglobin A1C	hemoglobin A1C
HC	hypercholesterolaemia control	hiperkoleszterinémias kontroll
HCT	hypercholesterolemic, sour cherry seed extract treated	hiperkoleszterinémias, meggy mag kivonattal kezelt
HDL	high-density lipoprotein	nagy sűrűségű lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin- etánszulfonsav
HF	heart failure	szívelégtelenség
HFD	high fat diet	zsírdús diéta
HFHSD	high-fat, high-sugar diet	magas zsír- és cukortartalmú diéta
HFpEF	heart failure with preserved ejection fraction	szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval
HFrEF	heart failure with reduced ejection fraction	szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval
HMG- CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A
HO-1	heme oxygenase 1	hemoxigenáz-1
HOMA-IR	homeostatic model assessment for insulin resistance	inzulin rezisztencia index
HPLC	high-pressure liquid chromatography	magas nyomású folyadékkromatográfia
HR	heart rate	szívfrekvencia
HRP	horseradish peroxidase	torma peroxidáz
HSP	heat shock protein	hősokk fehérje
I/R	ischemia/reperfusion	iszkémia/reperfúzió
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1	intracelluláris adhéziós molekula 1
IDL	intermediar-density lipoprotein	intermediar sűrűségű lipoprotein

juhasz.bela.1_180_24

IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor
IL-1 β	interleukin-1 beta	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6	interleukin-6
iNOS	inducible nitric oxide synthase	indukálható nitrogén szintáz
IRS-1	insulin receptor substrate 1	inzulin receptor szubsztrát 1
IVS	interventricular septum	interventrikuláris szeptum
IVSd	interventricular septum thickness in diastole	interventrikuláris szeptum átmérője diasztolében
IVSs	interventricular septum thickness in systole	interventrikuláris szeptum átmérője szisztolében
IVSTD	interventricular septum thickness in diastole	interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolé alatt
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun N-terminális kináz
KHB	Krebs-Henseleit bicarbonate buffer	Krebs-Henseleit bikarbonát puffer
LA	left atrium	bal pitvar
LAD	left descending coronary artery	bal elülső leszálló koronária
LAP	left atrial pressure	bal pitvari nyomás
LDH	lactate dehydrogenase	laktát dehidrogenáz
LDL	low-density lipoprotein	alacsony sűrűségű lipoprotein
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester	N(G)-nitro-L-arginin metil észter
Lp(a)	lipoprotein(a)	lipoprotein(a)
LV ET	left ventricle ejection time	bal kamrai ejekciós idő
LV	left ventricle	bal kamra
LVDP	left ventricular developed pressure	bal kamrai nyomás
LVEDD	end-diastolic left ventricular cavity size	bal kamra üreg nagysága a diasztolé végpontján
LVESD	end-systolic left ventricular cavity size	bal kamra üreg nagysága a szisztolé végpontján
LVIDd	left ventricular internal diameter at end-diastole	bal kamrai végdiasztolés átmérő
LVIDs	left ventricular internal diameter at end-systole	bal kamrai végszisztolés átmérő
LVMass	mass of left ventricle	bal kamrai szívizomtömeg

juhasz.bela.1_180_24

LVOT	maximal pressure gradient of left	bal kamrai kiáramlási traktus maximális
maxPG	ventricle outflow tract	nyomásgradiense
LVOT	mean pressure gradient of left ventricle	bal kamrai kiáramlási traktus átlagos
meanPG	outflow tract	nyomásgradiense
LVOT	maximal velocity of left ventricle	bal kamrai kiáramlási traktus maximális
Vmax	outflow tract	sebessége
LVOT	mean velocity of left ventricle outflow	bal kamrai kiáramlási traktus
Vmean	tract	átlagsebessége
LVOT	left ventricle outflow tract	bal kamrai kiáramlási traktus
LVPWd	end-diastolic left ventricle posterior	bal kamrai posterior fal vastagsága
	wall thickness	diasztolében
LXRa	liver X receptor-a	máj X receptor-a
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén aktivált protein kináz
MAPSE	mitral annular peak systolic excursion	mitrális anulus szisztolés csúcskitérése
MCT	monocrotaline	monokrotalin
MET	metformin	metformin
MetS	metabolic syndrome	metabolikus szindróma
mKH	modified Krebs-Henseleit buffer	módosított Krebs-Henseleit oldat
Mn-SOD	mangane-se-dependent superoxide	mangán szuperoxid-dizmutáz
	dismutase	
MyHC	myosin heavy chain	miozin nehéz lánc
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
	phosphate	
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	nem alkoholos zsírmáj
NE	norepinephrine	noradrenalin
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-	nukleáris faktor kappa B
	enhancer of activated B cells	
NIH	National Institutes of Health	Nemzeti Egészségügyi Intézet
NKK	niacin-bound chromium	niacin-kötött-króm
NO	nitric oxide	nitrogén-monoxid
NP	natriuretic peptide	nátriuretikus peptid
NPC1L1	Niemann–Pick C1-like protein 1	Niemann-Pick C1-szerű protein 1
NZW	New Zealand White rabbit	Új-Zélandi fehér nyúl
OCT	optimal cutting temperature	optimális vágási hőmérséklet
P38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase	p38 mitogén aktivált protein kináz

juhasz.bela.1_180_24

PAH	pulmonary arterial hypertension	pulmonális artériás hipertenzió
p-AMPK	phosphorylated AMP kinase	foszforilált AMP kináz
PAP	pulmonary artery pressure	pulmonális artériás nyomás
PARP-1	polyADP-ribose polymerase-1	polyADP-ribóz polimeráz-1
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	proprotein konvertáz szubtilizin/kexin 9
PDE	phosphodiesterase	foszfodiészteráz
PDE5	phosphodiesterase 5	5-ös típusú foszfodiészteráz
PDE5A	phosphodiesterase 5A	5A típusú foszfodiészteráz
PDE5I	phosphodiesterase 5 inhibitor	5-ös típusú foszfodiészteráz inhibitor
PDE9A	phosphodiesterase 9A	9A típusú foszfodiészteráz
pGC	particular guanyl cyclase	partikuláris guanilát cikláz
PGI ₂	prostacyclin	prosztaciklin
PKC	protein kinase C	protein kináz C
PKG	protein kinase G	protein kináz G
PLAX	parasternal long axis view	parasternalis hossz tengelyi metszet
PLB	phospholamban	foszfolambán
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor α
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ
pPLB	phospho(Ser16)-phospholamban	foszforilált foszfolambán
PSAX	parasternal short axis view	paraszternális rövid tengelyi metszet
pVASP	phospho(Ser239)-vasodilator-stimulated phosphoprotein	foszfo(Ser239)-vazodilatátor stimulált foszfoprotein
PW	Pulsed Wave	Doppler pulzushullám mód
PWTD	posterior wall thickness in diastole	hátsó fal vastagsága diasztolé alatt
RAGE	receptor for advanced glycation end products	késői fehérje glikációs végtermékek receptora
RHV	right ventricle hypertrophy	jobb kamrai hipertrófia
RNS	reactive nitrogen species	reaktív nitrogén gyökök

ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén gyökök
Rsvl	resveratrol	resveratrol
RT	reverse transcription	reverz transzkripció
RWT	relative wall thickness	relatív falvastagság
SEM	standard error of the mean	az átlag standard hibája
S'	systolic tissue Doppler velocity of the lateral mitral anulus	az anulus szöveti elmozdulási sebessége szisztolében
SCSE	sour cherry seed extract	meggy mag kivonat
SD*	Sprague-Dawley rat	Sprague-Dawley patkány
SD	standard deviation	szórás
SDS	sodium dodecyl sulfate	nátrium dodecil szulfát
SDS-	sodium dodecyl sulfate-	nátrium dodecil szulfát poliakrilamid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	gélelektroforézis
SERCA2a	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a	szarko/endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz 2a
sGC	soluble guanyl cyclase	szolubilis guanilát cikláz
SHR	spontaneously hypertensive rat	spontán hipertenzív patkány
SNP	single nucleotide polymorphism	egy pontos nukleotid-polimorfizmus
SOD	superoxide dismutase	szuperoxid-diszmutáz
SOD1	superoxide dismutase 1	szuperoxid-diszmutáz 1
SREBP	sterol-regulatory element-binding protein	szterol szabályozó elemet kötő fehérje
SRI	strain rate imaging	strain rate képalkotás
STZ	streptozotocin	streptozotocin
SV	stroke volume	pulzustérfogat
T1DM	type 1 diabetes mellitus	I-es típusú diabétesz
T2DM	type 2 diabetes mellitus	II-es típusú diabétesz
TAC	transverse aortic constriction	aorta részleges leköttése
TAPSE	tricuspidal annular peak systolic excursion	trikuspidális anulus szisztolés csúcskitérése
TBS	Tris-buffered saline	Tris-pufferelt sóoldat
TBS-T	Tris-buffered saline/Tween-20	Tris-pufferelt sóoldat/Tween-20
TC	total cholesterol	összkoleszterin
TDI	tissue Doppler imaging	szöveti Doppler képalkotás
TG	triglyceride	triglicerid

juhasz.bela.1_180_24

TNB2	2-nitro-5-thiobenzoate anion	2-nitro-5-tiobenzoát anion
TNF α	tumor necrosis factor alpha	tumor-nekrózis faktor α
TRITC	tetramethylrhodamine isothiocyanate	tetrametilrodamin-izotiocianát
Trx-1	thioredoxin-1	tioeredoxin-1
TTE	transthoracic echocardiography	transztorakális echokardiográfia
TVI	tissue velocity imaging	szöveti sebesség
TZD	thiazolidinedione	tiazolidéndion
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	vazodilatátor-stimulált foszfoprotein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	vaszkuláris sejt adhézios molekula 1
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VLDL	very low-density lipoprotein	nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein
WGLL	wild garlic liophylisate leaf	medvehagyma levél liofilizátum
WHO	World Health Organization	Egészségügyi Világszervezet

1999-ben az akkori Debreceni Orvostudományi Egyetem, Gyógyszerésztudományi Szakon, Dr. Tóth László a Gyógynövény és Drogismeret tantárgy szegedi vendégoktatója a TDK hallgatójává fogadott, és túlradó növény és állatszeretével egy teljesen más világot tárt elém, amelyet bevallom, akkoriban még csak külső szemlélőként figyeltem. A pályamunkám során sokkal erősebb volt az analitika iránti vonzódás, amit Dr. Dinya Zoltán Tanár Úr, mint társtémavezetőmnek a szakmával szemben támasztott alázatának köszönhettem. 2001-ben a végzésem után a Gyógyszerhatástan-Biofarmácia Tanszékre nyertem rezidensi felvételt, ahol Dr. Vecsernyés Miklós és Prof. Dr. Tósaki Árpád irányítása alatt a farmakológia és biofarmácia megtanulása játszotta legnagyobb szerepet az életemben. Már a PhD munkám során is a természetes anyagok, mint például a szőlő-kivonat, alpha-melanocyt-stimuláló hormon, meggymag-kivonatok vizsgálatát preferáltam a konzervatív farmakológiai molekulákkal szemben. Az izolált dolgozó szív állatmodell megismerésekor, mint kisgyermek, aki a betűtanulás előtt csodálkozva néz a felnőttekre, hogy hogyan tudják a mesekönyvek szövevényes betűit kiolvasni, meg voltam győződve, hogy itt egy olyan módszert fogok elsajátítani, amely egyedülálló és világszínvonalú, és utólag bevallhatom, hogy ezt nem is tanulhattam volna jobb tanítómesterektől. 2004-ben egy külföldi ösztöndíj elnyerésével az Egyesült Államokban, Connecticut államban, a Farmingtoni Egyetemen Prof. Dr. Nilanjana Maulik vezetésével a gyógynövények iránti csodálatom és tiszteletem csak fokozódott, mondhatni elmélyült. A farmingtoni kísérletes és molekuláris sebészeti laborban még több módszert sajátíthattam el, amiben kulcsfontosságú szerepet tulajdonítok Dr. Shigeaki Kaga, akkori japán szívsebész kollegámnak, akitől mérhetetlen precizitást, kitartást, munkafegyelmet, és alázatot tanultam úgymond japán módra. A természetes molekulák, gyógynövény-kivonatok, vitaminok, mint pl. a bromelain, niacin kötött króm, resveratrol stb. kapcsán végzett vizsgálatok tovább erősítették a táplálkozástudomány iránt érzett kötődésemet. Hazatérésem után még céltudatosabban kerestem a gyógynövénykivonatok és egyéb természetes anyagok kedvező terápiás lehetőségeit a különböző betegségekben, ezért a rutinszerűen alkalmazott kardiovaszkuláris állatmodelleket kibővítettem pulmonális artériás hipertónia (PAH), UV-indukálta fototoxicitás, iszkémia/reperfúzió indukálta, diabéteszes retinopátia, illetve demencia modellekkel. Az új módszerek beállításában nagy előrelépést hozott, hogy Papp Zoltán Professzor Úr és Tóth Attila Professzor Úr egy szoros kollaboráció kíséretében szabad bejárást biztosított intézetük legújabb és egyben legmodernebb szívultrahang készülékéhez. Az *in vivo* technika szinte hiánytalanul kiegészítette az általunk akkoriban rutinszerűen használt izolált szív módszert, amit Dr. Kertész Attila kardiológus akkori PhD hallgatóm, humán betegeken

gyűjtött ultrahangos jártasságát kiaknázva átültettük az egészséges és patológiás állatkísérletes modelljeinkre. A metodikai beállítások fejlődéséhez az is hozzátartozik, hogy 2010-ben egy Skóciában megrendezett konferencián Balla József Professzor Úrral több órás diszkurzust folytatva itthon tovább erősítettük az ateroszklerotikus modellünk fejlesztését. Ebben a vizsgálati irányvonalban kulcsfontosságú szerepet töltött be Balla György Professzor Úr is, aki hihetetlen tapasztalatával, odaadásával, kutatás imádatával és türelmével szélesítette szemléletemet. 2015-ben a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében Prof. Dr. Szilvássy Zoltán útmutatásával folytattam munkámat, aki mindamelllett, hogy teret engedett abban, hogy tovább bontogathassam szárnyaimat az experimentális farmakológia kutatásában, bevezetett a klinikai vizsgálatokba, ezzel egy olyan újabb szemléletet tárt elém, ami befolyásolta az egész életem további munkásságát. Hiszek abban, hogy a táplálkozástudományi ismeretek fejlődése számos betegség prevenciójában, vagy egy adott terápia kiegészítésében olyan szerepet tölthet be, amelynek során mind a saját, mind a betegeink életminősége szemmel láthatóan jobbá válhat.

Diszlipidémia és az ateroszklerózis

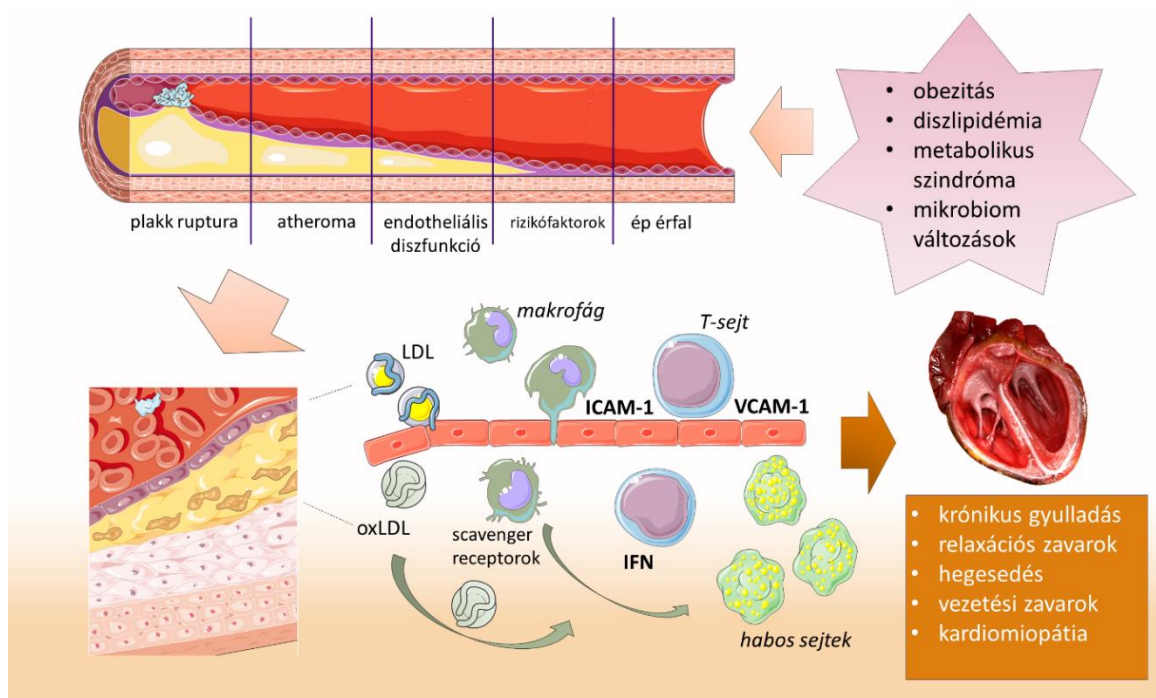
Az érlemezés az érfal krónikus gyulladós megbetegedése, amely a közepes - és nagy artériákat érinti [1]. Kialakulásában nagy szerepe van a magas LDL koleszterinszintnek, a magasvérnyomás betegségnek, a cukorbetegségnek és a dohányzásnak. Számos súlyos következménye van, úgymint stroke, koronária megbetegedés és perifériás artériás érbetegség [2]. Az érlemezés jelentősége nem elhanyagolható, hiszen a következményeként kialakuló stroke és iszkémiás szívbetegség a WHO statisztikája szerint világszerte a vezető halálokok egyike. [3]. Az érlemezés jelenségének leírása már a 15-16. századra visszanyúlik. Leonardo da Vinci az elsők között volt, aki leírta, hogy a „hártyák” megvastagodása a véráramlás akadályozottságát eredményezi idős egyéneknél. A 18. század második felében egy angol orvos, William Heberden írta le először az angina pectoris tüneteit, valamint azt a megfigyelést, hogy a mellkasi fájdalom nyugalomban megszűnik. Az ateroszklerotikus plakk ruptúráját először 1844-ben, Koppenhágában írták le, egy híres dán festő boncolása során, ahol megfigyelték, hogy a szív ereiben számos szklerotikus plakk található, melyek közül egyik a felszíne fekélyes volt és a belőle származó ateromatózus massa elzárta az ér lumenét. A 19. század végére két elmélet vált elfogadottá az érlemezés kialakulásának magyarázataként. Az egyik Carl von Rokitansky teóriája volt, miszerint az érfal belső rétegében kialakuló depozitumot főként fibrin és más vér alkotóelemek képezik. A fibrin és más vérben megtalálható fehérjék degradációja eredményezi az ateromatózus masszát, melyben koleszterin kristályok és zsírcseppek rakódnak le. A másik elmélet szülő atyja Rudolf Virchow volt, aki úgy vélte, hogy az ateróma egy gyulladós folyamat eredménye az intimán belül és a fibrózis elváltozás egy reaktív folyamat, mely a kötőszöveti sejtek proliferációja következtében alakul ki. Azt állította, hogy az endarteritisz egy reparációs folyamat része, amely egy mechanikus, irritatív stimulusra adott válasz. Virchow elmélete adta az alapját Russel Ross „sérülésre adott válasz” hipotézisének, miszerint az ateroszklerózis az endotélium lokális sérülése következtében alakul ki, melyet vérlemezkék adhéziója, aggregációja és felszabadulása követ [4]. A Virchow triász kifejezés az ő nevéhez fűződik. Az 1970-es évekig a lipidek szerepének tulajdonítottak nagy jelentőséget, amelyet az a klinikai megfigyelés alapult meg, hogy diszlipidémiás betegekben gyakoribb az érlemezés. A 70-es éveket követően került előtérbe a növekedési faktorok, simaizomsejtek proliferációjának és a gyulladásnak szerepe az ateroszklerózis etiológiájában. A tudomány jelenlegi állása szerint az ateroszklerózis egy tartósan fennálló alacsony szintű steril gyulladás eredménye, amelynek következtében kóros interakció alakul ki az érfalban található immunsejtek és a tunica media simaizomsejtjei között, valamint fibrózis szöveti

massza képződik [4]. Egészséges egyénekben az endotélium nem átjárható a vérben keringő immunsejtek számára. Állatkísérletekben kimutatták, hogy aterogén diéta hatására adhéziós molekulák (VCAM-1) jelennek meg az endoteliális sejteken, amelyek segítik a monociták és T-limfociták kitapadását és átjutását az subendoteliális térbe [5]. Emellett iniciáló tényező lehet az endotélium sérülése, rendellenes lipid-metabolizmus, gyulladáskeltő mediátorok jelenléte és a hemodinamikai károsodás, mely során áramlás-mediált gyulladással változások alakulhatnak ki az endotéliumban. Ez a folyamat az endoteliális sejtek aktivációjához vezet, melyet adhéziós molekulák (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) fokozott termelése követ [6]. Az adhéziós molekulák jelenléte lehetővé teszi a monociták érfalba történő vándorlását és szöveti makrofágokká alakulását. Az érfal fokozott átjárhatósága lehetővé teszi a koleszterin-tartalmú LDL partikulumok bejutását és következményes felhalmozódását az érfalban [7]. A felhalmozódás annál nagyobb mértékű, minél magasabb az LDL plazmakoncentrációja, ezáltal válik a hiperkoleszterinémia súlyos rizikófaktorrá. A natív LDL nem kötődik megfelelően a makrofágok scavenger receptoraihoz, az LDL lipoproteinek módosulása, oxidációja szükséges a felismeréshez és a habos sejtek képződéséhez. A gyulladással környezet, mint oxidatív stressz hozzájárul az LDL partikulumok oxidációjához, melyek így felismerhetővé válnak a makrofágok számára és létrejön a fagocitózis. Az oxidált LDL bekebelezése vezet az aterómára jellemző, koleszterin tartalmú habos sejtek kialakulásához [8]. Az oxidált LDL bekebelezése a fagociták aktivációjához vezet, melyek gyulladáskeltő citokineket kezdenek termelni [9]. A habos sejtek felhalmozódása alkotja a zsíros csíkot (fatty streak), kis mennyiségű limfocita és simaizomsejt kíséretében. Az ateroszklerotikus plakk érése során a felhalmozódott habos sejtek folyamatos pusztulása is megfigyelhető. Az apoptotikus sejtek és a belőlük kiszabaduló magas zsírtartalmú massza alkotja a plakk nekrotikus magját [1]. Az oxidált LDL felhalmozódása stimulálja az endoteliális sejtek gyulladáskeltő aktivitását, ezáltal növekedési faktorokat, citokineket és makrofág kolónia stimuláló faktort kezdenek termelni [8]. Az aktivált makrofágok és endotél sejtek által termelt citokinek és növekedési faktorok fokozzák a simaizom proliferációt és az extracelluláris mátrix expanzióját. Ez a gyulladással fibroproliferatív válasz eredményezi a fibrózis sapka kialakulását [10]. A fibrózis sapka felépítését és a plakk stabilitását a gyulladás aktivitása határozza meg. Az instabil plakk esetén a szélső, laterális részén gyakran egy gyulladással sejtekben gazdag populáció figyelhető meg, mely proteolitikus enzimeket termel (pl. mátrix metalloproteinázok) ezáltal degradálva a kollagén rostokat. A folyamat következtében a fibrózis réteg meggyengül és plakk ruptura következhet be [6]. A stabil plakkot ezzel szemben vastag fibrózis sapka, kevés lipid és gyulladással sejt jellemzi. Habár az érlemezés egyik legfontosabb rizikófaktora az elhízás ma már pandémiának számít és 1975 óta a prevalenciája megháromszorozódott a WHO adatai

szerint [11], mégis a kardiovaszkuláris halálozás drámaian csökkent a fejlett országokban a középkorú lakosság körében, melynek egyik oka a rizikófaktorok hatékony kezelése [2]. A diszlipidémia kezelésében a statinok térhódítása továbbra is töretlen, mivel hatékonyan csökkentik a szív-érrendszeri rizikót (1. ábra). Számos nagy randomizált vizsgálat kimutatta, hogy a tartós statin terápia csökkenti a kardiovaszkuláris mortalitást, valamint a szívinfarktus incidenciáját [12]. Ezen felül kimutatták, hogy a statinok gyulladáscsökkentő hatással is rendelkeznek, ezáltal is javítva az érlemezés kimenetelét [5]. A statinok a HMG-CoA reduktáz enzim inhibíciójával gátolják a HMG-CoA mevalonáttá alakulását, ami a koleszterinszintézis sebességmeghatározó lépése. A statinok hatékonysága megkérdőjelezhetetlen, azonban egy év terápia után sokan „elfelejtik” szedni a gyógyszert, amelynek egyik okaként az izomfájdalmakat nevezik meg a betegek. Egy másik gyógyszercsoport a fibrátok a PPAR α sejtmag receptorok agonistái, és jótékonyak ún. kevert diszlipidémiában, amikor az LDL és a triglicerid szint egyaránt emelkedett. Általában statinnal kombinációban alkalmazzák őket, azonban együttes adásával megnő a gyógyszerinterakciók valószínűsége [9]. Emellett kimutatták, hogy a fibrátok alkalmazása nem csökkenti a szív-érrendszeri halálozást [7]. A niacin hatékonyan csökkenti az LDL és a Lp(a) szintet, valamint növeli a HDL termelődését, ezáltal fokozva a reverz koleszterin transzportot. Előnyös hatásai ellenére a statinokkal való együttes alkalmazás nem bizonyult hatékonynak, egy nagy klinikai kutatás szerint nem csökkent a CV mortalitás és súlyos mellékhatások jelentkeztek. Terápiás célpont lehet a koleszterin-felszívódás gátlása, a NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like protein 1) transzportfehérje gátlásán keresztül fejt ki hatását az ezetimib, amely statinokkal kombinálva alkalmazható elégtelen terápiás válasz esetén. Ezentúl abszorpciót gátló gyógyszercsoport az epesavkötő gyanták, melyek szekvesztrálják a koleszterin tartalmú epesavakat és gátolják azok felszívódását a bélben. Hatékonyan csökkentik a szérum LDL szintjét, azonban trigliceridszint emelkedést okoznak. [9]. Az elmúlt 10 évben több új koleszterincsökkentő gyógyszer is bevezetésre került, amelyek hatékonyan alkalmazhatóak a familiáris hiperkoleszterinémia terápiajában. A mikroszómális triglicerid transzfer protein gátlásával a lomitapid csökkenti a kilomikron és VLDL partikulumok összeszerelődését, ezáltal hatékonyan csökkenti az LDL szintet [13]. A mipomersen egy antisense oligonukleotid, amely az LDL legfőbb apoproteinjének, az apoB100-nak a keletkezését gátolja azáltal, hogy az mRNS-éhez kötődve annak degradációját idézi elő. A PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) gátlók monoklonális antitestek, amelyek megakadályozzák a LDL receptorok lebomlását, ezáltal fokozva a sejtek LDL felvételét, így jelentősen csökkentik a plazma LDL szintet [14].

A gyógyszeres kezelés mellett kiemelt szerepe van az egészséges életmódnak. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a testsúly normalizálásával, rendszeres testmozgással és a telített

zsírsavbevitel csökkentésével jelentősen redukálható a plazma LDL szint [12]. Emellett az életmód megváltoztatása (testmozgás, fogyás, megfelelő étrend) jelentősen csökkentette a triglicerid szintjét is [7]. Összefüggést találtak a bél mikrobiom és a szív-érrendszeri rizikó között. A nyugati diéta, amely gazdag cukrokban, koleszterinben és egyéb telített zsírsavakban fokozza a gyulladós folyamatokat a szervezetben. A telített zsírsavak bevétele megnöveli az endotoxin aktivitást a plazmában, valamint megváltoztatja a mikrobiom összetételét a bélben és/vagy fokozza a mikroorganizmusok transzlokációját a bél barrieren keresztül. Ezen változások indirekt módon, krónikus metabolikus diszfunkció létrehozásával járulhatnak hozzá az egészségtelen étrend aterogén hatásához [15]. Nagy populációban végzett vizsgálatok bizonyították, hogy a 2-es típusú diabétesz hozzávetőlegesen kétszeresére emelte a kardiovaszkuláris rizikót. Ennek egyik oka, hogy diabétesz gyakran társul metabolikus szindrómához, ezáltal az érlemezésnek több rizikófaktora is teljesül egyszerre. Csökken a szervezetben a sejtek VLDL, IDL és LDL felvétele, ezért ezek az apolipoproteinek tovább maradnak a véráramban. Leírták, hogy az LDL képződése szorosan összefügg az inzulin rezisztenciával és hipertrigliceridémiával, melynek szintje korrelál a kardiovaszkuláris rizikóval [16]. A megfelelő glikémiás kontroll elérésével mérsékelhető a hipertrigliceridémia, habár a szoros glikémiás kontroll önmagában nem elegendő a szív-érrendszeri rizikó csökkentésére, ezért lipid-csökkentő kezeléssel kell kombinálni [17]. Ezzel szemben a magasvérnyomás-betegség adekvát kezelése hatékonyan csökkenti a mortalitást. Kimutatták, hogy a szisztolés vérnyomás 5 Hgmm-rel történő csökkenése 14%-kal mérsékelte a cerebrovaszkuláris, és 9%-kal a kardiovaszkuláris halálozást [18].



1. ábra. Az ateroszklerózis okai és következményei

A diszlipidémia prevalenciája világszerte magas és egyre több beteg fordul a gyógyszeres terápia helyett alternatív gyógymódokhoz. A magas rost tartalmú étrend terápiás hatása már régóta ismert. Az étkezéssel bevitt rostok koleszterinhez és epesavakhoz kötődve gátolják azok felszívódását és növelik széklettel történő ürülésüket. A rostok bélbaktériumok általi fermentációjával rövid láncú zsírsavak képződnek, melyeknek jótékony hatásuk van a lipid metabolizmusra. Számos tanulmány igazolta, hogy a rostokban gazdag étrend, amely legalább 10 g oldható rostot tartalmaz, hatékonyan csökkenti az LDL koleszterin szintjét a plazmában. A konzervatív terápián túl, a halolaj alkalmazása jótékony hatású. Gazdag többszörösen telítetlen omega-3 zsírsavakban, dokozaheptaénsavban és eikozapentaénsavban, melyek hatékony triglicerid-csökkentő vegyületek. Javasolt napi dózisa 2-4 g. Hatásuk több mechanizmussal is megvalósul, mint például PPAR agonistaként fokozzák azon gének kifejeződését, melyek a zsírsav oxidációban vesznek részt és csökkentik a máj VLDL termelését. Fokozzák továbbá a lipoprotein-lipáz aktivitását, így tovább csökkentve a triglicerid plazmaszintjét [19], ezentúl pedig gátolják a monociták érfalba történő migrációját. Az allicin a fokhagymában előforduló szulfát-tartalmú vegyület, amely számos jótékony hatással rendelkezik. Az allicin a fokhagyma feldolgozását követően gyorsan lebomlik poliszulfidokká, melyek képesek H₂S donorként funkcionálni. H₂S donorokkal történő kezelés hatására számos gyulladáskeltő citokin (IL-1 β , IL-6, and TNF α) csökkent termelődését figyelték meg, illetve hatásaiban bizonyos TRP receptorok aktivációja is szerepet játszhat, amely felelős lehet az allicin anti-aterogén és gyulladáscsökkentő hatásáért. A zöldtea flavonja a katekin metaanalízisek alapján szintén jelentős koleszterin-csökkentő hatással rendelkezik. Legfontosabb képviselője a csoportnak az epigallokatekin-gallát. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok is kimutatták, hogy képes mérsékelni az LDL oxidációját, ami magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a zöldtea jelentősen csökkenti a CV mortalitást. Hasonlóan jótékony hatással rendelkezik a berberin, egy természetes alkaloid, amely a borbolyában található és gátolja a PCSK9 fehérjét, ezáltal csökkenti az LDL receptorok lebontását, inzulin érzékenyítő hatása van, valamint antihipertenzív és antiaritmiás hatással is rendelkezik [20]. Egy 2013-as metaanalízis kimutatta, hogy napi 0,6-1,5 g berberin fogyasztása szignifikánsan csökkentette a plazma LDL és triglicerid szintjét és jelentősen emelte a HDL szintet [19]. A berberinhez hasonlóan hat a lipid- és vércukorszintre a görögszéna. A diosgenin fokozza a koleszterin kiürülését a szervezetből, mérsékli az endoteliális diszfunkciót, gyulladáscsökkentő, inzulin érzékenyítő hatású, valamint csökkenti az oxidatív stresszt, ezáltal csökkentve a CV rizikót, gátolja a szérumban az LDL oxidációt és csökkenti a homocisztein szintet [21]. A görögszéna farmakológiai hatásai egy későbbi alfejezetben részletesen kifejtésre kerülnek. A legtöbb funkcionális élelmiszer csupán kis mértékben képes javítani a lipid profilt, azonban a

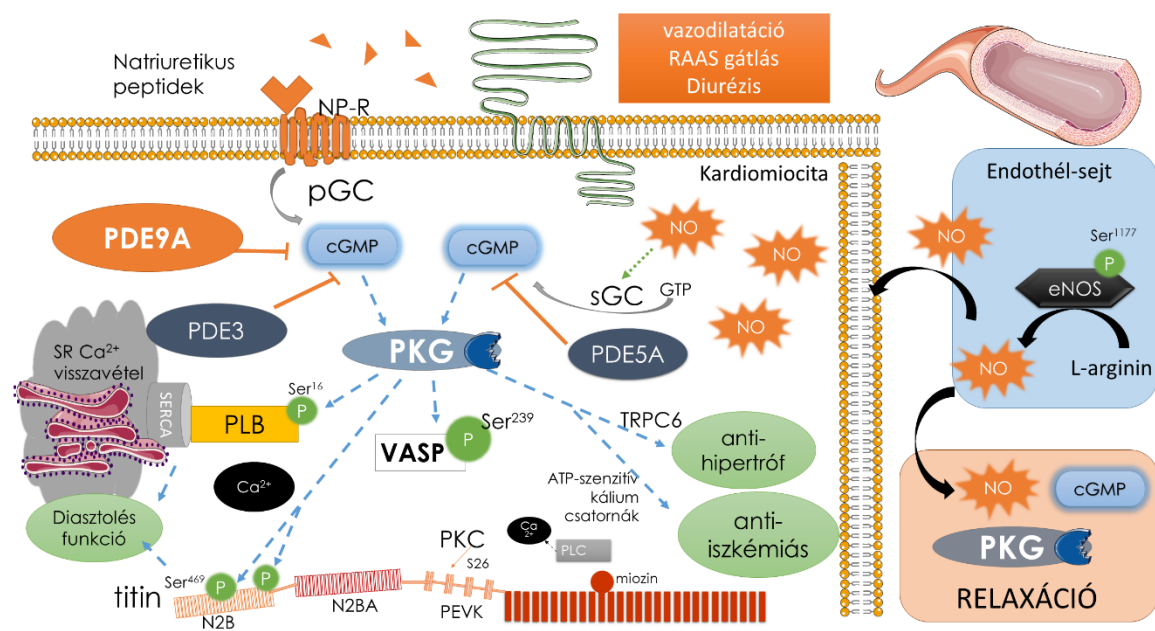
gyógyszeres terápia kiegészítéseként történő alkalmazásukkal hatékonyabb koleszterin és triglicerid szint csökkentés érhető el [19].

A miokardiális és vaszkuláris PDE9A upregulálódik az ateroszklerózis eredetű szív- és érrendszeri betegségekben

A nitrogén-monoxid (NO) – ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) – Protein Kináz G (PKG) útvonal fontos szerepet tölt be a szív működés szabályozásában, hiszen egyfelől célpontjai kardioprotektív folyamatokban vesznek részt, másfelől a titin óriásfehérjén keresztül a szívizom relaxációját is szabályozza [22-24]. Kimondható, hogy az útvonal downregulációja nagy valószínűséggel felelős a diasztolés diszfunkció (DD) kialakulásáért, amely a diasztolés szívelégtelenség (HF megtartott ejekciós frakcióval, HFpEF) prekuzora, valamint szisztolés szívelégtelenségben is karakterisztikus eltérés (HF csökkent ejekciós frakcióval, HFrEF) [25, 26]. A koszorúerek mikrovaszkulaturájában megjelenő, ateroszklerózissal társuló endoteliális gyulladás és a megnövekedett oxidatív stressz csökkenti az NO-biohasznosulását és károsítja a PKG útvonalat, melynek eredményeképpen fokozódik a miokardium merevsége és a gyulladás következtében fennálló miofibroblaszt proliferáció intersticiális fibrózist okoz [22]. A kulcs hírvivő molekula, a cGMP képződését fokozhatja a (1) NO által aktivált szolubilis guanilát-cikláz (sGC), illetve a (2) partikuláris guanilát-cikláz (pGC) enzim, a nátriuretikus peptid útvonalon [27]. A B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) expressziójának csökkenése számos tényező következménye lehet (obezitás, inzulinrezisztencia), eredményeként pedig visszaesés következik be a cGMP koncentrációjában [28-30]. A falfeszülés hatására a BNP termelődése fokozódik. A foszfodiészteráz (PDE) enzimek fokozott aktivitása szintén szerepet játszhat a cGMP szint csökkenésében, hiszen ezek a fehérjék bontják le a ciklikus AMP-t (cAMP) és cGMP-t 5'AMP illetve 5'GMP-re. Egy nemrégiben készült tanulmány igazolta, hogy a 9A típusú foszfodiészteráz (PDE9A) csak a nátriuretikus útvonalon képződő cGMP metabolizálásáért felelős [31]. PDE9A total knockout egerekkel végzett tanulmányban nyomástúlterhelést követően kimutatták, hogy diasztolés szívelégtelenség kialakulásához vezet a nátriuretikus peptidek (NP-ek) alacsony szintje, vagy a NP útvonalból származó cGMP PDE9A általi lebontása [31]. Ezen útvonal befolyásolása újabb irányba kalauzolhatja a gyógyszerkutatást – azaz a cGMP szint növelése a PDE9A farmakológiai szerekkel történő gátlása révén új terápiás vonulatokat hozhat (2. ábra). Az elmúlt években ezt a hipotézist az a tény is bizonyította, hogy a neprilizin (amely a NP-k lebontását végzi) gátlásával úgyszintén ígéretes eredményeket értek el klinikai vizsgálatokban [32]. Azonban fontos megemlítenünk, hogy nem mindegy, hogy lokális, vagy szisztémás hatásmechanizmust tudunk kifejteni. A NEP

gátlás a NEP receptorral rendelkező sejteken hat, a szisztémás PDE gátlás mindenütt kifejti hatását.

A szív- és érrendszeri betegségek vizsgálata esetén a nyúl modellek ötvözik a kis és nagy állatmodellek előnyeit: fenntartásuk viszonylag költséghatékony, viszont a szív működésük (beleértve a Ca-homeosztázist, az ioncsatornákat és az aktin-miozin struktúrát) hasonló a humánhoz [33-37]. Ráadásul, mivel extrém érzékenyek az aterogén diétára és a lipoprotein profiljuk is hasonló az emberéhez, ezért a nyúl modellek sikeresen alkalmazhatóak kardiovaszkuláris kutatások esetén [38] pl. ateroszklerotikus plakk létrehozására.



2. ábra. A PKG útvonal és a diasztolés funkció kapcsolata.

Statinok és a resveratrol

Előző fejezetünkben már tárgyaltuk, hogy az újabb vizsgálatok szerint csökkentett LDL és koleszterin értékek alacsonyabb CHD rizikót eredményeznek [39]. A HMG-CoA redukáz gátlók (statinok) bizonyultak az egyik leghatásosabb koleszterinszint csökkentőnek, a PCSK9 inhibitorok mellett, mely hatásukkal gátolják az ateroszklerózis kialakulását, csökkentve a CHD incidenciáját. A koleszterinszint csökkentő hatás mellett, a statinok segítenek megőrizni az endotélium relaxációját, mely jótékony kardiális és antihipertenzív hatásokat eredményez [40]. A statinok normál koleszterinszint mellett, patkányokban védelmet nyújtanak az iszkémiás/reperfúziós miokardiumnak, endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) függő útvonalon keresztül [41]. Ugyanakkor hiperkoleszterinémiás betegeknek monoterápiában alkalmazott statinok kevésbé bizonyultak hatékonyak CHD megelőzésében. Így kutatásunk

ezen részének „Szent Grálja” egy racionálisan egyesített terápia tervezése, mely több mechanizmussal is csökkenti a koleszterinszintet, csökkentve a CHD kialakulását. A resveratrol egy polifenolos, természetes fitoalexin, többek között antioxidáns, trombocitagátló, angiogenezist fokozó, illetve gyulladásgátló hatással [42] rendelkező, a természetben előforduló vegyületünk. A resveratrol koronária artériákra gyakorolt jótékony hatásai valószínűleg a korai ateroszklerotikus léziók progressziójának lassításából erednek. A korábbi eredményeinkben beszámoltunk a resveratrol oxidatív stressz csökkentő, illetve az indukálható nitrogén szintáz (iNOS) mRNS expresszióját fokozó hatásáról, mely a kardiomiociták apoptózisának csökkenéséhez vezet.

A resveratrol (transz-3,5,4'-trihidroxistilbén) egy polifenolos, természetes fitoalexin, a vörösborban található hatóanyag [43]. Korábbi vizsgálatainkban mind a vörösbor kivonat, mind a resveratrol csökkentette az oxidatív stresszt, fokozta az indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) mRNS expresszióját, melyek a kardiomiociták apoptózisának és az infarktus méretének csökkenéséhez vezettek. Patkány miokardiális infarktus modellen bemutatták a resveratrol angiogenezist fokozó hatását, mely a VEGF, iNOS és eNOS expresszió upregulációján keresztül, jelentős kardioprotekciót eredményez, csökkentve az infarktus méretét és növelve a kapilláris denzitását [44]. A resveratrol jótékony hatásait az endotélsejtekben [45], a vesében [46] és szívben [47] a nitrogén monoxid (NO) termelődés fokozásával fejtheti ki. Giovannini és társai [46] illetve Naderali és társai [48] eredményei alapján a resveratrol antiiszkémiás hatásának legfontosabb faktora az NO upregulációja. A legtöbb resveratrollal összefüggő biológiai védőhatás „intrinsic radical scavenging” tulajdonságokhoz kapcsolódtak. Mivel a diabéteszes hiperglikémia által indukált oxidatív stressz kardiovaszkuláris szövődményekhez vezet [49], így a redox jelátviteli folyamatok változtatása összefügghet a resveratrol-mediált kardioprotekcióval.

A tioredoxinok az egyik legnagyobb celluláris fehérje diszulfid reduktázok, melyek az emlős szervezet minden szövetében, köztük a szívben is jelen vannak. Ditiol/diszulfid aktivitással rendelkeznek, több enzimnek, köztük a tioredoxin-peroxidázoknak és a ribonukleotid reduktázoknak, elektrononorként szolgálnak [50]. A tioredoxinok a tiol-redox szabályozáson keresztül fontos redox regulátorok a fehérjefunkciókban és jelátviteli folyamatokban. A tioredoxin a tioredoxin-reduktáz hatására redukálódik, a folyamathoz szükséges elektronokat a NADPH biztosítja. A hemoxigenáz-1 (HO-1) a szervezet több sejtjében is kifejeződik, transzkripcióját számos pre-oxidáns vegyület, így a hem, nehézfémek, oxidált LDL, proinflammatorikus citokinek, ROS aktiválja [51-53]. A HO-1 katalizálja a hem szén-monoxid (CO) átalakulást, illetve a biliverdint, mely további lépésekben bilirubinná redukálódik [54]. A CO gyulladásgátló és antiapoptotikus [55], a bilirubin pedig antioxidáns hatásokkal rendelkezik

[56]. Emellett akut iszkémia/reperfúzió patkány modellen az adenovírussal bejutatott HO-1 gén akut miokardiális védelmet hozott létre [57].

Bromelain (Br)

A gyógyszeres prekondicionálás kiemelkedő szerepet játszik az I/R során bekövetkező szövetkárosodás mérséklésében. A bromelain (Br), mely tulajdonképpen az *Ananas comosus*, a természetű ananász szárából kinyert szulfhidril proteolitikus enzimek összefoglaló neve [58, 59]. A Br különböző cisztein proteolitikus frakciókból áll, melyek mérete 15 és 27 kDa között mozog, és rendszerint por formában adják zselatin, vagy bélben oldódó bevonatos kapszula formájában. Beszámolók szerint a Br szájon át adva gátolja a trombusképződést lézeres trombózis modellben, valamint *in vitro* és *in vivo* körülmények között csökkenti a humán vérlemezkék aggregációját [60]. Rutinnal és tripszinnel kombinálva nyúl hátsó láb I/R modellben a Br hatékonyan gátolta a reperfúzió során jelentkező vérátáramlás-csökkenést, ezáltal hozzájárult a vázizom védelméhez [61]. Egyéb vizsgálatok leírták, hogy a Br mérsékli az anginát [60], antihipertenzív hatású [62], továbbá káliummal és orotáttal együtt adva csökkenti az infarktus kockázatát [63]. Bár tudományos eredmények feltételezik a Br protektív szerepét I/R károsodással szemben, ennek mechanizmusa nem ismert. Ezért jelen tanulmány célja az volt, hogy megvizsgáljuk a Br előkezelés hatásait patkány *ex vivo* szív modellen. Továbbá ismeretes, hogy a túlélési kinázok upregulációja negatívan befolyásolja az apoptózis folyamatát. Főleg a szerin/treonin kináz Akt enzimeről ismeretes, az endotélben és szívizomsejtekben antiapoptotikus szignál aktivál [64]. Beszámolók alapján úgy tűnik, hogy a foszfo (p)-Akt célpontjai a sejtmagban találhatóak [65]. Az Akt számos célmolekula aktivitását szabályozza, mint például a proapoptotikus Bad fehérjét, a kaszpáz-9-et, és a forkhead box transzkripciós faktor/protein (FOXO) család tagjait, mint a FOXO1, FOXO3A és FOXO4 [66, 67]. A FOXO-k gátolják a Fas ligandokat és a Bcl-2 család tagjait, mint például a Bim fehérjét. Az Akt-dependens foszforiláció a forkhead transzkripciós faktorok gátlásához, és így a proapoptotikus szignál csökkenéséhez vezet [64].

Niacinhoz kötött króm-komplex alapú Energia formula (Ef)

Bár számos gyógyszer van használatban a miokardiális iszkémia kezelésére, bizonyos, élelmiszerekben előforduló hatóanyagok szintén szerephez juthatnak a terápiában. Néhány ilyen, mint például a niacinhoz kötött króm komplexet, D-ribózt, standardizált álombogyó kivonatot (5% witanolid tartalommal) és bizonyos aminosavakat egy egyedi energia formulába (EF; InterHealth Nutraceuticals, Benecia, CA) állítottunk össze, mely jelen kutatás tárgyát

képezi. Jelentős számú *in vitro*, állatkísérletes és humán klinikai vizsgálat bizonyította, hogy a niacin-kötött króm biológiai és farmakológiai szempontból biztonságos vegyület, mely ugyanakkor javítja a kardiovaszkuláris funkciókat, elősegíti a fogyást, állatban és emberben is megelőzi a diabétesz kialakulását azáltal, hogy serkenti az inzulin hatásait, valamint befolyásolja a fehérje, zsír és szénhidrát anyagcserét [68]. A *Withania somnifera* (ashwagandha), álombogyó vagy indiai ginzeng) növényt az ájurvéda, a hagyományos indiai orvoslás széles körben alkalmazza. Kísérletes bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a *Withania somnifera* befolyásolja a lipid peroxidatív végtermékeit, mint például a malondialdehid, az endogén antioxidásokat, úgy mint a glutation, vagy az antioxidáns enzimeket, mint a szuperoxid-diszmutáz, kataláz vagy a glutation-peroxidáz [69]. A pentóz cukor ribóz képes növelni a *de novo* adenin nukleotid szintézist azáltal, hogy áthidalja az oxidatív pentóz-foszfát útvonal sebességhatározó lépését, és ezáltal emeli a foszfo-ribozil pirofoszfát szinteket, amely az ATP szintézist serkenti [70]. A trikarbonsav ciklus komponenseinek zsírsavak helyett aminosavakkal való feltöltése növeli az ATP termelést, mely jótékony hatású a sejt anyagcseréje szempontjából. Ezen felül az esszenciális aminosavak táplálékkiegészítőként fogyasztva védik a szívet az iszkémia/reperfúzió okozta károsodástól, és csökkentik mind az infarktusz terület nagyságát, mind az apoptotikus sejthalál mértékét [71]. A niacinhoz kötött krómot, D-ribózt, ashwagandha-t és különböző aminosavakat tartalmazó Ef-t energiatermelésre, zsírbontásra, valamint nitrogén-monoxid és számos klinikailag fontos stressz fehérje indukciójára javasolják.

Görögszéna (*Trigonella foenum-graecum*)

A pillangósvirágúak közé tartozó görögszéna (*Trigonella foenum-graecum*) a legrégebben alkalmazott gyógynövények közé tartozik, melyet ókori egyiptomi szövegek és Hippokratész is említenek [72]. A tradicionális indiai ájurvéda orvoslásban emésztéssegítő szerként, az ősi Egyiptomban illatszerként, valamint a mumifikálás folyamatában alkalmazták, a Római Birodalomban pedig szülő nőknek segített a vajúdas és szülés során [73, 74]. A tradicionális kínai gyógyászatban is ismert növény fájdalomcsillapító és veseműködést elősegítő hatásait egy Kr. u. 1060-ra datálható orvosi szövegben is említik. A népi gyógyászatban alkalmazták még a gyenge szervezet felerősítésére, impotencia, kopaszodás ellen, menstruációs panaszok esetén, a tejelválasztás serkentésére, valamint köszvényben.

Hazánkban a görögszénáról az első írásos emlékek a Pannonhalmi Főapátságban, Hortobágyi Tamás Cirill főapát kutatásai alapján nemrég kerültek elő, mely szerint az apátság gyógynövénykertjében már ezer évvel ezelőtt is termesztették. Diószegi Sámuel és Fazekas Mihály az 1807-ben megjelent Magyar Fűvészkönyvben is említi, de csak, mint vadon

előforduló növény. A növény kiskerti termesztésére vonatkozó első kísérletek 1945-ben kezdődtek meg, melyek hamarosan abba is maradtak. Később a 60-as években gyógyszeripari megrendelésre, diosgenin előállítására különböző fajtákkal kísérleteztek, de az üzemi termesztés megvalósítása a termesztéstechnológia hiányosságai miatt nem történt meg [75]. 1982-ben Mosonmagyaróváron Dr. Makai Sándor és munkatársai kidolgozták a görögszéna új termesztéstechnológiáját, ennek eredményeként az Óvári-4 fajta állami minősítést és szabadalmat is kapott [76].

A gyógyászatban elsősorban a görögszéna növény magját használják, mely Európában bejegyzett növényi droggént szerepel. A mag tömegének körülbelül felét szolubilis galaktomannán (30%) és vízben oldhatatlan rostok (20%) teszik ki. Nagy mennyiségben tartalmaz bioaktív hatóanyagokat: legfontosabb alkaloidja a trigonellin, szaponinjai közül a diosgenin és yamogenin a legkiemelkedőbbek, aminosavszármazékokat tekintve a 4-hidroxi-izoleucin jelentős [77-80], de több, mint ötvenre tehető azon vegyületeinek száma, melyek antidiabetikus potenciállal rendelkezhetnek [81]. A görögszéna mag nagyszámú biológiailag aktív hatóanyaga lehet az oka annak, hogy a gyógyászat számos területén tudományosan igazolt hatással rendelkezik: beszámoltak antioxidáns, gyulladásgátló, antifungális, antidiabetikus és tumorelles hatásáról, de befolyással van az elhízásra, diszlipidémiára, és a nemi hormonok működésére is [82]. A görögszéna gyógyhatásairól az utóbbi évtizedekben számos klinikai és állatkísérletes tanulmány készült. Nyolc hetes patkány metabolikus szindróma (MetS) modellben a görögszéna csökkentette a triglicerid, koleszterin és az LDL plazmaszintjét, míg a HDL a nagyobb dózis (200 mg/kg) hatására szignifikánsan megemelkedett [83]. A görögszéna magok vizes kivonata patkányban csökkentette a zsírok emésztését és felszívódását [84], elhízott egerekben a görögszéna és hatóanyaga, a 4-hidroxi-izoleucin csökkenti a triglicerid szintet és a súlygyarapodás ütemét [85]. 39 túlsúlyos egyénen végzett randomizált vizsgálat során a 6 hetes görögszéna mag kivonat jelentős mértékben csökkentette az energiabevitelt, illetve az elfogyasztott zsír mennyiségét a napi kalóriabevitel arányában [86]. A *Trigonella* koszorúérbetegségben szenvedő páciensekben jelentősen csökkentette a vér lipid-, koleszterin- és trigliceridszintjeit, de a HDL-koleszterin szintet nem befolyásolta [87]. Gong és munkatársai klinikai vizsgálatokból készített metaanalízise szerint a görögszéna a triglicerid és a totál koleszterin szinteket kedvezően befolyásolja, de a HDL és LDL szintje nem változik [88]. Egy újabb metaanalízis a HDL szint emelkedéséről, illetve az LDL csökkenéséről számol be [89]. Valószínű, hogy a lipid- és koleszterinszint-csökkentő hatásért a magban található szteroidok, főként a diosgenin felelős, mely *in vitro* körülmények között a triglicerid felvételt is gátolja [90, 91]. A görögszéna mag, illetve annak kivonata eredményesen csökkenti a hiperglikémiát és a cukorbetegséggel összefüggő paramétereket STZ és alloxan diabétesz állatmodellekben [82].

Vijaykumar és munkatársai már 5 napos kezelés során a hiperglikémia és hiperinzulinémia jelentős javulásáról számoltak be cukorbeteg egerekben [92]. A görögszéna mag vizes kivonata hatékonyan fokozta a veseműködést és mérsékelte a diabetikus nefropátia tüneteit patkányokban [93]. Kettes típusú diabéteszben (T2DM) szenvedő betegekben a görögszéna már 1 hét alatt csökkentette az éhgyomri vércukorszintet és a HbA1C értékét [94]. Egy másik, cukorbetegeken végzett 8 hetes vizsgálatban a HOMA-IR jelentős csökkenését találták [95]. Nagyobb számú klinikai vizsgálatok alapján készített metaanalízisek szintén arról számolnak be, hogy a krónikus görögszéna kezelés javítja az éhgyomri vércukorszintet, a HbA1C-t és a glükózterhelés után 2 órával mért vércukorszint értékét [88, 96, 97]. Kétségtelen, hogy a hatás hátterében a görögszéna antioxidáns aktivitása [98], illetve a 4-hidroxi-izoleucin állhat [99], és az is igazolást nyert, hogy a mag javítja az inzulinérzékenységet [100], elősegíti a β -sejtek megújulását és az inzulin elválasztást [101]. A görögszéna mag magas rosttartalma szintén hozzájárul az antidiabetikus hatáshoz a gyomorürülés lassítása, illetve a zsír- és cukorfelszívás gátlása révén [102, 103]. A metabolikus szindrómában gyakori hipertóniával kapcsolatban is születtek már ígéretes állatkísérletes eredmények. Kumar és munkatársai a görögszéna mag vizes kivonatával zsírdús diétán tartott patkányokban 3 hetes kezelés után a vérnyomást a kontroll csoport értékeivel összevethető szintre csökkentette [84]. A görögszéna antioxidáns hatásáról is számos tanulmány készült. Cukorbetegséggel összefüggő gyulladásban az antioxidáns szuperoxid diszmutáz (SOD), glutation reduktáz (GR), kataláz és glutation peroxidáz (GPx) enzimek aktivitását a görögszéna mag kezelés képes volt helyreállítani [104]. Annida és munkatársai vizsgálata kimutatta, hogy a görögszéna levele is hatékonyan csökkenti az egyes típusú diabéteszrel kapcsolatos oxidatív stresszt [105]. Ez a hatás *in vitro* körülmények között is igazolást nyert [106]. Mivel a görögszéna mag vizes frakciója mutatja a leghatékonyabb antioxidáns aktivitást, ezért nagyon valószínű, hogy a magban található flavonoidok és polifenolok felelősek ezért a hatásért [107]. Naidu és munkatársai kimutatták, hogy a görögszéna mag antioxidáns aktivitása a polifenol tartalommal arányos [108]. A görögszéna alkoholos kivonata artritisz állatmodellben antioxidáns hatása mellett a gyulladáshoz vezető mediátorok (interleukinek, TNF- α) szintjét és az ödéma mértékét is jelentősen csökkentette [109]. Mandegary munkacsoportjának eredményei szerint a gyulladásgátló aktivitásért a *Trigonella* magban található flavonoidok felelősek [80], de jelentős hatással rendelkezik a görögszénában szintén előforduló 4-hidroxi-izoleucin is, mely a gyulladáshoz vezető folyamatokban kulcsszerepet játszó faktorok (IRS-1, P38MAPK, NF- κ B) foszforilációját csökkenti [110]. Fájdalom modellekben a görögszéna mag kivonata analgetikus hatásának is bizonyult [111]. Az antinociceptív hatás hátterében valószínűleg a görögszénában található alkaloidok és flavonoidok ciklooxygenáz és lipooxygenáz enzimeket gátló aktivitása áll [80]. A görögszéna

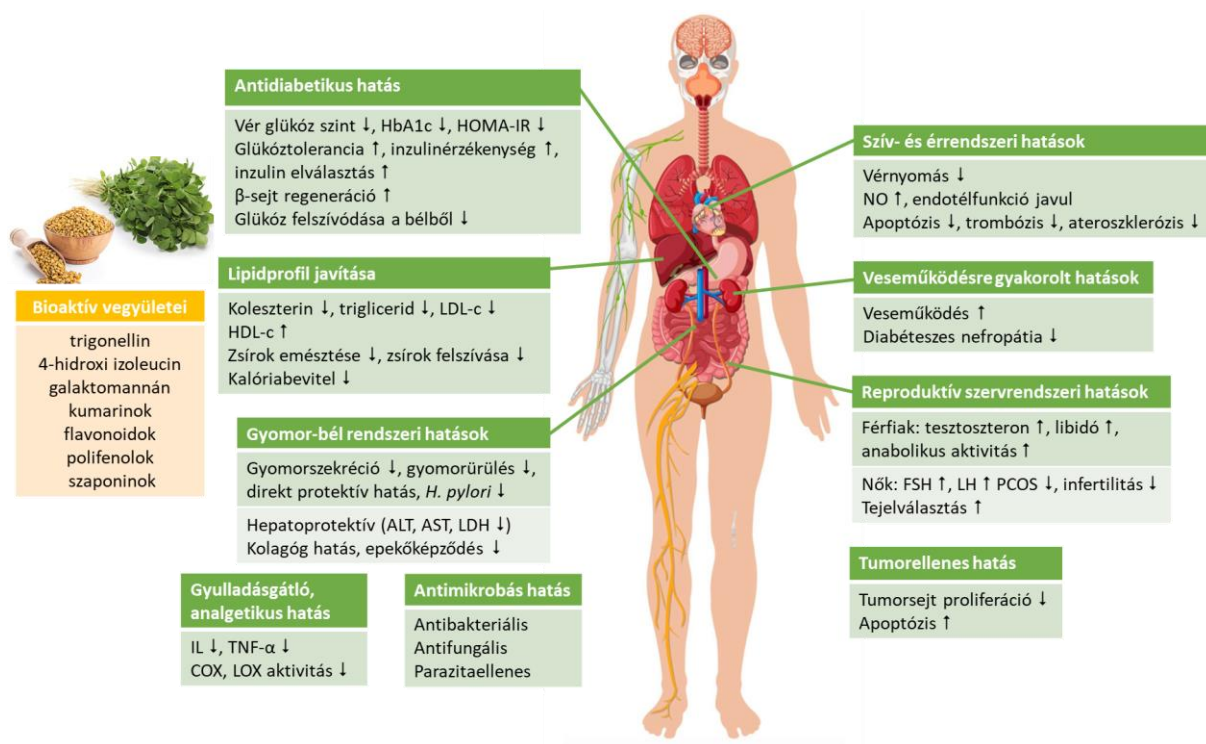
hatóanyagainak lehetséges tumorelles hatásait számos kutatócsoport vizsgálta, *in vitro* körülmények között és állatmodellekben egyaránt. Etanolos, vizes, metanolos kivonatok, valamint a diosgenin proliferációt gátló hatását többféle sejtvonalon igazolták: emlő, prosztata, tüdő, hasnyálmirigy, máj, vastagbél, T- és B-limfóma tumorsejteken [112-116]. Az állatkísérletes tanulmányok hasonló pozitív eredményekről számolnak be. A görögszéna mag önmagában csökkentette a vastag- és vékonybél-daganat kialakulásának valószínűségét 1,2 dimetil-hidrazin patkánymodellben [117], és a görögszéna mag, valamint a diosgenin patkányban mérsékelte a vastagbélrák előfutárának tartott aberrant crypt foci (ACF)-k megjelenését [118]. A görögszéna metanolos kivonata egér DMBA-indukált bőrrák modellekben csökkentette az elváltozások gyakoriságát és méretét [119, 120], a diosgenin egér szarkóma és emlődaganat modellben hatékonyan csökkentette a tumornövekedést [121, 122]. A hatásmechanizmusok nem egészen tisztázottak, de igazolták a p53 aktiválásához köthető apoptózist, és az NF- κ B, Akt és JNK downregulációját [121].

A görögszéna hatóanyagai közül a diosgeninnel kapcsolatban készült különösen sok tanulmány, mely igazolta, hogy ez a szaponin vegyület az ateroszklerózis kórfolyamatába számos helyen képes kedvezően beavatkozni [123]. A diosgenin növeli az endotél védelmében és regenerációjában fontos szerepet játszó NO szintjét azáltal, hogy serkenti az endoteliális NO szintáz foszforilációját és expresszióját [124, 125], az érfal relaxációját is javítja, illetve csökkenti az apoptózist [126]. A diosgenin emellett dóziszfüggő módon fokozza szuperoxid-dismutáz, kataláz és glutation-peroxidáz enzimek aktivitását, ezzel hatékonyan csökkenti az oxidatív stressz mértékét [127]. Aterogén diétán tartott patkányokban a diosgenin a makrofágok habos sejtekké történő differenciálódásának molekuláris folyamatait gátolta [128]. A simaizomsejtek migrációját, proliferációját, és az érlelmeszesedést diosgenin kezeléssel lehet csökkenteni [129, 130]. Továbbá *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel azt is igazolták, hogy a diosgenin csökkenti a vérlemezkék aggregációját és növeli az aktivált parciális tromboplastin időt, a protrombin és trombin időt, és a vérzés időtartamát [131, 132], mellyel jelentősen mérsékli a trombózisra való hajlamot.

A *Trigonella* magot ízjavítóként curryben és számos egyéb ételben alkalmazzák tápanyagtartalma és emésztést segítő hatása miatt. Az indiai tradicionális gyógyászatban emésztőszervi megbetegedések kezelésére is használatos. Gyomorfekélyben a görögszéna mag vizes kivonata jelentős protektív hatást mutatott [133]. Ebben a védő hatásban feltehetően az antioxidáns aktivitás, a szekréció gátlása, és a poliszacharidok által kifejtett direkt protektív hatás vesz részt. A görögszéna emellett javítja az epeáramlást, és csökkenti az epekő kialakulásának valószínűségét, mely feltehetően hipokoleszterinémias hatására vezethető vissza [134, 135]. Krónikus alkoholkezeléssel kiváltott májbetegségben hepatoprotektív hatást

írtak le: a görögszéna mag polifenolos kivonata helyreállította a májenzimek egyensúlyát, és csökkentette az apoptózis mértékét [136].

Összefoglalásként elmondható, hogy a görögszéna hatékonysága a különféle kórképekben a nagyszámú és sokféle bioaktív hatóanyagának köszönhető. Az egyes vegyületek pontos hatásmechanizmusainak felderítésére célzott kutatások szükségesek, de az új eredmények nyomán remélhetőleg ígéretes, hatékonyabb gyógyszerek fejlesztése indulhat meg különböző betegségek kezelésére is (3. ábra).



3. ábra. A görögszéna aktív komponensei és biológiai hatásai

Meggy (*Prunus cerasus*)

Számos jól ismert, széles filogenetikai háttérrel rendelkező növényi hatóanyag indukálja a HO-1 enzimet, közöttük jó néhány tápláléknövényben fordul elő. Ilyen vegyület az epigallokatechin-3-gallát, a zöld tea polifenol vegyülete, és a kurkumin, mely leginkább a curry alkotórészeként ismeretes. A meggy mag kivonat (SCSE) szintén attraktív jelöltnek tűnik a HO-1 aktivátorok között, mivel már viszonylag alacsony koncentrációban képes az enzim szintjét olyan fokon növelni, amellyel véd az iszkémia/reperfúziós károsodással szemben [137-139], gyomorfekélyben, reumatoid artritiszben, kettes típusú cukorbetegségben leírták gyulladásgátló hatását [140-142], valamint elősegíti a károsodott sejtek regenerációját [140, 143]. Ezen tulajdonságai az SCSE-t értékes kardiovaszkuláris gyógyszerjelöltté teszi, továbbá

megemléltendő az alacsony toxicitás, mely a terápiás dózist 200-szorosan meghaladó *in vivo* adagban is elhanyagolható mértékű [138].

Korábbi vizsgálatok igazolták a meggy-mag-kivonat erős antioxidáns [144, 145] és hemoxigenáz-1 induktor hatását (patkány retinában [137], illetve diabéteszes betegektől vett szérumban leukocita tenyészetekben [146]). 2 hetes kezelést követően, dózisfüggő protektív hatását bizonyították (10 és 30 mg/kg kivonatot tartalmazó táppal etetett állatok) egészséges patkány retina [137], illetve egészséges patkány, izolált szívizom preparátum [147] iszkémia/reperfúziós vizsgálatokban. Patkány retinában iszkémia/reperfúziót követően 24 órával alacsony HO-1 szint és csökkent szén-monoxid képződés figyelhető meg, magas szöveti Na^+ és Ca^{2+} koncentrációval és csökkent K^+ tartalommal. Meggy-mag-kivonattal történő etetés hatására, az iszkémia/reperfúziót követő 24. órában, az állatok retinájában a dózis függvényében szignifikánsan nagyobb HO-1 mRNS expresszió, és magasabb HO-1 fehérje, és szén-monoxid szint, szignifikánsan alacsonyabb szöveti Na^+ és Ca^{2+} tartalom, szignifikánsan magasabb szöveti K^+ tartalom mérhető a nem kezelt állatokéhoz képest [137].

Medvehagyma (*Allium ursinum*)

A medvehagyma (*Allium ursinum* L.) vadon termő, az amarilliszfélék családjába tartozó növény. Ázsia és Európa területén széles körben előfordul, változatos neveken ismeretes, úgy mint jurda, poroszhagyma vagy sarima [148]. A növényt intenzív íze miatt szívesen fogyasztják ott, ahol megterem, és fűszernövényként is hasznosítják [149]. Enyhén fokhagymára hasonlító illata a medvehagymában található kéntartalmú vegyületeknek tulajdonítható, mint például szulfonamidok, vagy a glutamil peptidok. Sajnos, leveleik hasonlósága miatt a medvehagymát könnyű összetéveszteni olyan, toxikus növényekkel, mint a *Colchicum autumnale*, a kolhicint tartalmazó őszi kikericcsel, vagy a *Convallaria majalis*, a convallatoxin tartalmú gyöngyvirággal. Több esettanulmány készült olyan ritka, de súlyos fokú mérgezésekről, melyek ilyen szerencsétlen módon következtek be [150]. A növény jellegzetes, fokhagymára emlékeztető illatát kéntartalmú vegyületei adják, de nagy koncentrációban tartalmaz polifenol származékokat, legfőképpen flavonoid glikozidokat [151]. A medvehagyma kivonatának vagy liofilizátumának gyógyszeres hatásai hasonlóak közeli rokona, a termesztett fokhagyma *Allium sativum* hatásaihoz, viszont a medvehagyma néhány esetben hatékonyabb, vagy akár különleges hatásokkal is bír a fokhagymához hasonlítva, melyet valószínűsíthetően speciális összetevőinek, mint a fitosteroloknak, és a más allium fajokban nem fellelhető galaktolipid származéknak (1,2-di-O- α -linolenoil-3-O- β -D-galaktopiranozil-sn-glicerol) lehet tulajdonítani [152].

A faj emellett szagtalan, nem illékony anyagokat is tartalmaz: D-alkenil-L-ciszteinszulfoxidokat, melyek élettani körülmények között illékony (poli)szulfidokra és tioszulfinátkra bomlanak, mely a növény jellegzetes illatát és ízét adja [153]. A medvehagyma nagy mennyiségben tartalmaz polifenolokat is, legfőképp a levelében és a gumójában, melyek jelentős mértékben hozzájárulnak a növény antioxidáns és gyógyhatásaihoz [154-156]. Ezen felül hozzávetőlegesen hússzor annyi adenzint és jelentősen nagyobb mennyiségű ajoént tartalmaz, mint a fokhagyma, mely vegyületek stabilizálják a vérnyomást és a koleszterinszintet, valamint csökkentik a trombociták aggregációját és javítják a koleszterin-anyagcsere élettani szabályzó mechanizmusait [157]. Ezen adatokat tekintve nem meglepő, hogy az Európai Gyógynövények Védelméért és Kutatásáért Felelős Szövetség 1992-ben „Az Év Növénye” címet adományozta a medvehagymának [157]. Mindezek ellenére, bár a medvehagyma kémiai összetevőire tekintve a növény potenciális kardiovaszkuláris hatása feltételezhető, a vele kapcsolatos preklinikai és klinikai kutatások is meglehetősen hiányosak. Munkacsoportunk a közelmúltban egyéb növényi hatóanyagok kardioprotektív hatásaival foglalkozott [147, 158], és ezúttal a medvehagyma vizsgálatát tűztük ki célul. A medvehagyma friss leveleiből készített kivonatok *in vitro* vizsgálata kimutatta, hogy az etanolos készítmények jelentősen csökkentették az ADP-indukált vérlemezke aggregációt. Az adatok arra utalnak, hogy a medvehagyma hasonló hatást vált ki, mint a klopidoegrél, egy tienopiridin típusú vérrögképződést gátló hatóanyag [159]. Lehetséges magyarázat lehet a medvehagymában is előforduló β -szitosziterol 3-O- β -D-glukopiranozid és az 1,2-di-O- α -linolenoil-3-O- β -D-galaktopiranozil-sn-glicerol (DLGG), ismert antiaggregációs hatással rendelkező vegyületek jelenléte [152]. További előzmény, hogy spontán hipertenzív patkányokat 1% fokhagymával vagy 1% medvehagymával dúsított táppal etetve 45 nap alatt a vérnyomás jelentős mértékben csökkent [160]. A medvehagyma bioaktív hatóanyagai viszonylag magas antioxidáns és gyökfogyó képességgel bírnak, a növény levelében és gumójában előforduló vegyületek szuperoxid-diszmutáz, kataláz és peroxidáz aktivitása miatt [161]. Az ajoént, metil-ajoént, allicint és diallil-diszulfidot tartalmazó medvehagyma kivonat a fokhagymához fogható mértékben gátolja a koleszterin bioszintézisét [162]. Spontán hipertenzív patkányokon (SHR) az *Allium ursinum* készítmények az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátlása révén csökkentik a vérnyomást [160, 163]. Egyéb tanulmányok rámutattak, hogy ACE gátló (ACEI) hatás tekintetében a medvehagyma a fokhagymánál hatékonyabbnak bizonyult [162]. Az antihipertenzív, koleszterin-szint csökkentő, és ACEI hatások összessége jótékonyak a szív egészsége szempontjából, és a medvehagyma ezen tulajdonságát iszkémia/reperfúziós patkány modellben meg is vizsgálták. A medvehagymával kezelt állatok esetében kisebb arányban

fordult elő kamrai fibrilláció és tachikardia, és az iszkémia során elhalt terület nagysága is csökkent a szívizomzatban [164].

A liofilizációt egyszerű kivitelezhetősége, és azon tulajdonsága, hogy a biológiailag aktív molekulákat optimális állapotban képes megőrizni, teszi alkalmas technikává a vizsgálatunkhoz [165].

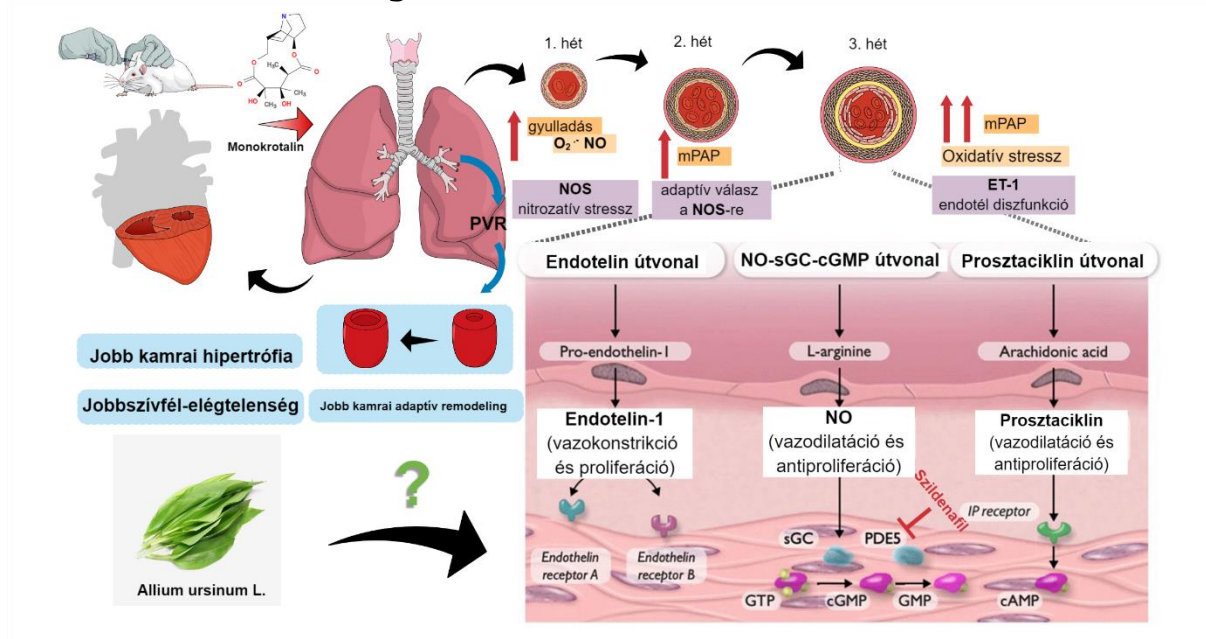
Pulmonális artériás hipertenzió (PAH)

A jobboldali szívelégtelenség – melyet gyakorta a megemelkedett artériás nyomás eredményeként kialakuló pulmonális hipertónia okoz – különösen magas mortalitási rátával jellemzett krónikus megbetegedés. A pulmonális artériás hipertenzió (PAH) olyan érbetegség, melyet a tüdőerek endotél- és simaizomsejtjeinek rendellenessége jellemez. A folyamat előrehaladtával az érellenállás növekszik, mely hamar elkezdi kimeríteni a jobb kamra kompenzációs mechanizmusait. A nem megfelelő alkalmazkodás a kardiovaszkuláris rendszer irreverzibilis károsodásához, és a betegek korai halálozásához vezethet. A PAH alapvetően érbetegséget, és krónikus, előrehaladó kórképet jelent. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) pulmonális hipertenziókat etiológiai és patofiziológiai alapon történő osztályozási rendszere is tükrözi, hiszen a PAH-t önálló csoportba sorolták [166].

A betegséget elsősorban a pulmonális artériák fokozatosan emelkedő érellenállása jellemzi. Mivel a jobb kamra különösen érzékeny az afterload változásaira, a megemelkedett nyomásra jelen lévő adaptív folyamatok – mint a Frank Starling mechanizmus, vagy a kamrai izomzat hipertrófiája – már a kora szakaszokban elindulnak [167]. Az ínhúrok fokozott feszülése, illetve a mitrális anulus dilatációja miatt a trikuszipidális billentyűn keresztül a vér visszaáramlása következik be, amely ahhoz vezet, hogy a jobb pitvar kitér, a jobb kamra túlterhelődik, és a szív teljesítménye lecsökken [168]. Az egyre súlyosbodó hipertrófia nyomán iszkémiás elváltozások jelennek meg, a kamrák közötti szeptum elvékonyodik, és egyre inkább a szív bal oldala felé nyomódik, ami azt eredményezi, hogy diasztolé alatt a bal kamra térfogata lecsökken. Ez az önmagát rontó körfolyamat szisztémás hipoxiához, szívelégtelenséghez vezet, és sok esetben korai halálozáshoz is [169]. A PAH hátterében álló kórélettani folyamatok közül elsőként a pulmonális erek kontrakciója következik be, mely az érszűkítő és értágító hatású mediátorok közötti egyensúly megbomlása miatt jöhet létre. PAH páciensekben több, rendellenesen működő jelátviteli útvonalat azonosítottak, és a PAH kezelésére specifikusan alkalmazott gyógyszerek jelentős része ezeket az útvonalakat befolyásolja, úgy mint a nitrogén-monoxid (NO), a prosztaciklin, vagy az endothelin-1 útvonalat [170-173]. A PAH betegek tüdejében csökkent NO szintáz expressziót, abnormálisan magas argináz enzim szinteket azonosítottak, és jellemző a foszfodiészteráz enzim 5-ös típusának (PDE5) overexpressziója,

mely nyomán a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szint csökken [174, 175]. Más tanulmányok csökkent prosztaciklin 2 (PGI₂) és ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintekről számoltak be a betegség szempontjából említésre méltó szövetekben, melyet részben magyaráz a tény, hogy a PAH betegek tüdejében a prosztaciklin-szintáz enzim aktivitása kórosan alacsony [176, 177].

Az ETA és ETB receptorokon ható endothelin-1 vazoaktív mediátor, mely az érfal simaizomsejtjein proliferatív hatásokkal is rendelkezik. Élettani körülmények között, mikor az endotél sértetlen, az ETB receptorok aktivációja NO és PGI₂ termelést vált ki. Azonban, PAH páciensekben az ETA útvonal elnyomja az ETB által mediált folyamatokat, és vazokonstriktiót vált ki, egyrészt az intracelluláris kalciumszint emelése és a protein kináz C enzim (PKC) aktiválása révén, másrészt a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) által szabályozott proliferatív útvonalak aktiválásán keresztül a tüdő ereinek simaizomsejtjeiben. Az érintett pulmonális szövetekben emelkedett endothelin-1 szinteket azonosítottak, és a fehérje magasabb koncentrációban van jelen a PAH betegekben, mint az egészséges személyekben, továbbá az endothelin-1 szintek és a pulmonális hipertónia mértéke között erős korreláció figyelhető meg [178, 179]. A PAH első terápiás megközelítései a cGMP szint növelésén alapultak a tüdőben, ugyanis az NO értágító hatását a cGMP, mint szekunder jelátvivő molekula mediálja. Bár az NO inhalációs bevitele lehetséges, viszont kényelmetlen, a cGMP szint emelése egyszerűbben megoldható a metabolizmusát végző PDE enzimek gátlásán keresztül. Az 5-ös típusú foszfodiészteráz a tüdőben dominánsan előforduló izoforma, mely a cGMP-t GMP-re bontja le, a PDE5 gátlása ezért megakadályozza a cGMP lebontását, és növeli annak intracelluláris koncentrációját [180]. PAH betegek tüdő mintáiban a PDE5 overexpresszióját írták le. A PDE5 gátlószerei (PDEI) növelik az NO-cGMP szignáltranszdukciós útvonal működését, ezáltal vazodilatációt váltanak ki, és a pulmonális erek simaizomsejtjeinek proliferációját is gátolni képesek. 2005-ben az FDA a sildenafil-citrátot, a korábban erektilis diszfunkció terápiájára bejegyzett PDE5I-t engedélyezte a pulmonális hipertónia kezelésére [181, 182]. A sildenafil hatékonyan csökkenti a PAH tüneteit, azonban az FDA nem javasolja gyermekeknél a hosszú távú alkalmazást, mivel a STARTS-2 tanulmány alapján növeli a mortalitás kockázatát [183] (4. ábra).



4. ábra. A PAH és a jobb-szívél elégtelenség patomechanizmusai.

BGP-15

Az elmúlt évtizedben a hidroximsav-származék BGP-15 (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) egyre inkább a tudományos érdeklődés középpontjába került. Azért választottuk a BGP-15 hatásának vizsgálatát korai stádiumú diabéteszes kardiomiopátiás állatmodellben, mert korábbi beszámolók alapján a molekulának inzulin-érzékenyítő tulajdonsága van, valamint protektív hatással bír a muscularis disztrófiára, a kardiotoxicitásra, a szívelégtelenségre és a pitvarfibrillációra [184-186]. A BGP-15 10-30 mg/kg-os dózisban emelte a szövetek inzulin-érzékenységét anyagcserezavarok tanulmányozására szolgáló különböző állatmodellekben [187]. A gyógyszerjelölt inzulin-érzékenyítőként belépett klinikai fázisba és humán páciensekben fokozta a szövetek inzulin-érzékenységét.

Párhuzamosan futó állatkísérletek bemutatták, hogy a BGP-15 molekula bizonyos sejtekben növeli a hő sokkfehérjék (hsp-k) kifejeződését, ezáltal kriolízist követően 15 mg/kg-os dózisban gyorsítja a m. soleus myocyták regenerációját CB6F1 egerekben. A BGP-15 hatására nemcsak a regeneráció sebessége nőtt, hanem a károsodás utáni kontraktilis funkció is javult, azáltal, hogy fokozódott a miozin nehéz lánc (MyHC-II és MyHC-I) izoformák reexpressziója és a chaperonok kialakulása [186]. Továbbá, 10 napig tartó, 40 mg/kg-os dózisban alkalmazott BGP-15 kezelés nagymértékben javította a rekeszizom működést ventiláció-indukált diaphragma diszfunkcióban szenvedő Sprague-Dawley patkányokban. A kezelés „védte” a miozint a posztranszlációs módosításoktól, hiszen a hsp72 termelésének fokozásával és a polyADP-ribóz polimeráz-1 (PARP-1) gátlásával javult a mitokondriális funkció [188]. Egy másik kísérletben Sagra és munkatársai leírták, hogy a BGP-15 kezelés hatására a

miokardiumban nem változott a hsp70 és hsp27 szintje, annak ellenére, hogy a gyógyszerjelölt 15 mg/kg-os dózisban fokozza az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (IGF1R) foszforilációját, valamint a BGP-15 növelte a SERCA2a gén expresszióját, azonfelül gátolta a pitvari és B-típusú nátriuretikus peptidek (ANP és BNP) kifejeződését. Ezekben a kísérletekben a patkányok szíve és tüdeje megnagyobbodott a kollagén lerakódások miatt, ám ennek a BGP-15 kezeléssel történő sikeres csökkentése egy lehetséges hatása az IGF1R fokozott foszforilációjából származó kardioprotektív mechanizmusnak [185]. Arról is beszámoltak, hogy a BGP-15 (15 mg/kg/nap, orális gavázs) javította az izomerőt és az állóképességet disztrófiás mdx transzgenikus egerekben, mérsékelte a rekeszizom fibrózist és növelte a maximális SERCA aktivitást diafragma homogenizátumokban [184].

juhasz.bela.1_180_24

Célkitűzés

Az átfogó tudományos munka során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A resveratrol antidiabetikus és kardioprotektív hatásának vizsgálata STZ-vel kiváltott diabétesz modellben;
2. A hiperkoleszterinémia hatásának követése a szívizomzat funkcionális paramétereire és angiogenezisére iszkémia/reperfúziós körülmények között, valamint a resveratrol, a statin és ezek kombinációjának lehetséges protektív hatásainak vizsgálata;
3. Bromelain hatásának vizsgálata a szívfunkcióra, az infarktus méretére és az apoptózis mértékére iszkémia/reperfúziós károsodást követően;
4. Niacinhoz kötött króm-komplexet és ashwagandha kivonatot is tartalmazó készítmény hatásának vizsgálata a kardiális funkciókra és biokémiai paraméterekre iszkémia/reperfúziós modellben;
5. A meggy-mag-kivonat hatásának megismerése koleszterindús diétával kiváltott szívbetegség modellben, illetve iszkémia/reperfúziós folyamat során;
6. A medvehagyma-kivonat lehetséges kardioprotektív szerepének vizsgálata koleszterinnel kiváltott szívbeteg állatmodellben;
7. A medvehagyma hatásának értékelése monokrotalinnal kiváltott pulmonális artériás hipertónia patkánymodellben;
8. A diosgenin és a görögszéna hatásának vizsgálata az endotél funkcióra magas zsír- és cukortartalmú diéta mellett;
9. A BGP-15 hatásainak vizsgálata genetikai cukorbeteg állatmodellben, különös tekintettel a kardiális és vaszkuláris paraméterekre;
10. Aterogén étrenddel kiváltott hiperkoleszterinémiában bekövetkezett változások értékelése a szívfunkcióban és biokémiai paraméterekben, különös tekintettel a PDE9A expresszióra.

juhasz.bela.1_180_24

Anyagok és módszerek

Kísérleti elrendezések

A resveratrol hatásának vizsgálata a kardiális diszfunkcióra streptozotocin-indukálta diabétesz modellen

Minden, a kísérletben felhasznált állat az Országos Orvosi Kutatási Társaság irányelveinek, valamint a Nemzeti Egészségügyi Intézet (NIH) Laboratóriumi állatok tartása és felhasználására vonatkozó kiadványának megfelelő gondozásban részesült (Kiadvány No. 85-23, felülvizsgálva 1985) (USA). A vizsgálataink során az Connecticuti Egészségügyi Központ Állatvédelmi Bizottsága (Farmington, CT) által elfogadott protokollt alkalmaztuk. Hím, SD patkányokat (250-275 g) véletlenszerűen osztottuk normál és diabéteszes csoportra. A normál csoport vivőanyagot kapott (0,1 mol/l, pH 4.5 citrát puffer), míg a diabéteszes csoport streptozotocint (STZ, Sigma, St Louis, MO) 65 mg/ttkg, pH 4.5. 5 nappal az STZ injekció után, a hiperglikémiát a vércukorszint mérésével állapítottuk meg (farokvénából vett vérrel), melyhez vércukormérő rendszert (Thera Sense, Inc. Alameda, CA, USA) használtunk. A diabéteszes állapotot ≥ 300 mg/dl vércukorértéknél definiáltuk.

A patkányokat véletlenszerűen 5 csoportra osztottuk: 1) nem diabéteszes (kontroll); 2) STZ hiperglikémiás állatok (Dia); 3) Diabéteszes STZ patkányok resveratrol kezeléssel (Dia+Rsvl) (2,5 mg/ttkg; Sigma, St. Louis, MO); 4) Diabéteszes STZ patkányok resveratrol (2,5 mg/ttkg) és N(G)-nitro-L-arginin metil észter (L-NAME, Sigma, St. Louis, MO) nitrogén-monoxid szintáz inhibitor kezeléssel (25 mg/ttkg) (Dia+Rsvl+L-NAME); 5) Diabéteszes STZ patkányok L-NAME kezeléssel (Dia+L-NAME). A resveratrol és L-NAME kezelést az állatok *per os* kapták 15 egymást követő napon, 15 nappal az STZ injekciót követően. A kezelést követően az állatokat egy éjszakán át éhezettük, majd a szíveket eltávolítottuk és 30 perc iszkémia 2 óra reperfüzióknak vetettük alá [189].

A resveratrol és statinok hatásai hiperkoleszterinémias patkány modellen

Vizsgálataink során 450-500 g súlyú hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk, melyeket 8 héten keresztül 2%-os koleszterin tartalmú táppal etettünk. 8 hét után az állatokat orális resveratrollal (20 mg/ttkg/nap, Sigma) és pravastatinnal (1 mg/ttkg/nap, a Sankyo Pharmaceutical Co. nagylelkű felajánlása) kezeltük 2 héten keresztül. Az állatokat véletlenszerűen öt csoportba osztottuk: 1) kontroll (C), 2) hiperkoleszterinémia (HC), 3) hiperkoleszterinémia+resveratrol (HCR), 4) hiperkoleszterinémia+statin (HCS), 5) hiperkoleszterinémia+resveratrol+statin (HCRS). Az izolált dolgozó perfundált szív (30 perc

teljes iszkémia, majd 120 perc reperfúzió) és *in vivo* miokardiális infarktus (7 napon keresztül folyamatos LAD elzárás) modelleket alkalmaztunk.

A fent említett Sprague Dawley patkányokat a kezelés lejárta után ketamin-HCl (100 mg/ttkg i.p.) és xylazin (10 mg/ttkg i.p.) kombinációjával altattunk. Preoperatív antibiotikumként cefazolint (25 mg/ttkg i.p.) kaptak. Tracheotomiát és a légzés biztosítását követően (Harvard rágcsálólégeztető apparátus, modell 683), a szív bal laterális (4. bordaközben ejtett) thoracotomiával került eltávolításra. Egy 6-0 polipropilén varratot húztunk át kúpos tűvel a bal elülső leszálló koronária (LAD) alatt, éppen a pitvarcsúcsnál, egy nem traumás záróelemet helyezve az artériára. A miokardiális infarktust a folyamatos LAD zárással idéztük elő. A műtét befejeztekor zártuk a mellkasfalat. Az állatoknak buprenorfint adtunk (0,1 mg/ttkg s.c.), majd leválasztottuk őket a lélegeztető gépről. Ezután ébredésig elektromosan fűthető matracokra helyeztük őket [190].

A bromelain hatásai

250-275 g súlyú, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk a vizsgálatban. A Br-t (EC 3.4.22.32, Lot No. 1965; Vital Nutrients, Middletown, CT) 10 mg/kg dózisban alkalmaztuk, a hatóanyagot PBS-ben oldottuk fel, és minden nap frissen készült. Minden állat két intraperitoneális injekciót kapott (0,5 ml) naponta, 6-8 óra különbséggel. A kezelést 15 nappal az izoláció és az *ex vivo* iszkémia indukció előtt kezdtük el. Az alkalmazott dózist a laboratóriumunkban végzett dózis-hatás vizsgálatok alapján határoztuk meg. 3 mg/kg Br nem volt hatással a szív funkcióra, míg a 10 és 30 mg/kg dózis hasonló mértékű kardioprotektív hatást mutatott, ez alapján a 10 mg/kg dózist választottuk a jelen vizsgálatban [191].

A niacin-kötött-króm bázisú Energia formula (Ef) hatásai

175-199 g súlyú hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokat négy csoportba osztottunk: 1) kontroll; 2) Ef (40 mg/kg 0,5 ml vízben szuszpendálva/nap, 30 napos kezelési időszak); 3) Ef (40 mg/kg 0,5 ml vízben szuszpendálva/nap, 60 napos kezelési időszak); 4) Ef (40 mg/kg 0,5 ml vízben szuszpendálva/nap, 90 napos kezelési időszak). Az Ef mely niacinhoz kötött króm (0,45%), D-ribóz (10,71%), koffein (22,76%), álombogyó kivonat (10,71%) és bizonyos aminosavak, mint például, fenil-alanin, taurin és glutamin (55,37%) keveréke, az InterHealth Nutraceuticals révén került beszerzésre. A 30, 60 és 90 napos kezelésekre azonos korú állatokat használtunk kontrollként. Az Ef-t 30, 60, 90 napon át szájon át adtuk. A szíveken ezután 30 perc iszkémiát, majd 2 óra reperfúziót hajtottunk végre [192].

A kísérletet felnőtt hím (2-2,5 kg tömegű) New Zealand nyulakon kiviteleztek. A nyulakat a csoportosítástól függően standard laboratóriumi táppal (kontroll), 2,0% koleszterinnel dúsított táppal (Gödöllő Kft, Budapest, Magyarország) (HC), vagy 2,0% koleszterinnel és 30 mg/kg meggy-mag kivonattal dúsított táppal (HCT) etették 16 héten keresztül. A szérumban koleszterin szinteket vénás vérből, CardioCheck szérumban koleszterin analízátor (Point Of Care Diagnostics, Ltd., Artarmon, New South Wales, Ausztrália) segítségével határoztuk meg a kísérlet 0. (alapérték), 2., 4., 8. és 16. hetében [193].

Az Allium ursinum liofilizátum, wild garlic leaf lyophilisate (WGLL) antiaterogén hatásainak vizsgálata

A kísérleteket felnőtt hím New Zealand nyulakon (testsúly: 2,5-3 kg) végeztük. Az állatokkal való bánásmód az állatkísérletekre vonatkozó 2010/63/EU rendelet, a „Laboratóriumi Állatok Gondozásának Szabályzata” alapján történt. Az akklimatizációs periódus két hétig tartott. Az állatok vagy 2% koleszterint tartalmazó laboratóriumi tápot (Juraskó Kft., Debrecen, Magyarország), vagy ennek 2% medvehagyma liofilizátummal (wild garlic leaf lyophilisate, WGLL) dúsított változatát kapták *ad libitum* 8 héten át. Ez utóbbi tápot a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén állítottuk elő. Az állatok viselkedésében, illetve általános egészségi állapotában nem történt megfigyelhető változás a különböző összetételű tápok tekintetében, így azt mondhatjuk, hogy a diéta nem volt zavaró tényező a kísérlet kimenetelére szempontjából [194].

A pulmonális artériás hipertenzió (PAH) kezelése WGLL-lel

A kísérlet során alkalmazott hím Sprague-Dawley patkányokat (200-250 g) a Charles River Kft.-től vásároltuk (Wilmington, MA, Egyesült Államok). Az állatokat kórokozóktól mentes környezetben tartottuk, a megvilágítás 12 óránként váltakozó fény/sötétség periódusokból állt, vizet és táplálékot *ad libitum* kaptak. A vizsgálat végpontján (8. hét) az állatok testsúlyát megmértük. A PAH-t egyszeri, szubkután beadott monokrotalinnal (MCT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, Egyesült Államok), a *Crotalaria spectabilis* alkaloidjával (60 mg/kg, a lapockák közötti régióba) [195] idéztük elő, míg a kontroll csoport (n=8) a MCT oldószerét, dimetil szulfoxid puffert (DMSO) kapta. Az MCT-vel kezelt patkányokat 3 további csoportba osztottuk a következő módon: csak MCT-t kapott csoport (PAH, n=8); MCT-t kapott, majd 2% medvehagyma liofilizátummal dúsított tápon tartott csoport (WGLL, n=8); és MCT kezelést kapott, majd szájon át napi 25 mg/kg sildenafillel kezelt csoport (Sildenafil, n=8). Az *Allium*

ursinum liofilizátumot tartalmazó tápot Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai Tanszékén állítottuk elő, ahogyan azt már az előző fejezetben is leírtam. A sildenafil, valamint az izolált szív modellben és Western blot során alkalmazott vegyszerek, illetve a festékek a Sigma-Aldrich Co. cégtől kerültek beszerzésre (Budapest, Magyarország). A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága hagyta jóvá és az állatokkal való bánásmód az az állatkísérletekre vonatkozó 2010/63/EU rendelet, a „Laboratóriumi Állatok Gondozásának Szabályzata” alapján történt [196].

A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai

A következő vegyszereket és készítményeket alkalmaztuk: hagyományos patkány táp (S8106-S011 SM R/M-Z+H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország), zsírdús táp (high fat diet - HFD) (RM AFE 45% FAT 20% CP 35% CHO (P), Special Diets Services, Witham, Egyesült Királyság), görögszéna mag por (Trigonella Med. Ltd., Mosonmagyaróvár, Hungary), adrenalin hidroklorid (Arterenol, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Németország). A diosgenint, acetil-kolin-kloridot és a Krebs oldathoz szükséges anyagokat a Sigma Corp.-tól (St. Louis, MO, Egyesült Államok) szereztük be.

A Krebs oldat összetétele: NaCl: 118 mmol/l, KCl: 4,7 mmol/l, CaCl₂: 2,5 mmol/l, NaH₂PO₄: 1 mmol/l, MgCl₂: 1,2 mmol/l, NaHCO₃: 24,9 mmol/l, glükóz: 11,5 mmol/l, aszkorbinsav: 0,1 mmol/l, újraderesztillált vízben feloldva. Az acetil-kolin feloldásához, valamint az adrenalin hígításához Krebs oldatot használtunk.

A vizsgálat a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával történt. 42 db, hím Wistar patkányt (kezdő testsúly: 300-500 g) 6 csoportba osztottunk: 1. negatív kontroll (normál táp+csapvíz) (n=6), 2. pozitív kontroll (HFHSD, zsírdús táp+5% cukros víz) (n=6), 3. 2 g/kg/nap görögszéna+HFHSD (n=9), 4. 1 mg/kg/nap diosgenin+HFHSD (n=8), 5. 10 mg/kg/nap diosgenin+HFHSD (n=8), 6. 50 mg/kg/nap diosgenin+HFHSD (n=8). A kezelés hat hétig tartott. A vizsgált hatóanyagokat az állatok száján át a zsírdús tápba keverve kapták. A napi szükséges hatóanyag mennyiséget az előzőleg meghatározott napi átlagos tápfogyasztás alapján számoltuk ki.

A 6 hét elteltével az állatokat extermináltuk. A vér glükóz szintjét Accu-Chek Active vércukormérő (Roche Holding AG, Basel, Svájc) segítségével határoztuk meg. A plazma inzulin szint meghatározása ELISA kittel (DA-INSULIN-2015, Cortez-Siagnostics Inc., Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) történt. A glutation, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz, valamint az antioxidáns kapacitás meghatározására EDTA-val bevont mintavételi csövekbe (BD, Franklin Lakes, NJ, Egyesült Államok) további vérmintákat vettünk minden

patkányból. A mintákat 4 °C-on, 1000 g-n 10 percen át centrifugáltuk, a felülúszókat -20 °C-on tároltuk [197].

BGP-15 hatása a Goto-Kakizaki és Wistar patkányok metabolikus paramétereire

Jelen tanulmány elkészítését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta, az állatok humánus bánásmódban részesültek, összhangban az EU 2010/63/EU Irányelvével a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. 12 hetes Goto-Kakizaki és vad-típusú Wistar patkányokat használtunk fel, és olyan állatházban tartottuk őket, ahol állandó hőmérsékletet, valamint 12-12 órás sötét-világos ciklusokat tudunk biztosítani.

A patkányokat véletlenszerűen 5 alcsoportra osztottuk (n=6/csoport): Wistar csoport (kontrollként szolgál, vivőanyag-kezelt); diabéteszes GotoK csoport (GotoK patkányok, vivőanyag-kezelt); GotoK + BGP-15 csoport (GotoK patkányok, napi 10 mg/kg BGP-15 kezelés *per os*); GotoK + MET csoport (napi 100 mg/kg *per os* metforminnal kezelt GotoK patkányok); GotoK + PIO csoport (GotoK patkányok, 10 mg/kg/nap *per os* pioglitazon kezelés), 12 héten keresztül. Minden állatot mély tiopentál anesztézia (50 mg/kg, ip.) alatt extermináltunk, a szívüket gyorsan kimetszettük és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, az aorta mintákat pedig *ex vivo* funkcionális kísérleteknek vetettük alá.

A vegyszereket, puffereket, primer és szekunder antitesteket, és a Krebs-oldat összetevőit a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) és az Abcam Plc.-től (Cambridge, Egyesült Királyság) szereztük be. A noradrenalin-hidrokloridot (NE, Arterenol), acetilkolin-hidrokloridot (Ach), adenzin 5'-trifoszfát-hidrátot (ATP), metformin-hidrokloridot és pioglitazon-hidrokloridot a Sigma-Aldrich-Merck KGaA-tól vásároltuk. A BGP-15 molekula az N-Genetika Kutatási és Fejlesztési Kft-től (Budapest, Magyarország) érkezett [198].

A miokardiális és vaszkuláris PDE9 enzim expressziójának változása a hiperkoleszterinémias tápon tartott nyulakban

2700-3000 g súlyú, hím CAL-NZW nyulakat (a tanulmány kezdetén 20 hetesek, n=18) használtunk fel a kísérletben, melyeket a Juráskó Kft-től (Debrecen, Magyarország) szereztünk be. New Zealand White (NZW) és Kaliforniai (CAL) típus kereszteződéséből olyan nyulak jöttek létre, amelyeknek magasabb volt a testsúlyuk és a testzsírszázalékuk [199], ezért azt feltételeztük, hogy alkalmazásuk előnyösebb lesz a kísérlet során.

Az állatokat úgy helyeztük el, hogy 12-12 órás világos-sötét ciklusokat tudjunk biztosítani számukra, valamint a vizsgálatok kezdetéig normál rágcsálótápot kaptak. A Kontroll nyulak végig normál eledelt kaptak, míg a HC csoportot aterogén étrenden tartottuk. Az „aterogén” táp 1%-os koleszterinnel és 1%-os telített zsírral volt dúsítva, a Debreceni Egyetem

Gyógyszerésztechnológiai Intézetében állítottuk elő. A kísérleti protokoll összes lépését jóváhagyta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága, továbbá az állatok humánus bánásmódban részesültek, összhangban az EU 2010/63/EU Irányelvével a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. A vizsgálatok megkezdése előtt 2 hetes adaptációs időszakot biztosítottunk a nyulak számára.

A felhasznált nyulakat véletlenszerűen 2 kezelési csoportra osztottuk: a „Kontroll” csoport 4 hónapon keresztül normál rágcsálótápot kapott (n=9); a „HC” csoportba tartozó állatokat „aterogén” diétán tartottuk. A kísérlet kezdete előtt találomra 9 nyulat kiválasztottunk, az ő paramétereiket is regisztráltuk („Baseline” csoport). 4 hónap után, a tanulmány végpontjában testsúlyt mértünk, szérum paramétereket vizsgáltunk és echokardiográfiás felvételeket készítettünk, majd a nyulakat ketamin/xylazin (50/5 mg/kg) anesztézia alatt extermináltuk. Thoracotomia során izoláltuk a szívet és a proximális aortát, ez utóbbiból érgyűrűket készítettünk a későbbi vaszkuláris mérésekhez. A szervek súlyát lemértük, majd a szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és -80 °C-on tároltuk (a bal kamra Western blot és cGMP assay technikákkal történő molekuláris vizsgálatához), vagy pedig 4%-os formalin oldatba helyeztük a későbbi szövettani elemzés céljából (szív, abdominalis aorta, vese, tüdő, máj minták) [200].

Echokardiográfia

Az echokardiográfiás vizsgálatot a meggy-mag-kivonat, és a hiperkoleszterinémia hatásainak szívműködésre gyakorolt hatásának követésére felületes altatás alatt (intramuszkuláris 15 mg/kg ketamin + 3 mg/kg xilazin) végeztük el. A méréseket Sequoia 512 echográf-felvételezővel (Siemens/Acuson, Tarrytown, New York, Egyesült Államok) végeztük, a képet 7 MHz-en hoztuk létre, az offline elemzés céljára a felvételeket mágneslemezen tároltuk.

Az *Allium ursinum* liofilizátum antiaterogén hatásainak követésére a méréseket Siemens Acuson 512 szonográf-felvételezővel (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) végeztük, a képet 7 MHz-en, 7V3c érzékelővel hoztuk létre. Itt az altatási protokoll azonos volt a meggy-mag-kivonatban alkalmazottal.

A pulmonális artériás hipertenzió (PAH) *Allium ursinum* liofilizátummal történő kezelése során az echokardiográfiás vizsgálatokat Vivid E9 szonográf-felvételezővel (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) végeztük a kísérlet kezdő- és végpontján enyhe anesztézia alatt (intramuszkuláris ketamin/xilazin, 50/5 mg/kg). A felvételeket a nagy idő- és térbeli felbontással rendelkező i13L lineáris array szondával készítettük, 14 MHz-en. A felvételeket az EchoPAC szoftver (GE Healthcare, New York, USA) segítségével értékeltük ki [201].

A Goto-Kakizaki és Wistar patkányok kardiovaszkuláris funkcióinak követésére a BGP-15 kezelés során az echokardiográfiás vizsgálatainhoz Vivid E9 ultrahang készüléket és i13L típusú lineáris transzducert (GE Healthcare, New York, USA) használtunk, az altatási protokoll pedig ketamin/xylazin 75/5 mg/kg-ra módosult. A kapott mérési eredményeket EchoPAC PC szoftver (ver. 112) (GE Healthcare, New York, USA) segítségével elemeztük.

A miokardiális és vaszkuláris PDE9A expresszióváltozásának követésére a hiperkoleszterinemiás tápon tartott nyulak echokardiográfiás vizsgálatát is felületes altatásban (ketamin: 35 mg/kg, xylazin:3 mg/kg) végeztük [194]. A képalkotás Vivid E9 készülékkel történt (GE Healthcare, New York, USA), melyhez ebben az esetben a nagyobb áthatolóképességű 12S-D (szektor) típusú transzducert használtuk. Ebben a kísérletben sikerült a Speckle Tracking (STE) módszert is alkalmaznunk, apikális hossz tengelyi (APLAX) és négyüregű csúcsi nézetben, az EchoPAC Q-analízis és 2DStrain mérési lehetőségeket, valamint a szoftver automatikus funkcionális képalkotás (AFI) üzemmódját is használva. Az STE segítségével meghatározható az egyes miokardiális szövetrészek elmozdulása (displacement), sebessége (velocity) vagyis a falmozgás, továbbá a fal deformálódása (strain) is és a deformitás időbeli leképezésével a strain rate is detektálható. A technika segítségével így a szívizomszövet egyes szegmenseinek intrinszik mozgékonyaságáról is információt nyerhettünk. Az AFI és a Q-elemzésből származó adatok jól korreláltak egymással. A kamrafal bizonyos részeinek manuális kijelölése után a Globális Longitudinális Strain-t (GLS) határoztuk meg, melynek értéke különösen jól használható a bal kamra szisztolés funkciójának megítélésében.

A fentiek után mind a patkány, mind a nyúl modellek esetében ugyanazt a képalkotási protokollt követtük, összhangban az American Society of Echocardiography ajánlásával. Az állatok mellkasát leborotváltuk, majd háton fekvő pozícióba helyeztük őket. A szívét paraszternális hossz tengelyi metszetben (PLAX) vizsgáltuk oly módon, hogy a mitrális és aortabillentyűk, illetve a szívcsúcs is látható legyen. A paraszternális rövidtengelyi metszet (PSAX) felvétele a papilláris izmok magasságában történt. Az M-mód felvételeket szintén a papilláris izmok magasságában, rövid- és hossz tengelyi metszetben is elkészítettük, a méréseket „leading edge to leading edge” elv alapján, 0,1 mm pontossággal végeztük el. A méréseket 3-5, egymást követő szív ciklusból átlagoltuk.

Echokardiográfiás mérések: a bal kamrai (LV) szeptum és hátsó fal vastagsága diasztolé alatt (IVSTD, PWTD); a bal kamra üreg átmérője a diasztolé és szisztolé végpontján (LVEDD, LVESD); aortagyök (Ao), és a bal pitvar (LA) antero-poszterior irányú átmérője. A frakcionális rövidülést az $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD$, a bal kamrai szívizomtömeget $LVMass = 0,8(1,04(LVEDD + IVSTD + PWTD)^3 * LVEDD^3) + 0,6$ egyenlettel határoztuk meg. Az ejekciós frakciót (EF) a Teichholz formulával számoltuk, ahol $EF = EDV - ESV / EDV * 100$, és

$LVEDV = 7/(2,4+LVEDD)*LVEDD^3$, valamint $LVESV=7/(2,4+LVESD) * LVESD^3$. További rögzített paraméterek: mitrális és trikuszipidális billentyű anuluszának szisztolés kiterése (MAPSE, TAPSE), a bal kamrai kiáramlás sebességgörbéjének integráltja (VTI), az áramlás csúcsebessége (Vmax), kalkulált nyomásgradiense (maxPG), a mitrális beáramlás korai (E) és késői (A) diasztolés csúcsebessége, a mitrális beáramlás decelerációs ideje (DecT), és a laterális és szeptális mitrális anulusz szöveti Doppler sebességei (szisztolés: s', korai diasztolés: e', késői diasztolés: a'). A szöveti mozgási sebességeket (Tissue Velocity Imaging: TVI) apikális 4 üregű nézetből határoztuk meg. A mitrális anulusznál nyúl modell esetében 5 mm-es szövetmintákat vizsgáltunk mind a szeptumból, mind az oldalfalak felől, míg patkánymodellek esetében a kapuzott méret 2 mm volt. Származtatott paraméterként meghatároztuk az E/e' arányt (korai diasztolés mitrális beáramlás osztva a laterális és szeptális szövet Doppler korai diasztolés sebességének átlagával) és az e'/a' arányt is (szöveti Doppler korai és késői sebességének hányadosa). A TVI felvételekből nyert adatokból Tei-indexet számítottunk a következő képlettel: $Tei\ index = IVRT+IVCT/ET$; amely a bal kamrai globális teljesítményt jellemzi [202]. A felvételeket két, a csoportkiosztásra vak kutató értékelte ki; a további elemzéshez mérések átlagait használtuk.

Szérumparaméterek meghatározása

A resveratrol és statinok hatásainak vizsgálata során a lipid szintek meghatározásánál a vérvétel a juguláris vénából történt, melyet heparin tartalmú csövekbe gyűjtöttünk, majd a plazmát centrifugálással választottuk el. Az összkoleszterin, triglicerid és HDL értékeket kvantitatívan, erre alkalmas kitek segítségével mértük, az előírt protokoll alapján (összkoleszterin, triglicerid és HDL, Wako Diagnostics, Richmond, VA 23237, USA). Az LDL értékét a Friedewald képlet segítségével határoztuk meg: $LDL = \text{összkoleszterin} - HDL - (\text{triglicerid}/5)$.

Az *Allium ursinum* liofilizátum antiaterogén hatásainak vizsgálatában a vérmintákat a kísérleti időszak végpontján EDTA-K2 csövekbe (BD Vacutainer, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, Egyesült Államok) vettük le a fülvénából. A minták feldolgozása során igyekeztünk megelőzni a hemolízist. Az összkoleszterin (TC), trigliceridek (TG), magas denzitású lipoprotein-koleszterin (HDL), alacsony denzitású lipoprotein-koleszterin (LDL), az apolipoprotein A-I (ApoA), az apolipoprotein B (ApoB), a C-reaktív protein (CRP), aszpartát transzamináz (AST) (más néven glutamát-oxálacetát transzamináz, GOT), laktát-dehidrogenáz (LDH) és kreatin-kináz (CK) értékeket a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézete határozta meg.

A BGP-15 hatásának vizsgálatában a Goto-Kakizaki és Wistar patkányokban az állatok testsúlyát hetente mértük, az éhomi vércukor és plazma inzulin szinteket pedig a kísérlet

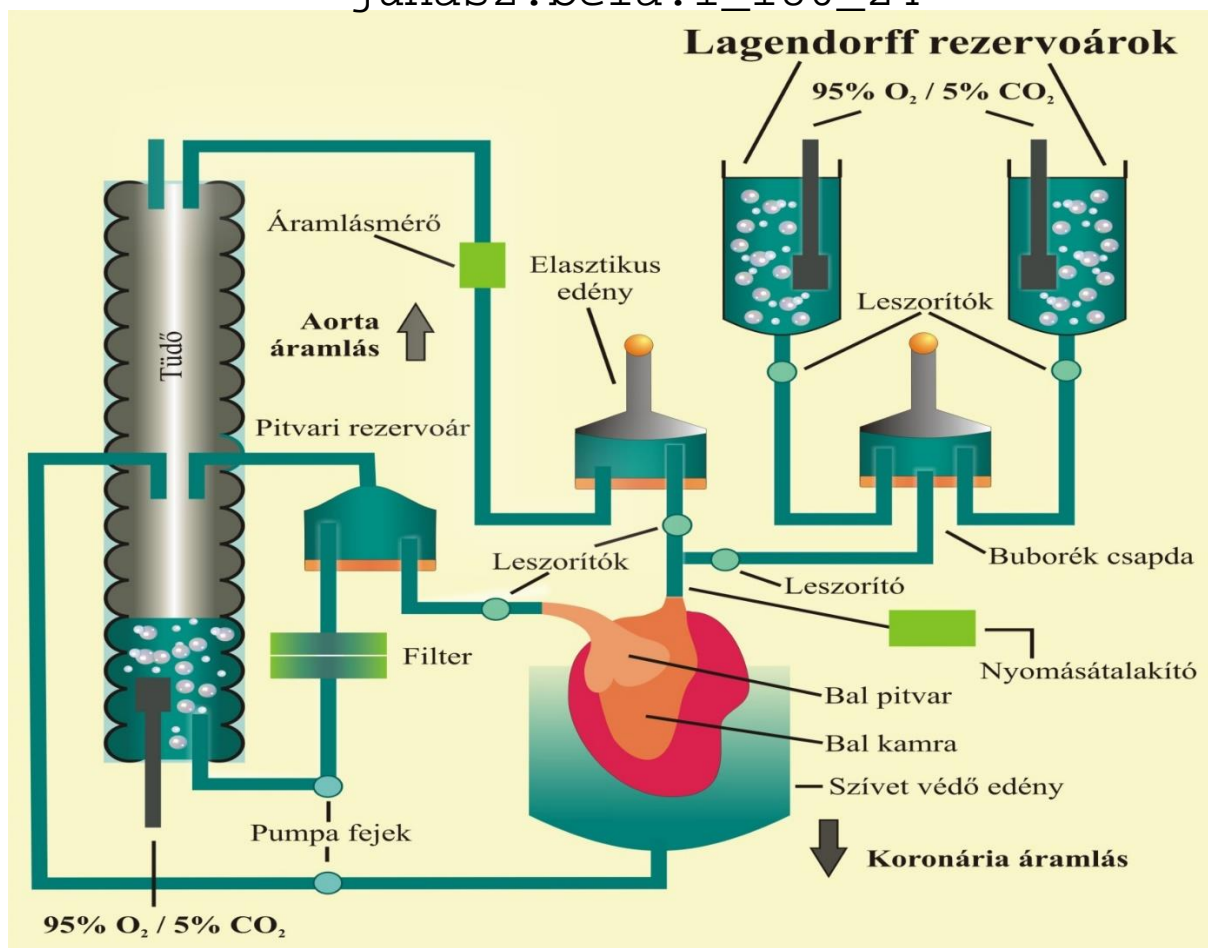
végpontjában határoztuk meg. A vérvétel a patkányok farkának vénájából történt, majd a glükózszint mérésére Accu-Chek Active vércukormérőt (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk. Ezután a vérmintákat 2 percig centrifugáltuk (Centrifuge 5415R; Eppendorf AG, Hamburg, Németország) 4 °C-on, 10000 rpm-en; majd a plazmát *aliquotoltuk*, lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk, hogy később a bazális plazma inzulinszintet meg tudjuk határozni. A plazma inzulinszintméréséhez kereskedelmi forgalomban kapható radioimmunoassay kitet használtunk (RK-400CT, Magyar Tudományos Akadémia Izotópkutató Intézet, Budapest, Magyarország) [203]. A HOMA-IR indexet (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) a következőképpen számítottuk ki: éhomi inzulin ($\mu\text{IU/ml}$) x éhomi glükóz (mmol/ml) / 22,5; továbbá a β -sejt funkciót (HOMA-B) az alábbi képlettel határoztuk meg: $20 \times \text{éhomi inzulin} (\mu\text{IU/ml}) / \text{éhomi glükóz} (\text{mmol/ml}) - 3,5$ [204]. A miokardiális és vaszkuláris PDE9A követésénél a hiperkoleszterinémiás tápon tartott nyulak szérum paramétereinek meghatározására a vérvétel az állatok marginális fülvénájából történt Vacutainer Plastic SSTII csövekbe (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 12 órás éhezési periódus után. A mintákat összegyűjtöttük és aseptikusan dolgoztuk fel őket, hogy minimalizáljuk a hemolízist. Az inzulin szintet Liaison XL DiaSorin platformon (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA) határoztuk meg, míg az összes többi paramétert a Roche Cobas Integrated Platform (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével mértük. A vizsgált lipid paraméterek: total koleszterin, alacsony-sűrűségű lipoprotein (LDLc), magas-sűrűségű lipoprotein (HDLc), apolipoprotein A és B (ApoA és ApoB), valamint a triglicerid. A mért májenzimek: aszpartát-transzamináz (AST vagy GOT) és alanin-transzamináz (ALT vagy GPT). Egyéb specifikus markerek: kreatinin, troponin-T, kreatin-kináz MB (CK-MB) és C-reaktív protein (CRP). Aterogén-indexet (totál koleszterin/HDL), illetve ApoB/ApoA arányt is számoltunk. A szérum NT-pro-BNP szintjét „sandwich electrochemiluminescence immunoassay” (ECLIA) technikával határoztuk meg, Roche Cobas Integrated Platform segítségével.

Izolált dolgozó szív preparátum és az iszkémia/reperfúzió létrehozása patkány és nyúl modelleken

A patkányokat pentobarbitállal altattuk el (80 mg/kg ip; Abbott, Baxter Health Care, Deer Field, IL), és intravénásan heparint kaptak (500 NE/kg, Elkins-Sinn, Cherry Hill, NJ). Az *Allium ursinum* PAH vizsgálatában a kísérleti patkányokat intramuszkuláris ketamin/xilazin keverékkel elaltattuk (100/10 mg/kg). 15 perccel a beavatkozás kezdete előtt 1000 NE/kg bolus heparint adtunk intravénásan a trombózis megelőzésére.

Miután a megfelelő mértékű anesztézia beállt, a mellkast felnyitottuk, és a szívet 5 percen át perfundáltuk 37 °C-os oldattal, állandó 100 cmH₂O (10 kPa) nyomáson, retrográd Langendorff-módszer szerint. A szívizomzat kiszáradását a konstans hőmérsékleten tartott üvegedényzet (melyben a szívet felfüggesztettük) letakarásával, és állandó páratartalom biztosításával akadályoztuk meg. A perfúziós oldat egy módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer (mKH) volt (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz), amely az *Allium ursinum* PAH vizsgálatában minimálisan módosult: Az oldat összetétele 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz volt. A mosási fázis után (retrográd perfúzió 10 perc) a folyamatot a dolgozó szív módba állítottuk a korábban leírtak alapján [190, 192, 205]. A váltás úgy történt, hogy a perfúziót az aortáról a bal pitvarra állítottuk át (preload: 17 cmH₂O, afterload: 100 cmH₂O) [190, 192, 205]. 10 perc elteltével, miután az egyensúlyi szívfunkció beállt, rögzítettük a kezdeti paramétereket. Ezután az áramlást ismét retrográd módra kapcsoltuk, és a szívet 15 percig perfundáltuk az mKH pufferrel. Ezt követően 30 perc globális iszkémiát váltottunk ki, melyet 2 óra reperfúzió követett. A reperfúzió első 10 percében az áramlás retrográd módon történt, a könnyebb stabilizáció érdekében, majd anterográd módra kapcsoltuk a funkcionális paraméterek rögzítése céljából, mely a reperfúzió 30., 60., 90. és 120. percében történt.

A szívfrekvencia, koronária átáramlás, aorta kiáramlás, bal kamrai nyomás (left ventricular developed pressure, LVDP), a nyomáskülönbség/időkülönbség (dp/dt) értékeit iszkémia előtt, majd a 2 órás reperfúzió során a 30., 60., 90. és 120. percben is rögzítettük [192]. Az aorta nyomását egy nyomás transzducer (Micro-Med, Inc., USA) segítségével mértük, mely az aorta kanülhöz egy oldalágon csatlakozik, jelerősítőként Heart Performance Analyzer Model 400-at (Micro-Med, Inc, USA) használtunk. A szívfrekvencia (HR), a bal kamrai nyomás (LVDP) és dp/dt_{max} mind a folyamatos nyomás értékekből mért, származtatott adat [206]. Az aorta nyomását egy kalibrált áramlásmérővel (Gilmont Instrument INC., Barrington, IL, USA), a koronária áramlást (CF) pedig adott időközönként a szívből történő kicsöpögés meghatározásával mértük [207] (5. ábra).



5. ábra. Az izolált dolgozó szív sematikus ábrázolása.

A meggy-mag-kivonat és az *Allium ursinum* liofilizátum antiaterogén hatásainak vizsgálatában az izolált dolgozó szív, illetve az iszkémia/reperfúziós modell az alábbiakban módosult az előbbiektől: Az SCSE vizsgálatában használt nyulak a 16 hetes kísérleti időszak végén az állatoknak intravénásan heparint (1000 NE/kg) és ketamin/xilazint (40/5 mg/kg) adtunk, ami 50/5 mg/kg-ra módosult az *Allium ursinum* liofilizátum vizsgálatában. A mellkas felnyitása után, a szívet eltávolítottuk, és azonnal jéghideg perfúziós oldatba helyeztük. Az aortába kanült vezetünk, majd 100 cmH₂O (10 kPa) nyomáson Langendorff-módszer szerint a szívet 5 percen keresztül perfundáltuk (kimosási fázis). A perfuzátum egy módosított Krebs-Henseleit bikarbonát puffer volt, összetétele az SCSE kísérletben: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 0,36 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz [208].

Az mKH oldat összetétele az *Allium ursinum* vizsgálatában: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ és 10 mM glükóz. A bal pitvarba kanült vezetünk, és a Langendorff rendszert dolgozó szív módba váltottuk, egy korábban leírt patkánymodell alapján [209], melyet nyúlra optimalizáltunk [210]. A pitvari töltőnyomás 17 cmH₂O (1,7 kPa), az afterload értéke 90 cmH₂O (9 kPa) értékre lett állítva. Az aorta kiáramlást megfelelően kalibrált áramlásmérővel (Gilmont Instruments, Barrington, Illionis, Egyesült Államok), a koronária átáramlást a szívből időegység alatt kicsepegő

perfuzátum mennyiségéből mértük. A szívfunkciós paramétereket a kísérlet ideje alatt az izolált szívre közvetlenül rákapcsolt nyomásérzékelőkön és ezüst elektródokon keresztül rögzítettük (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Ausztrália). A hemodinamikai paramétereket számítógépes rendszer regisztrálta (ADInstruments, PowerLab, Castle Hill, Ausztrália). 10 perc aerob perfúziót követően a pitvari be- és az aortai kiáramlást elkötöttük, és a perisztaltikus pumpát (MASTERFLEX, Vernon Hills, Illinois, Egyesült Államok) leállítottuk. A reperfúziót az elkötések megszüntetése révén indítottuk el. A szívritmuszavarok elkerülése végett a reperfúzió első 10 perce fordított Langendorff módban történt. A kísérletből való kizárás kritériumai: 1, Kamrai szívritmuszavarok az iszkémiát megelőzően; 2, A koronária és az aorta kiáramlás 45, illetve 50 ml/perc értékeknél alacsonyabbak az iszkémia kezdete előtt.

Az izolált aortagyűrű preparátum

Az állatok leölését követően a szervek/szövetminták kivételi sorrendjében az aorta közvetlenül a szív eltávolítása, illetve a vérvétel után következett (amennyiben sor került rá). Az egyes vizsgálatok során a hasi aorta proximális részét vagy a mellkasi aorta disztális szakaszát távolítottuk el. Az aortából kb. 2 mm hosszú gyűrűket vágunk le (2-4 gyűrűt minden állatból). Az aortagyűrűket 10 mN nyugalmi feszülés mellett 10 ml-es szervkádakban (Experimetria TSZ-04, Experimetria Kft. Budapest, Magyarország) rögzítettük. A szervkádakat 95% O₂ és 5% CO₂ elegyével folyamatosan átbuborékolatott Krebs-oldattal töltöttük fel (36 °C, pH 7.4). A körkörös simaizomréteg izometriás kontrakciós erejét transzducer (Experimetria SD-01, Experimetria Kft. Budapest, Magyarország) és feszülésmérő (Experimetria SG-01D, Experimetria Kft. Budapest, Magyarország) segítségével detektáltuk. A kontrakciós erő – idő függvényeket a korábbi vizsgálatainkban hőirókaros poligráffal regisztráltuk (Medicor R-61 6CH Recorder, Medicor, Magyarország), később SPEL Advanced Isosys szoftvert (SOFT-02; MDE GmbH, Heidelberg, Németország) futtató WS-DA-02 munkaállomást (MDE Research) használtunk [197].

Ha a hosszabb protokollt használtuk, az aortagyűrűkön 60 perc inkubálást követően koncentráció-hatás görbét (E/c) vettünk fel noradrenallinnal a félhatásos koncentráció (EC₅₀) értékének meghatározása érdekében. Ezután 60 perces mosási időszak következett, majd az aortagyűrűhöz az EC₅₀-nek megfelelő koncentrációjú noradrenalintadtunk. Ha az időkeret csak a rövidebb protokollt engedte meg, a noradrenalin E/c görbe felvétele kimaradt és a továbbiakban az adott állatfajon, illetve típuson korábban meghatározott EC₅₀ értéket alkalmaztuk. Az EC₅₀-nek megfelelő noradrenalin koncentráció létrehozása után megvártuk a kontrakciós erő magasabb értéken való stabilizálódását, melynek a nyugalmi feszüléshez képesti többletét prekontrakciónak tekintettük. Ezután acetil-kolin E/c görbét vettünk fel. Ha az

adott acetil-kolin koncentráció relaxációt okozott, annak maximumát tekintettük hatásnak. Ha viszont kontrakció következett be, annak a maximumát vettük hatásnak. Az acetil-kolin hatását a prekontrakció százalékos változásaként határoztuk meg.

Ha az adott vizsgálat protokolljában ATP E/c görbe is szerepelt, az acetil-kolin E/c görbe felvétele után a preparátumokat 45 percig mostuk, azután beadtuk a noradrenalin EC₅₀-ét, a kontrakciós erő stabilizálódása után pedig felvettük az E/c görbét ATP-vel. Hatásnak az adott ATP koncentráció relaxációjának maximumát tekintettük, melyet a prekontrakció százalékában fejeztünk ki. Az azonos patkányokból származó aortagyűrűk válaszait átlagoltuk. Az E/c görbék összehasonlítása során az adott szer (acetil-kolin vagy ATP) ugyanazon koncentrációjához tartozó hatás értékeket vetettük össze az egyes kísérleti csoportok között. Egy vizsgálatunkban ezen túlmenően úgy is számszerűsítettük az NO-függő relaxációt, hogy az acetil-kolin E/c görbék adatait megtisztítottuk a magas koncentrációnál megjelenő NO-független kontrakciótól [197]. Ezt úgy kivitelezettük, hogy minden acetil-kolin E/c görbénél kiválasztottuk a maximális relaxáció értékét, majd ezt rendeltük hozzá az összes acetil-kolin koncentrációhoz, ami magasabb volt a maximális relaxációt kiváltó értéknél. Továbbá, hogy megbízhatóbb legyen a görbeillesztés, két biztosan hatástalan acetil-kolin koncentrációhoz (1 és 10 fmol/l) nulla hatást rendeltünk és ezeket is hozzáadtuk a tisztított acetil-kolin E/c görbékhez. Ezekre végül a Hill egyenletet illesztettük [211] és annak három regressziós paraméterét hasonlítottuk össze az egyes kísérleti csoportok között.

Infarktus méretének becslése *in vitro* modellen

A reperfüzió leteltekor, 37 °C-os, 1%-os (m/V%), foszfát pufferben oldott tetrazolium-kloridot injektáltunk az aorta kanülön keresztül. A szívet eltávolítást követően -70 °C-on tároltuk. Ezután a szívet az apiko-bazális tengelyre merőlegesen 2-3 mm vastag szeletekre vágtuk [212], melyek súlyát lemértük, felitattuk, tárgylemezre helyeztük, majd Hewlett-Packard Scanjet 5p szkennelrel (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, Egyesült Államok) Az infarktus méretének kvantitatív meghatározásához NIH 1.61. illetve Scion képanalizáló szoftvert használtunk. Az infarktus mérete így kvantitatíven, pixelekben kifejezhető [192] [213] [214-216].

Az ateroszklerotikus plakkok elemzése

A mellkasi artériákat eltávolítottuk, a rárakódott kötőszövetből és zsírtól megtisztítottuk, majd módosított Krebs-Henseleit pufferrel átmostuk, és 10%-os formalinban fixáltuk. Az artéria karotiszt ezután hosszanti irányban felnyitottuk, és 37 °C-os vízfürdőben 15 percen keresztül

70%-os izopropanolban oldott 5 mg/ml Sudan III festékkel kezeltük. A festést többszöri 70%-os izopropanollal végzett öblítéssel differenciáltuk. Az artériát ezután beszkeneltük, és meghatároztuk az ateroszklerotikus plakk nagyságát [208, 214].

Az aorta szövettani elemzése

A lipidfestés Oil Red O (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, Egyesült Államok) festékkel történt, a következő protokoll szerint: az aortaszövetet Optimal Cutting Temperature (OCT) médiumban (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Egyesült Államok) fagyasztottuk le. A szövetből 6 µm vastag metszeteket készítettünk Superfrost Plus lemezekre (Daiggers, Vernon Hills, IL, Egyesült Államok). Az ateroszklerotikus elváltozásokat egymástól 120 µm távolságra elhelyezkedő 3 különböző metszetben vizsgáltuk. Területenként 4-5 metszetet készítettünk, az aortaíven túl kezdve. A metszeteket Oil Red O festékkel jelöltük meg, és a léziók lipidösszetételét a Oil Red O-pozitív terület százalékos arányaként írtuk le az érfalkeresztmetszet teljes területéhez viszonyítva. A sejtmagokat hematoxilinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) festettük meg. A metszetekről videokamerával felszerelt fénymikroszkóp (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország) segítségével készítettünk képeket, és Scion Image szoftverrel analizáltuk (Scion Corp., Torrance, CA, Egyesült Államok).

A szívizomzat és tüdő szövettani elemzése

Az izolált szív vizsgálat végeztével a szívet a bal kamra középvonalában elmetszettük, és 4%-os pH 7.4 paraformaldehid-oldatban 24 órán át fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A paraffinos blokkokból 7 µm vastag metszeteket készítettünk, majd hematoxin-eozin festéssel tettük láthatóvá a szöveti struktúrát [217]. A jobb kamrai hipertrófiát (RHV) a teljes szív átlós átmetszetéből határoztuk meg a következő egyenlet segítségével: $RHV = RV / (LV + \text{interventrikuláris szeptum (IVS)})$. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott, 7 µm vastag tüdő szövet metszeteket az erezettség láthatóvá tétele szempontjából hematoxin-eozin, majd Elastica van Gieson (EVG) festéssel jelöltük [218]. A kis tüdőartériák külső átmérőit a legrövidebb görbület mentén mértük. Az érfal megvastagodását a rövidebb átmérő mentén mért falvastagságok (M1, M2) és a külső átmérő (ED) segítségével, a következő képlet alapján számítottuk: $\%MWT = (M1+M2)/ED \times 100$. Mintánként 15 artériát vizsgáltunk DFC 420 kamerával felszerelt Leica DM2500 mikroszkóp alatt, Leica Application Suite V3 szoftver segítségével (Leica Camera AG, Solms, Németország). A képeket egy, a csoportkiosztásra vak megfigyelő elemezte, az ED, M1 és M2 értékeket a Scion for Windows Densitometry Image 4.0.3.2 verziójával (Scion Corporation, Frederick, MD, Egyesült Államok) határoztuk meg.

A kardiomiociták apoptózisának meghatározása

4 µm vastag, deparaffinizált metszeteken terminális dUTP nick-vég jelölés (TUNEL) assay-t végeztünk Apop jelző kittel (Oncor) [190, 192, 205]. A nukleosomális egységekben bekövetkező specifikus DNS fragmentáció az apoptózis egyik legjellegzetesebb biokémiai folyamata. Az apoptotikus DNS fragmentáció különféle molekuláris biológiai assay-vel detektálható úgy, mint a DNS gélelektroforézis vagy a DNS nick-ek *in situ* jelölése [terminális deoxinukleotidil-transzferáz (TdT)-mediált dUTP *in situ* nick-vég jelölés (TUNEL)]. A genomikus sejthalál mértékének meghatározásához a TUNEL technikát alkalmaztuk.

A formaldehidben fixált bal kamrát paraffinba ágyasztuk, 4 µm vastag haránt irányú metszeteket készítettünk belőle, majd fokozatosan csökkenő töménységű xilol és etanol oldatokkal deparaffinizáltuk. Az apoptotikus sejteket immunhisztokémiai úton TUNEL módszerrel detektáltuk, mely során a digoxigeninnel jelölt dUTP a TdT enzim segítségével beépül a DNS-be. A TdT a nukleotid trifoszfátok templátfüggetlen beépülését katalizálja egy- vagy kétszálú DNS-szakaszok 3'-OH végére. A beépült nukleotidot poliklonális bárány anti-digoxigenin antitest jelenlétében inkubáltuk, melyet FITC-konjugált nyúlban bárány IgG-vel szemben termeltetett antitesttel való jelölés követett a gyártó előírásai szerint (Apop Tag Plus; Oncor, Gaithersburg, MD). A metszeteket (n=5 állatonként) PBS-ben háromszor átmostuk, nyúl szérummal blokkoltuk, majd egér monoklonális antitestre specifikus szarkomer aktinnal (Sigma) inkubáltuk, majd tetrametilrodamin-izotiocianát (TRITC)-konjugált nyúlban egér IgG-vel szemben termeltetett antitesttel festettük (200:1 hígítás).

A miokardiális fehérjék kivonása

300 mg, a bal kamrából kivett szívizomszövet 800 µl Buffer A-ban (25 mM Tris-HCl, pH 8. 25 mM NaCl, 4 mM Na-orthovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 nM okadálsav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF és proteáz inhibitorok (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok)) homogenizáltunk, Polytron homogenizáló segítségével. A homogenizátumokat 2.000 rpm-en és 4 °C-on 10 percen át centrifugáltuk, majd a felülúszót 10.000 rpm-en, 4 °C-on még 20 percig. A felülúszót használtuk citoszol frakcióként. A sejtmag üledéket 400 µl Buffer A 0,1% Triton-X-100 és 500 mM NaCl keverékében reszuszpendáltuk, és 1 órán át jégen hagytuk a lízishez. A homogenizátumot ezután 14.000 rpm-en, 4 °C-on 10 percen keresztül centrifugáltuk, az így kapott felülúszó a mitokondriális frakció. A citoszol mitokondriális frakciót egyenlő részekre osztottuk, és -80 °C-on tároltuk későbbi felhasználásig. A teljes fehérje koncentrációt BCA módszerrel, marha szérum albumin standard segítségével határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, Egyesült Államok).

A nukleáris és citoszolikus fehérjefrakciók elválasztása

A fehérjék elválasztása a CellLytic NUCLEAR Extraction kit (Sigma, St. Louis, MO) leírása alapján történt. Röviden, 100 mg szövetet 1 ml pufferben (100 mM HEPES (pH 7.9), 15 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 M DTT) homogenizáltunk, majd 10.000 rpm-en 20 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszót tiszta kémcsőbe helyeztük, ez volt a citoszol frakció. Az üledéket 150 µl extrakciós pufferben, mely 1,5 µl 0,1 M DTT-t és 1,5 µl proteáz inhibitor keveréket tartalmazott, újra szuszpendáltuk. 30 percig jégen állni hagytuk, időnként felrázva, majd 20.000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót egy hideg, tiszta kémcsőbe szívtuk, ez volt a nukleáris fehérje frakció. A citoszol és nukleáris teljes fehérje koncentrációt BCA fehérje assay kit-tel határoztuk meg (Pierce, Rockville, IL).

Western blot

A szövetminták homogenizálása és szuszpendálása az alábbi összetételű pufferben történt (50 mg/ml): (50mg/ml): 10 mM HEPES, pH 7.3, szukróz 11,5%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, diisopropil-fluorofoszfát (DFP), pepstatin A 0,7 mg/ml, leupeptin 10 mg/ml, aprotinin 2 mg/ml. A homogenizálást Polytron-homogenizátor segítségével (IKA-WERKE, Staufen, Németország) végeztük. A bromelainnal végzett kísérletben a fehérjék elválasztása CellLytic NUCLEAR Extraction kit (Sigma, St. Louis, MO) leírása alapján történt. 100 mg szövetet 1 ml pufferben (100 mM HEPES (pH 7.9), 15 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 M DTT) homogenizáltunk, majd 10.000 g-n 20 percen keresztül centrifugáltuk. Az üledéket 150 µl extrakciós pufferben, mely 1,5 µl 0,1 M DTT-t és 1,5 µl proteáz inhibitor keveréket tartalmazott, újra szuszpendáltuk. 30 percig jégen állni hagytuk, időnként felrázva, majd 20.000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót egy hideg, tiszta kémcsőbe szívtuk, ez volt a nukleáris fehérje frakció. A medvehagymával és BGP-15-tel végzett kísérletek során a fehérjehomogenizátumokat 300 mg mintából 800 µl Buffer A (25 mM Tris-HCl, pH 8. 25 mM NaCl, 4 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 nM okadánsav, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF és proteáz-inhibitor elegye (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) felhasználásával készítettük, a centrifugálás a medvehagyma kísérlet esetében 2.000 rpm-en 10 percen át történt, majd a felülúszót 10.000 rpm-en még 20 percig centrifugáltuk. A sejtmag üledéket 400 µl Buffer A 0,1% Triton-X-100 és 500 mM NaCl keverékében reszuszpendáltuk, és 1 órán át jégen hagytuk a lízishez. A homogenizátumot ezután 14.000 rpm-en, 4 °C-on 10 percen keresztül centrifugáltuk, az így kapott felülúszó a volt mitokondriális frakció. A BGP-15-tel végzett kísérletben a fehérjehomogenizátumot 10.000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk fel. A hiperkoleszterinémiás nyulakon végzett kísérletben a

homogenizáláshoz használt oldat összetétele 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, proteáz-inhibitor és desztillált víz volt, a centrifugálást 10000g-n 20 percig végeztük.

Az egyes frakciók fehérje koncentrációját BCA módszerrel (Pierce, Rockford, IL, Egyesült Államok, illetve QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Németország), marha szérum albumin standard segítségével határoztuk meg automata spektrofotométerrel (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország). Ezt követően a fehérjéket Laemmli pufferrel hígítottuk, és 100 °C-on 10 percig forraltuk.

A fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) futtattuk, jellemzően 7% és 10%-os gélt használtunk. A niacin-kötött krómmal és meggy-mag-kivonattal végzett kísérletekben ez az arány 12% volt, a BGP-15 és a hiperkoleszterinémias nyulak esetében 10, 12 és 18%. Az elektroforézis 120 V feszültséggel, 90 percen át tartott. A szétválasztott fehérjéket elektroforetikus transzferáltuk Immobilon-P membránokra (Millipore Corp., Bedford, MA), vagy a meggy-mag-kivonattal, medvehagymával, BGP-15-tel és hiperkoleszterinémias nyulakkal végzett kísérletekben nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA) egy félszáraz transzferáló rendszer alkalmazásával (Bio-Rad, Hercules, CA) (100 V, 1 óra, vagy a BGP-15 kísérlet esetében 25 V, 90 perc). Fehérjestandardokat (Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio-Rad, Hercules, CA) minden gélen futtattunk. A patkányokon végzett medvehagymás kísérlet során a fehérjestandard ProSieve QuadColor volt (Lonza, Rockland, MA, Egyesült Államok). A blotokat Tris-pufferelt sóoldat/Tween-20-ban (Tris-buffered saline, TBS-T összetétel: 20 mM Tris bázis, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0,1% Tween –20) blokkoltuk 1 órán keresztül, melyhez 5% (m/V%) zsírszegény tejet (a hiperkoleszterinémias nyulak és a BGP-15 kísérlet esetében 3% BSA-t) adtunk. A TBS-T összetétele a meggy-mag-kivonattal végzett kísérlet esetében enyhén eltért a többitől: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. A blotokat egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on, a meghatározott primer antitestekkel. A membránokat háromszor mostuk TBS-T-vel az inkubációt megelőző 1 órában tormaperoxidáz kapcsolt másodlagos antitestekkel, melyeket 1:2000 arányban TBS-T-ben oldottuk, kiegészítve 5% (m/V%) zsírszegény tejjel. A meggy-mag-kivonattal és medvehagymával végzett kísérletekben a TBS-T 1% zsírmentes tejport tartalmazott. Ezt követően a membránokat háromszor TBS-T-vel mostuk, minden mosás között 10 perc inkubációs időt tartva.

A primer antitest kötődést a szekunder antitest tormaperoxidáz konjugációja és a megnövelt kemilumineszcencia tette láthatóvá. A blotokat kemilumineszcens reagenssel kezeltük (Enhanced Chemi-Luminescence, ECL from Amersham) és a vizsgált fehérjéket eltérő hosszúságú idő alatt Kodak X-Omat film segítségével detektáltuk. A beszkenelt membránok kvantitatív elemzését a Scion Densitometry Image program 4.0.3.2. verziójával (Scion Corporation, Maryland, Egyesült Államok) végeztük el. A meggy-mag-kivonattal és a

medvehagymával végzett nyúl kísérletben a fehérjék detektálása Medical X Ray filmre (Agfa-Gevaert N.V., Belgium) történt. Utóbbi kísérletben az ECL szubsztrát is különböző volt (ECL, Litmus Scientific, Advansta Inc., Menlo Park, CA, Egyesült Államok). A patkányokon végzett medvehagyma kísérletben a kemilumineszcenciát Western Lightning Plus szubsztráttal végeztük el (PerkinElmer, Waltham, MA, Egyesült Államok), míg a BGP-15 és a hiperkoleszterinémias nyulakon végzett kísérletekben WesternBright reagenst alkalmaztunk (Advansta Inc., Menlo Park, USA). A digitális képalkotás a patkányokon végzett medvehagyma kísérletben MF-Chemibis 3.2 rendszerrel történt (Central European Biosystems; Budapest, Magyarország), a BGP-15 és hiperkoleszterinémias nyúl kísérletben pedig C-Digit blot scanner és Image Studio Digits ver. 5.2. szoftver (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) segítségével. Utóbbi két esetben a szkennelt fehérjék kvantitatív analízise ImageJ szoftver (ver. 1.51k., National Institutes of Health, USA) segítségével történt. Az egyes fehérjékre vonatkozó sávok jelintenzitását tetszőleges egység \pm SEM alakban számítottuk és ábrázoltuk.

A Western blothoz használt primer antitestek a következők voltak: Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS, FOXO3A (Cell Signaling, Danvers, MA), p-AMPK, Trx-1, HSP-25, HSP-32, HSP-70 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), HO-1 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, illetve Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, Michigan, USA), SOD1, PDE5A, COXIII (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), VEGF (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, illetve R&D System, Inc., Minneapolis, MN), PDE9A, PKG, PLB, p-PLB, SERCA2a, VASP, p-VASP (Abcam Plc., Cambridge, UK). A citoszólikus összfehérjék meghatározásához GAPDH-t, a mitokondriális fehérjékhez COXIV-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a nukleáris fehérjékhez Hiszton H3-at használtunk kontrollként (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), [44, 219].

Immunhisztokémia β -catenin transzlokációjáról és a kapilláris denzitásról

A β -catenin elhelyezkedésének tisztázásához a paraffinba ágyazott miokardiális szövetszekciókat vizsgáltuk. Ehhez monoklonális, β -catenin ellenes antitestek 1:500 arányú hígítását használtuk (BD Transduction Labs, Lexington, KY). A kötődött antitesteket Vectastain ABC kittel (Vector Laboratories, Burlingame CA) detektáltuk és DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) felhasználásával tettük láthatóvá. A korábban leírt műtéti eljárás után 7 nappal, az állatokat extermináltuk, a szívet eltávolítottuk, a kapilláris denzitás tanulmányozásához pedig paraffinba ágyazott szekciókat készítettünk. A kapilláris denzitás meghatározáshoz, a szekciókat PECAM-1 elsődleges antitesttel (Santa Cruz) jelöltük meg, a kötődött antitestet Vectastain ABC kittel (Vector Laboratories, Burlingame CA) detektáltuk és DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) segítségével vizualizáltuk [219]. A CD-31 számoláshoz 400 X nagyítású képeket készítettünk. A kvantitatív mérésekhez, a CD-31 mennyiségét az

érintett területen, a bal kamra szabad falának középső részéig, az endokardiumtól egészen az epikardiumig meghatároztuk. Adobe Photoshop Software-t használtunk, mely minden egyes képünkre egy morfometrikus rácsot helyez, így az értékeket mm²-ben kapjuk.

A nagy energiájú foszfátvegyületek vizsgálata

Az adenzin-trifoszfát és kreatin-foszfát assay, magas nyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) történt [220].

Az *Allium ursinum* liofilizációja (WGLL) és analízise

Fagyasztott *Allium ursinum* leveleket (Töltelékgyár Kft., Zalakomár, Magyarország) 24 órán át liofilizáltunk Martin-Christ ALPHA 1-4 fagyasztva szárítóval (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Németország). A környezeti nyomás 0,120 millibar, a kondenzátor -50 °C, a belső hőmérséklet 35 °C-ra volt beállítva. A fagyasztott minta aránya a friss és szárított növényhez viszonyítva 5:6:1 volt. A liofilizált minta HPLC analízise Waters 600 készülékkel történt (Waters Corporation, Milford, CT, Egyesült Államok). A kontrollként használt alliant az LGC Standards vállalattól, a kromatográfiás analízishez az acetonitrilt (LiChrosolv®) a gyártójától (Merck Consumer Health Holding GmbH, Darmstadt, Németország) szereztük be. A HPLC méréshez szükséges tisztított vizet a Millipore Direct-Q UV3 készülék (Merck Millipore, Molsheim, Franciaország) állította elő. A méréshez használt alliin standard törzsoldatokat metanolban készítettük elő, és 4 °C-on tároltuk. A kalibrációs tartomány 0,5-5 µg alliin/befecskendezés volt. A kalibrációs görbe felvételéhez az alliant háromszori ismétléssel, hat különböző térfogatban fecskendeztük be. Az alliin kivonása 10 ml MeOH felhasználásával történt, 1 g liofilizált mintából, szobahőmérsékleten, ultrahangos fürdőben, 3 percen át. Filteren (Acrodisc® GHP 13 mm, 0,45 µm, Waters Corporation, Milford, CT, Egyesült Államok) való átszűrést követően az analízis háromszori ismétléssel, három, egymástól függetlenül vett mintából történt.

Citokróm c oxidáz (COX) aktivitás meghatározása

A nyúl szívizomzat citokróm c oxidáz aktivitását specifikus kolorimetriás assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) segítségével mértük meg. A szívizomzattól MITOISO1 kittel (Sigma-Aldrich, St. Louis) a mitokondriális frakciót izoláltuk, majd ditiotreitól kezeléssel redukáltuk a citokróm c-t, melyet a COX újra oxidált. A COX aktivitását a ferrocitokróm c abszorbanciájának csökkenése jellemzi, ahogy az enzim hatása révén oxidált állapotba kerül. A COX aktivitását a szobahőmérsékleten (~22 °C), 550 nm-en mért (UV Helios

Alpha S2 spektrofotométer) abszorbancia időegység alatt bekövetkező csökkenésével adtuk meg (-A 550/perc).

A vízdékony vegyületek antioxidáns kapacitásának (ACW) meghatározása

Az ACW-t kereskedelmi forgalomban kapható kit (kit szám: 846-60002-0, Analytik Jena AG, Jena, Németország) segítségével határoztuk meg. A szabadgyököket UV besugárzással generáltuk egy fotoszenzitív vegyületből. A PhotoChem a szabadgyökök gátlását méri a minta ACW tartalmából. Az ACW kit részei a R1, R2, R3 és R4 reagens. Az R1 és R2 használatra kész, 2-8 °C-on tárolandó, az R3 vegyület liofilizált, és -20 °C-on tároljuk. 750 µl R2 vegyületet adtunk az R3 reagenshez. Az R4 reagensből törzsoldatot készítettünk, 490 µl R1 vegyületet és 10 µl H₂SO₄-t adtunk az R4 reagenshez. A törzsoldatból tízszeres hígításokat készítettünk (10 µl R4 törzsoldat+990 µl R1 oldat). Először a vakot készítettük elő: 1500 µl R1, 1000 µl R2 és 25 µl R3 reagenst összekeverve. A kalibrációt L-aszorbinsav standard felhasználásával, 0,1 és 2 nmol között (legalább 5 ponton) végeztük. A plazma mintát 10.000 rpm-en, 5 percig centrifugáltuk, és a felüliszót használtuk a mérésekhez. A méréshez használt oldat 1490 µl R1, 1000 µl R2, 25 µl R3 és 10 µl minta felhasználásával készült.

A lipidoldékony vegyületek antioxidáns kapacitásának (ACL) meghatározása

Az ACL-t kereskedelmi forgalomban kapható kit (kit szám: 849-60004-0, Analytik Jena AG, Jena, Németország) segítségével határoztuk meg. A módszer nagyon hasonló az ACW-nél leírtakhoz. Az ACL kit részei a R1, R2, R3 és R4 reagens. Az R1 és R2 használatra kész, 2-8 °C-on tárolandó, az R3 vegyület liofilizált, és -20 °C-on tároljuk. 750 µl R2 vegyületet adtunk az R3 reagenshez. Az R4 reagensből törzsoldatot készítettünk, 500 µl R1 vegyületet adtunk az R4 reagenshez, és tízszeres hígításokat készítettünk (10 µl R4 törzsoldat+990 µl R1 oldat). Először a vakot készítettük elő: 2300 µl R1, 200 µl R2 és 25 µl R3 reagenst összekeverve. A kalibrációt trolox standard felhasználásával, 0,2 és 3 nmol között (legalább 5 ponton) végeztük.

cGMP assay

A bal kamrai cGMP szint meghatározása direkt kompetitív immunoassay (Abcam Plc., Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével történt. A hígítási sor elkészítése után a miokardium mintákat (n=6/csoport, minden mérést duplán végeztünk el) 0,1 M-os sósavban (HCl) homogenizáltuk. Minden lépést a gyártó ajánlása szerint végeztünk. A plate-hez kötődő kompetitív cGMP-HRP konjugátumok mennyiségének meghatározását 450 nm-en spektrofotométerrel végeztük. A kapott értékeket átlagoltuk és az eredményt pmol/mg szövet-

ben fejeztük ki, végül Student's t-tesztet használtunk a Kontroll és HC csoportok közötti különbségek becslésére.

Statisztikai elemzés

Az eredményeket általában számtani közép \pm S.D. (standard deviáció), vagy számtani közép \pm S.E.M. (standard hiba, vagyis az átlagtól való átlagos eltérés) formában fejeztük ki. Az adatok normális eloszlását D'Agostino-Pearson és/vagy Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük.

Két adathalmazt normális eloszlások esetén párosítatlan, kétmintás, Student-féle t-teszttel (homogén varianciák mellett) vagy párosítatlan, kétmintás, Welch-korrigált t-teszttel (ha a varianciák szignifikánsan különböztek) hasonlítottunk össze. Két adathalmazt, ha az adatok nem Gauss-féle eloszlást mutattak, Mann-Whitney-teszttel vetettünk össze. Kettőnél több adathalmazt normális eloszlások esetén egyutas varianciaanalízis (ANOVA) teszttel elemeztünk (ha a varianciák szignifikánsan különböztek és a használt szoftver lehetővé tette, Geissner-Greenhouse korrekcióval), melyet Bonferroni vagy (miután a használt szoftver megengedte) Tukey *post hoc* teszt követett. Ha az adatok nem voltak normális eloszlásúak, kettőnél több adathalmazt Kruskal-Wallis teszttel és Dunn *post hoc* teszttel hasonlítottunk össze.

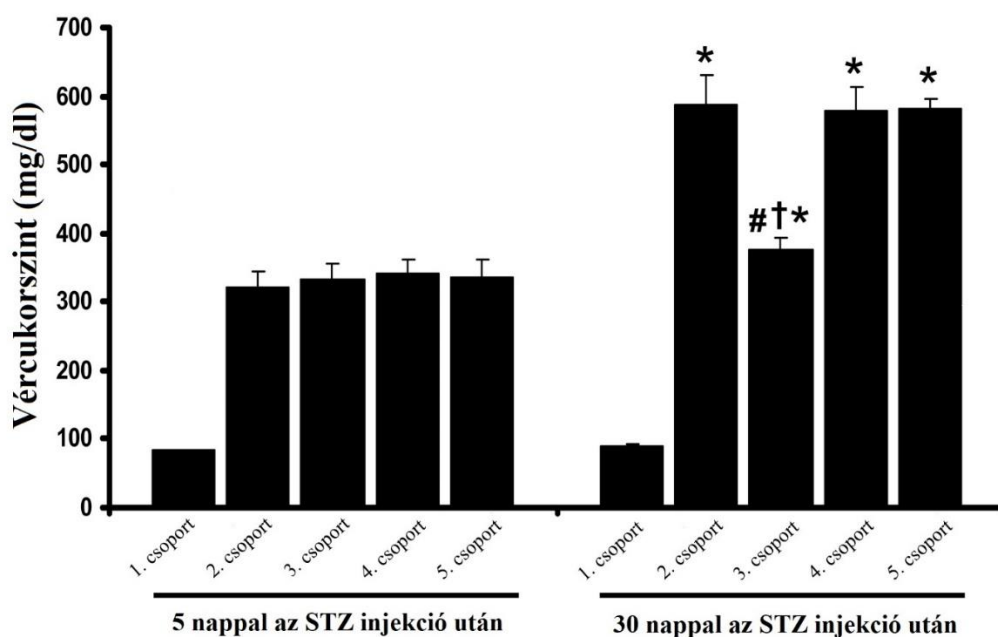
A vizsgált csoportok középértékeinek különbségét $p < 0,05$ esetén tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai szignifikancia szintjét a csillagok (vagy más szimbólumok) számával jeleztük: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ill. néhány esetben **** $p < 0,0001$.

Az USA-ban végzett vizsgálatokhoz az IBM SPSS Statistics program aktuális verzióját (10-22) használtuk. A magyarországi elemzéshez a GraphPad Prism szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Egyesült Államok) aktuális verzióját (4-9) alkalmaztuk.

Eredmények I.

Resveratrol hatása a vércukorszintre

A vércukor értékeket 5 nappal az STZ kezelést követően mértük meg és összehasonlítottuk a kontroll állatokéval, hogy megbizonyosodjunk az emelkedett cukorszintekről. ≥ 300 mg/dl értékek esetén tekintettük az állatokat diabéteszesnek. Az STZ kezelést követően az állatokat 15 napon keresztül resveratrol és L-NAME *per os* kezelésben részesítettük. Megmértük az állatok vércukorértékeit (n=12 csoportonként), hogy a hiperglikémia mértékét meghatározzuk. A vércukor értékek szignifikánsan megemelkedtek a diabéteszes állatokban (>500 mg/dl) a nem diabéteszesekkel összehasonlítva (90 mg/dl). A resveratrol kezelés a beteg csoportban jelentősen csökkentette a vércukorszintet (370 mg/dl) a diabéteszes csoportokhoz képest. Az L-NAME kezelt csoport mérsékelte a resveratrol-mediált vércukorszint csökkentést (6. ábra).

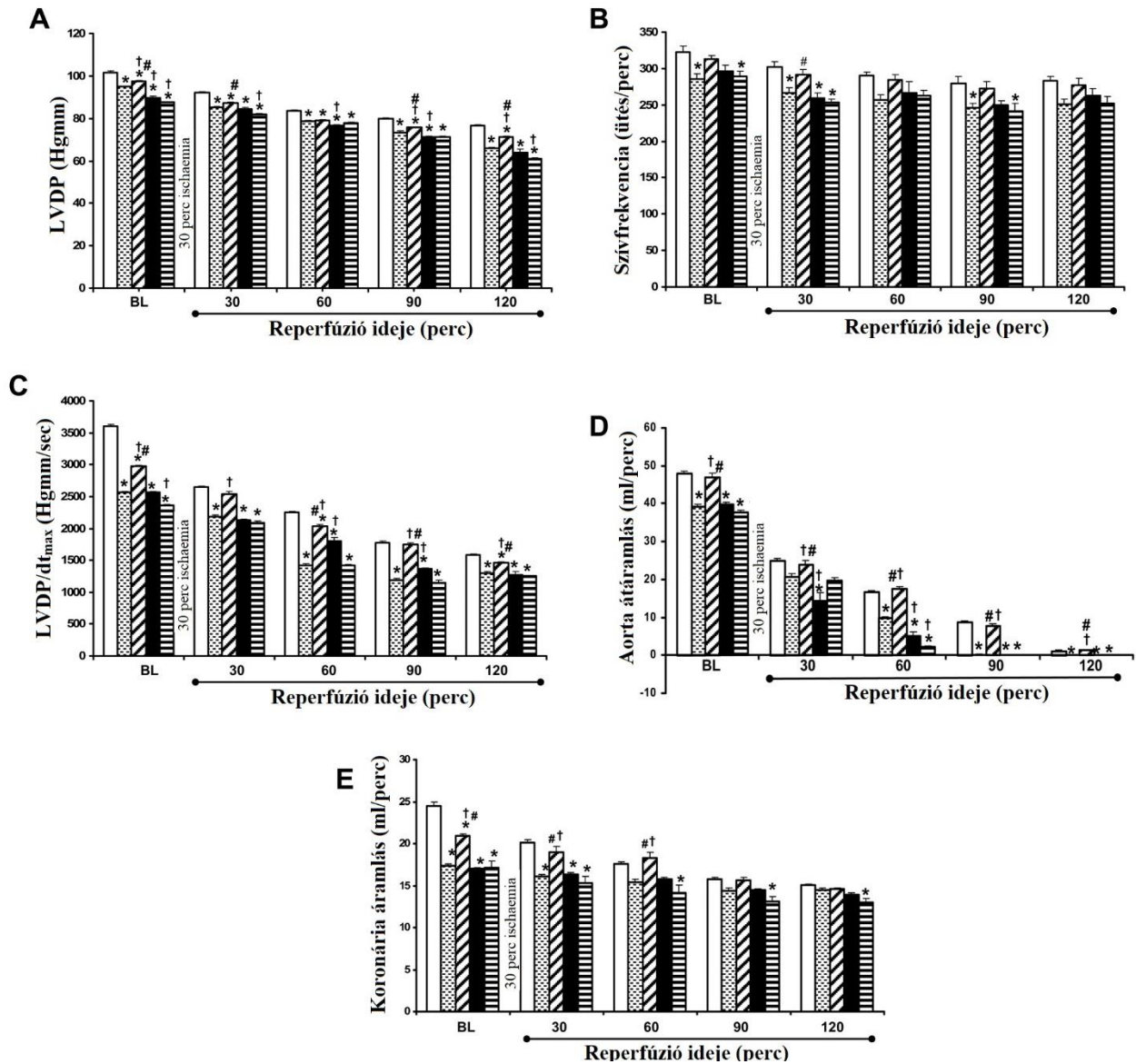


6. ábra. Resveratrol hatása a vér glükóz szintre

Az eredmények átlag \pm SEM formában vannak kifejezve (n=6) * $p < 0,05$ a 2., 3., 4., 5., csoport vs 1.csoport; † $p < 0,05$ 3., 4.,5., csoport vs 2. csoport; # $p < 0,05$ 3. csoport vs 4., és 5. csoport. 1. csoport - kontroll (egészséges) állatok, 2. csoport – diabéteszes állatok, 3. csoport – diabéteszes állatok resveratrol kezeléssel, 4. csoport – diabéteszes állatok resveratrol + L-NAME kezeléssel, 5. csoport – diabéteszes állatok L-NAME kezeléssel.

A csoportok között jelentős különbség volt a kiindulási értékek tekintetében. A bal kamrai nyomás (7A ábra) szignifikánsan alacsonyabb volt a Dia csoportokban ($94,83 \pm 0,30$) a nem diabéteszes kontrollal összehasonlítva ($101,72 \pm 0,50$). A resveratrol kezelés jobban megtartotta a LVDP értékét a Dia+Rsvl csoportban ($97,66 \pm 0,30$) a diabéteszes csoporthoz képest. Az LVDP reperfúziót (2 óra) követően szignifikánsan csökkent a diabéteszes csoportban ($66,75 \pm 0,79$), a resveratrol kezelés ugyanakkor a Dia+Rsvl csoportban jelentősen emelte a LVDP értékét ($71,15 \pm 0,34$) a diabéteszes csoporthoz képest. Szintén csökkent a LVDP az L-NAME kezelt csoportokban: Dia+Rsvl+L-NAME ($63,96 \pm 1,48$) és Dia+L-NAME ($60,83 \pm 0,60$).

A dp/dtmax kiindulási értékek a diabéteszes beteg csoportban ($2561,33 \pm 19,14$) jelentősen csökkentek a nem diabéteszes kontroll csoporthoz képest ($3597,33 \pm 34,09$). A resveratrollal kezelt diabéteszes patkányok esetén (7C ábra) megemelkedett a dp/dtmax ($2971,66 \pm 20,79$) a diabéteszes csoporttal összevetve. A 2 órás reperfúziót követően a dp/dtmax jelentősen csökkent a diabéteszes csoportban ($1300,43 \pm 18,25$), ehhez képest a Dia+Rsvl csoportban szignifikánsan emelkedett (1457 ± 21). A L-NAME kezelés csökkentett funkcionális visszatérést eredményezett mind a Dia+Rsvl+L-NAME ($1275 \pm 44,94$), mind pedig a Dia+LNAME ($1256 \pm 5,60$) csoportokban. A kiindulási aorta kiáramlás értékek (7D ábra) szignifikánsan csökkentek a diabéteszes csoportban ($39 \pm 0,49$) a nem diabéteszes kontrollokkal összehasonlítva ($43,50 \pm 0,62$). A resveratrol kezelés segítette az aorta kiáramlás intakttságának megőrzésében a Dia+Rsvl csoportban ($42,30 \pm 1,11$) a diabéteszes állatokkal összehasonlítva. A 2 órás reperfúziót követően az aorta kiáramlás nulla volt a diabéteszes, Dia+Rsvl+L-NAME, Dia+L-NAME csoportokban. A Dia+Rsvl csoportban szignifikáns volt az aorta kiáramlás ($1,30 \pm 0,16$) a többi csoporthoz képest. A szívfrekvencia és a koronária áramlás szintén szignifikánsan megtartottabb volt a Dia+Rsvl csoportban a diabéteszes kontrollokhöz képest mind a kiinduláskor mind a reperfúziót követően (7B és 7E ábrák). Az L-NAME kezelés minden esetben gátolta a resveratrol-mediált kardioprotekciót, ezzel is megerősítve a hipotézist, miszerint ez a protektív hatás nitrogén-monoxid mediált.



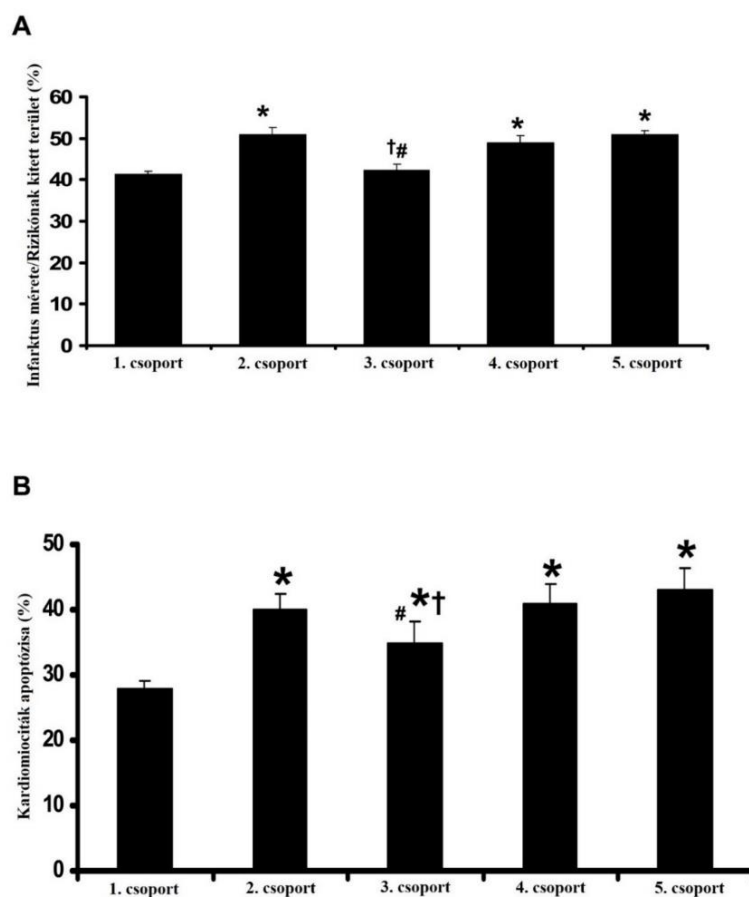
7. ábra. A-E. Resveratrol hatása az LVDP (A), Szívfrekvencia (B), dp/dtmax (C), Aorta kiáramlás (D) és koronária átfolyás (E) értékeire STZ-indukált diabéteszes patkányokon

Az 5 csoport állataiból (n=6) származó izolált szívminiókat 30 perc globális iszkémiának és az azt követő 2 órás reperfüzióknak vetettük alá. Az eredmények átlag ± SEM formában vannak kifejezve. *p<0,05 2., 3., 4., 5., csoport vs 1.csoport; †p<0,05 3., 4.,5., csoport vs 2. csoport; #p<0,05 3. csoport vs 4., és 5. csoport.

Fehér üres oszlop - 1. csoport (kontroll), Pontozott oszlop – 2. csoport (diabéteszes állatok), széles felfelé átlós oszlop – 3. csoport (diabéteszes állatok resveratrol kezeléssel), fekete oszlop – 4. csoport (diabéteszes állatok resveratrol + L-NAME kezeléssel), sötét vízszintes csíkozású oszlop – 5. csoport (diabéteszes állatok L-NAME kezeléssel).

*Resveratrol hatása a miokardiális infarktus méretére, illetve a kardiomiociták apoptózisára
TUNEL assay-vel vizsgálva*

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a resveratrol kezelés csökkenti-e a kardiális szövetkárosodást iszkémia/reperfúzió esetén, megmértük a miokardiumok miokardiális infarktusának kiterjedtségét. A 8A ábrán látható a százalékban kifejezett infarktus a teljes rizikónak kitett területhez viszonyítva, mely jól mutatja a diabéteszes csoportban tapasztalt növekedést (51%) a nem diabéteszes csoporthoz viszonyítva (41%). Az infarktus mérete szignifikánsan csökkent a Dia+Rsvl csoportban (42%) az összes többi csoporthoz képest, ugyanakkor a resveratrol kezelés esetén nem találtunk jelentős különbséget a nem diabéteszes kontroll csoporttal összehasonlítva. Az L-NAME kezelés esetén 47% volt a Dia+Rsvl+L-NAME csoport és 49% a Dia+L-NAME csoport esetén az infarktus. Antitestként α -szarkomer aktint használva, kettős antitest jelöléssel (8B ábra) végzett TUNEL assay-t alkalmaztunk a kardiomiociták apoptózisának megállapítására. A diabéteszes miokardiumban emelkedett az apoptózis mértéke (40%) a nem diabéteszes csoporthoz képest (28%). A resveratrol jelentősen csökkentette az apoptózist 40%-ról (diabéteszes csoport) 35%-ra. A csökkentés hátterében a foszforilált Akt és eNOS expresszió fokozódása is állhat. Az L-NAME kezelés esetén a Dia+Rsvl+L-NAME 41%, míg a Dia+L-NAME 43%-nak mutatkozott (8B ábra).



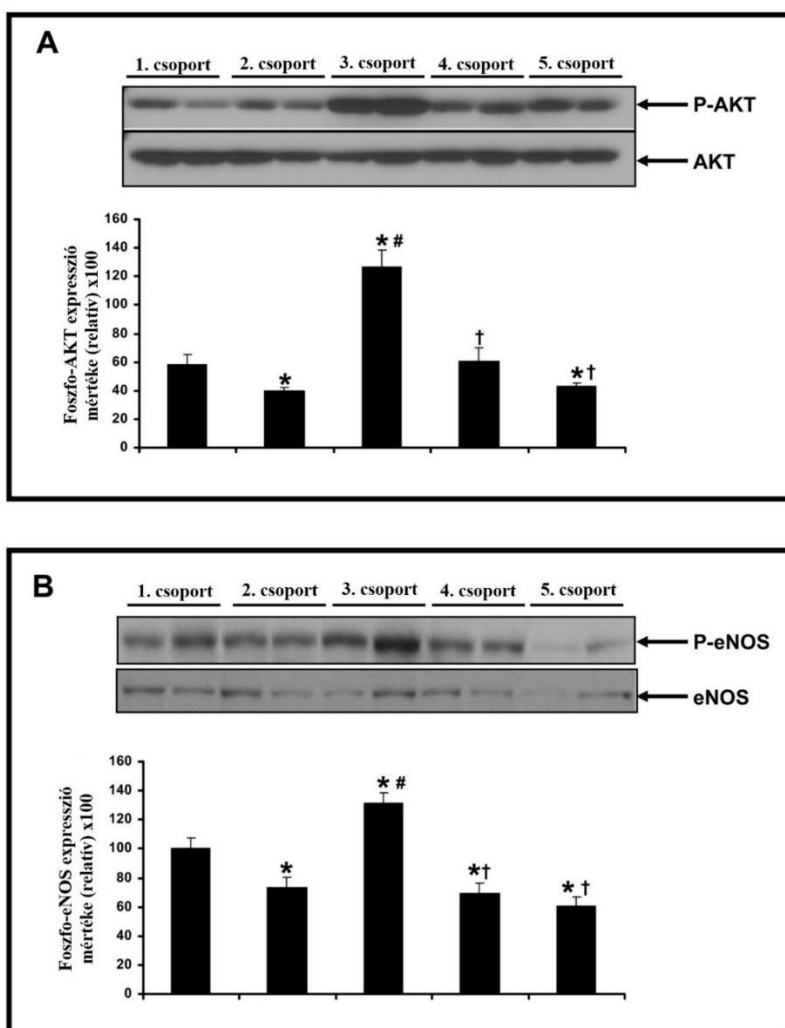
8. ábra. A: resveratrol hatása az infarktus méretére. B: resveratrol hatása a kardiomiociták apoptózisára

Az 5 csoport állataiból (n=6) származó izolált szív mintákat 30 perc globális iszkémiának és az azt követő 2 órás reperfúciónak vetettük alá. Az eredmények átlag \pm SEM formában vannak kifejezve (n=6) *p<0,05 2., 3., 4., 5., csoport vs 1.csoport; †p<0,05 3., 4.,5., csoport vs 2. csoport; #p<0,05 3. csoport vs 4., és 5. csoport. 1. csoport - kontroll állatok, 2. csoport – diabéteszes állatok, 3. csoport – diabéteszes állatok resveratrol kezeléssel, 4. csoport – diabéteszes állatok resveratrol + L-NAME kezeléssel, 5. csoport – diabéteszes állatok L-NAME kezeléssel.

Resveratrol hatása az Akt és eNOS foszforilációjára, illetve a Trx-1, HO-1 és VEGF fehérjék expressziójára

A 30 perc iszkémia-2 óra reperfúziót követően, a resveratrol kezelt csoportban a p-Akt szintje emelkedett volt a diabéteszes és nem diabéteszes kontroll csoporttal összevetve (9A ábra). Ugyanakkor a diabéteszes és nem diabéteszes csoport között nem mutatkozott statisztikailag különbség. Az L-NAME kezelt csoportokban (Dia+Rsvl+L-NAME és Dia+L-NAME) csökkent az Akt foszforilációja a Dia+Rsvl csoporthoz képest. Az L-NAME gátolta a resveratrol medált p-Akt upregulációt (9A ábra). Ehhez hasonlóan, a 30 perc iszkémia-2 óra reperfúzió utáni eNOS szintek (9B ábra) is emelkedtek a resveratrol hatására a diabéteszes és L-NAME (Dia+Rsvl+L-NAME, Dia+L-NAME) kezelt csoportokban. A diabéteszes és nem diabéteszes kontroll állatok között nem volt különbség. A foszforilált állapotok load kontrolljaként az Akt és eNOS szinteket is megmértük. A resveratrol kezelés esetén kialakult (Dia+Rsvl), emelkedett p-Akt és p-eNOS szinteket a diabéteszes miokardiumban fellépő stressz indukálta foszforilálatlan Akt és eNOS indukció is előidézhette, melyek következményesen csökkentették az apoptózis mértékét a kardiomiocitákban, valamint az infarktus kiterjedtségét. A diabéteszes csoportban a Trx-1 kiindulási értékei emelkedést, míg iszkémia/reperfúziót követően csökkentést mutattak. A Dia+Rsvl csoportban a Trx-1 expresszió (10A ábra) az iszkémia/reperfúziót megelőzően és követően is emelkedést mutatott a többi csoporthoz képest. A diabéteszes csoportban tapasztalt kiindulási Trx-1 értéket a diabéteszes állapot miatt kialakuló stressz indukálta kompenzációs mechanizmus is okozhatta. Az iszkémia/reperfúziót követő Trx-1 expresszió csökkenésének hátterét nem ismerjük és nem is vizsgáltuk. A Trx-1 expresszió szignifikánsan csökkent a Dia+Rsvl+L-NAME és Dia+L-NAME csoportokban a Dia+Rsvl csoporthoz képest. A HO-1 expresszió (10B ábra) a kiindulási időpontban és iszkémia/reperfúziót (10E ábra) követően is alacsonynak bizonyult a diabéteszes csoportban. A resveratrol hatására (Dia+Rsvl) a HO-1 expresszió már a kiindulási értéknél is emelkedett volt és ez az iszkémia/reperfúziót követően is megmaradt a kontroll csoporthoz képest. Dia+Rsvl+L-NAME és Dia+L-NAME kezelésekre hatására csökkent a HO-1 expresszió a

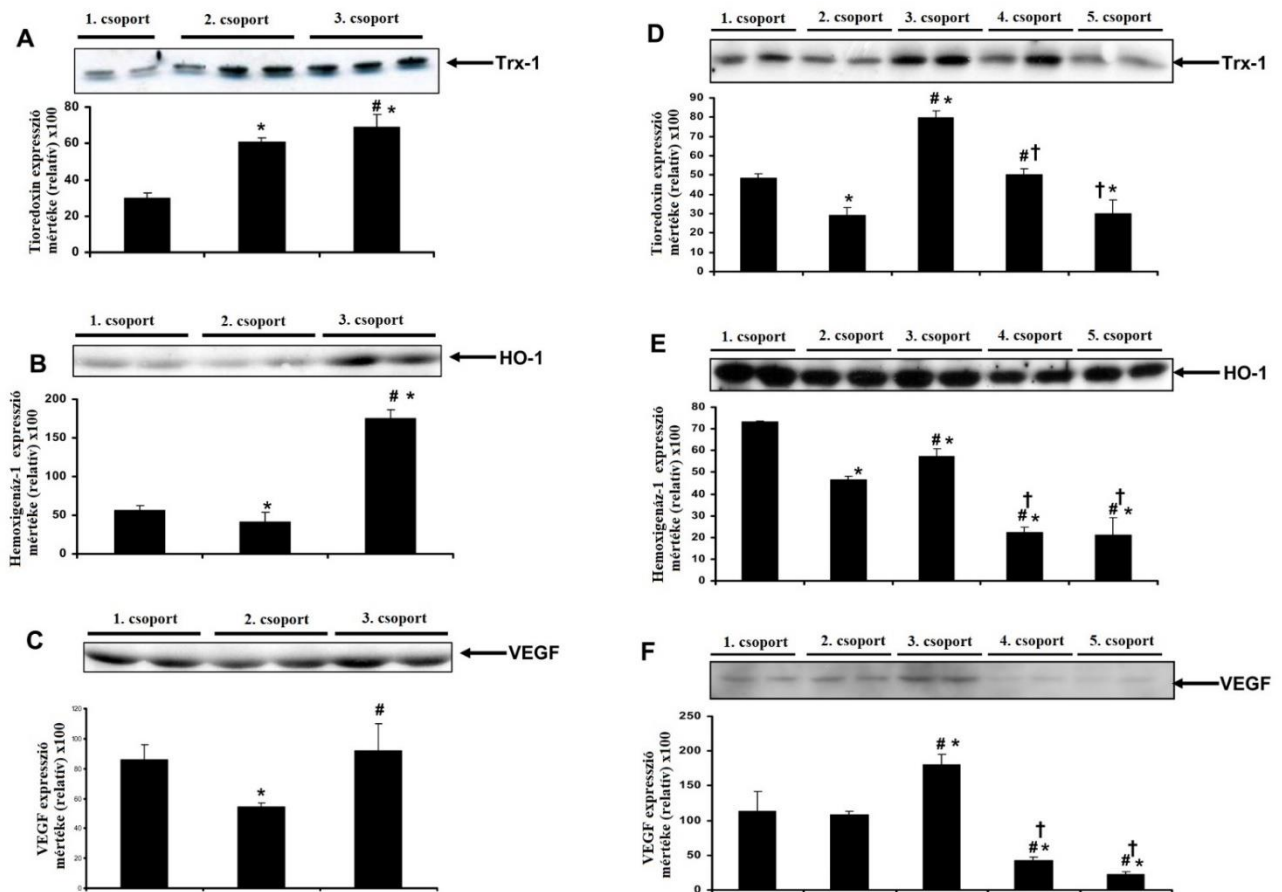
Dia+Rsvl csoportokhoz képest. A Dia+Rsvl csoportokban emelkedett VEGF fehérje expressziót tapasztaltunk kiindulást (10C ábra) és iszkémia/reperfúziót követően (10F ábra) is a diabéteszes és nem diabéteszes kontroll csoportokhoz képest. Csökkent a VEGF expresszió a diabéteszes csoportban a nem diabéteszes kontroll csoporthoz képest. Iszkémia/reperfúziót követően csökkent a L-NAME kezelt csoportok (Dia+Rsvl+L-NAME és Dia+L-NAME) VEGF expressziója a Dia+Rsvl csoporttal összehasonlítva. Az L-NAME itt is gátolta a resveratrol-mediált VEGF expressziót, alátámasztva, hogy a VEGF expresszió szintén nitrogén-monoxid mediált. Housekeeping kontrollként GAPDH-t használtunk.



9. ábra. Resveratrol hatása az Akt (A) és az eNOS (B) foszforilációjára streptozotocin-indukált diabéteszes, iszkémia/reperfúziós patkány szíven.

Minden csoport (n=6) szív mintáit izolációt követően 30 perc globális iszkémiának és az azt követő 2 órás reperfúzió alá vetettük. * $p < 0,05$ 2., 3., 4., 5., csoport vs 1. csoport; † $p < 0,05$ 3., 4., 5., csoport vs 2. csoport; # $p < 0,05$ 3. csoport vs 4., és 5. csoport.

1. csoport - kontroll állatok, 2. csoport – diabéteszes állatok, 3. csoport – diabéteszes állatok resveratrol kezeléssel, 4. csoport – diabéteszes állatok resveratrol + L-NAME kezeléssel, 5. csoport – diabéteszes állatok L-NAME kezeléssel.



10. ábra. Resveratrol kezelés hatása a Trx-1, HO-1 és VEGF expressziókra streptozotocin-indukált diabéteszes patkány szíven kiinduláskor (A-C), illetve a szívek 30 perc iszkémia-2 óra reperfúzióját követően (D-F).

* $p < 0,05$ 2., 3., 4., 5., csoport vs 1.csoport; † $p < 0,05$ 3., 4., 5., csoport vs 2. csoport; # $p < 0,05$ 3. csoport vs 4., és 5. csoport. 1. csoport - kontroll állatok, 2. csoport – diabéteszes állatok, 3. csoport – diabéteszes állatok resveratrol kezeléssel, 4. csoport – diabéteszes állatok resveratrol + L-NAME kezeléssel, 5. csoport – diabéteszes állatok L-NAME kezeléssel.

Eredmények II.

Resveratrol és statinok hatása a lipidszintekre

A HC csoportban a koleszterin, trigliceridek, LDL értékek emelkedtek, míg a HDL értékek csökkentek a kontroll állatokhoz képest. A resveratrol kezelés szignifikánsan csökkentette a koleszterin, triglicerid és LDL értékeket a HC csoporthoz képest. A HCS és HCRS kezelés pedig még ígéretesebbnek bizonyult a HCR-hez képest, lipidcsökkentő hatás tekintetében (1. táblázat).

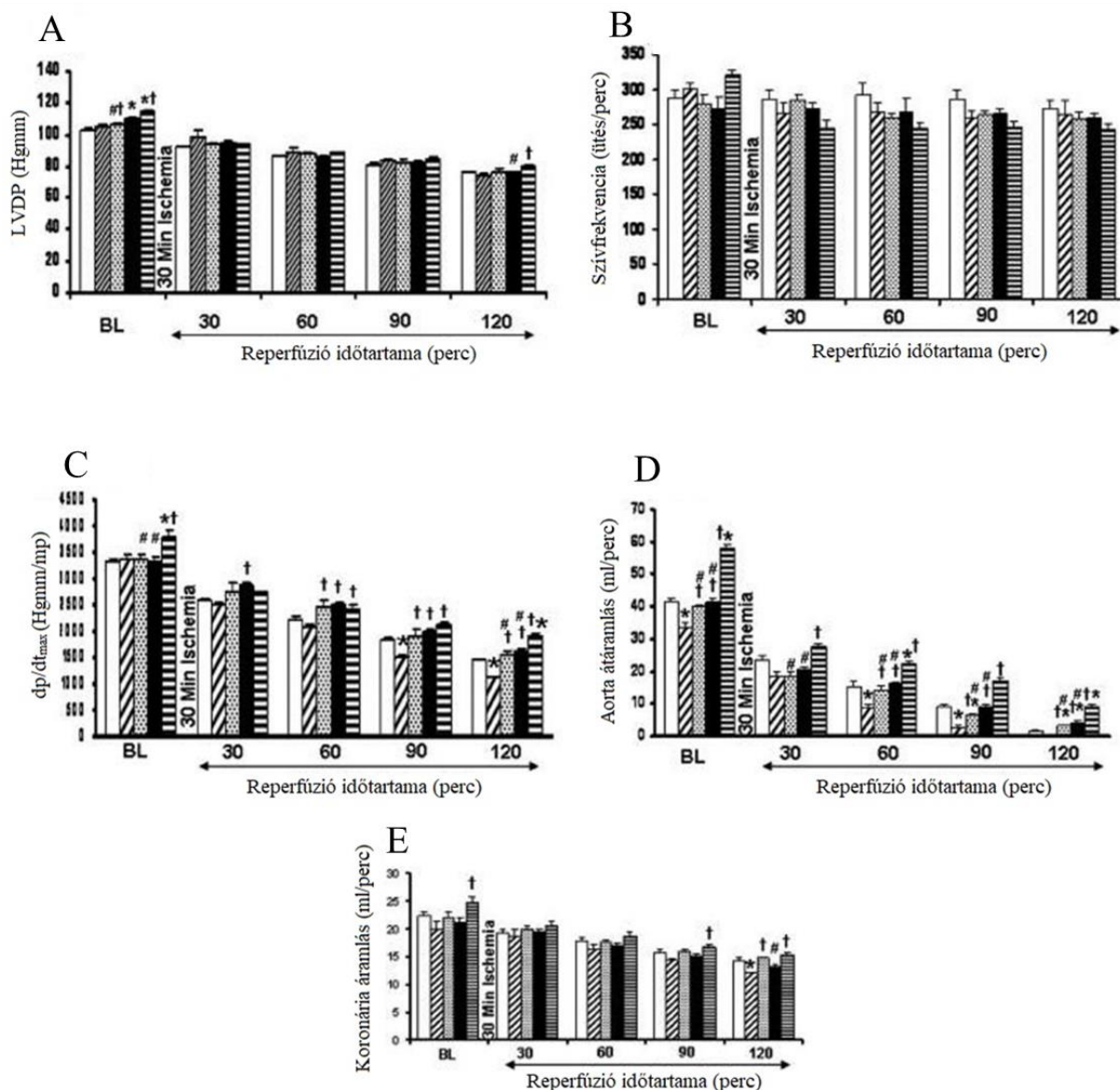
Sorszám	Csoport	Koleszterin (mg/dl)	Triglicerid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
1	Kontroll	86,34±3,38	78,83±2,34	41,67±3,62	29,00±3,21
2	HC	142,83±4,16*	150,67±3,14*	26,65±2,80*	86,03±4,70*
3	HCR	101,16±3,18* [†]	96,67±2,74* [†]	34,00±1,68* [†]	47,83±2,93* [†]
4	HCS	94,16±7,14 [†]	92,83±2,48* [†]	41,83±2,31 [†] #	33,76±4,21 [†] #
5	HCRS	87,66±4,22 [†] #	85,00±2,82* [†] # ^ψ	42,00±3,22 [†] #	28,67±2,34 [†] #

1. táblázat. A resveratrol és a statin hatása a lipidszintekre.

Az eredmények átlag ± SD formában vannak kifejezve. *p<0,05 az 1. csoporttal összehasonlítva, [†]p<0,05 a 2. csoporttal összehasonlítva, [#]p<0,05 a 3. csoporttal összehasonlítva, ^ψp<0,05 a 4. csoporttal összehasonlítva. Csoportok megnevezése a táblázat 2. oszlopában.

Resveratrol és statinok hatása a szívfunkciókra

A kiindulási értékek tekintetében nem minden csoport között volt különbség a kezelt és a HC csoport kardiális funkció (LDVP – Hgmm), szívfrekvencia (ütés/perc), dp/dt (Hgmm/sec), koronária áramlás (ml/min) és aorta kiáramlás (ml/min) értékei között. Az aorta kiáramlás iszkémia előtti alacsony értéke is mutatta a modell érzékenységét a hiperkoleszterinémiára, valamint a kezelések hatékonyságát a baseline (iszkémia/reperfúzió előtti) paraméterekre. Iszkémiát követően viszont, a reperfúzió alatt a kardiális funkcióban jelentős különbség volt a kezelt csoportok és a HC között. Emellett szignifikáns különbség volt reperfúzió alatt a dp/dtmax és az aorta kiáramlás között is a kezelt és a HC csoportokat összehasonlítva. A 120 perces reperfúziót követően a dp/dtmax poszt-iszkémiás értékek jelentősen megemelkedtek minden kezelt csoportban a HC-vel összehasonlítva (1127,83±16,10): [HCRS (1926,83±43,24), HCR (1556,66±65,47), HCS (1635,66±40,36)]. Ehhez hasonlóan, az aorta kiáramlása is szignifikáns emelkedést mutatott a kezelt csoportokban, összehasonlítva a HC értékeivel. Noha a funkcionális visszatérés a HCR és HCS csoportokban is jelentős volt, a HCRS kezelés még eredményesebbnek bizonyult a monoterápiákkal összehasonlítva ebben a kérdésben. Így a resveratrol és a statinok szignifikáns javulást mutattak a posztiszkémiás miokardium funkcióinak visszatérésében a HC csoporttal összehasonlítva (11A-11E). Ugyanakkor óvatosan azt is megjegyezhetjük, hogy jelen esetben a kombinált terápia bizonyult a legígéretesebbnek a monoterápiákkal szemben, ami nagyon sok jelenlegi ajánlásnak megfelel.



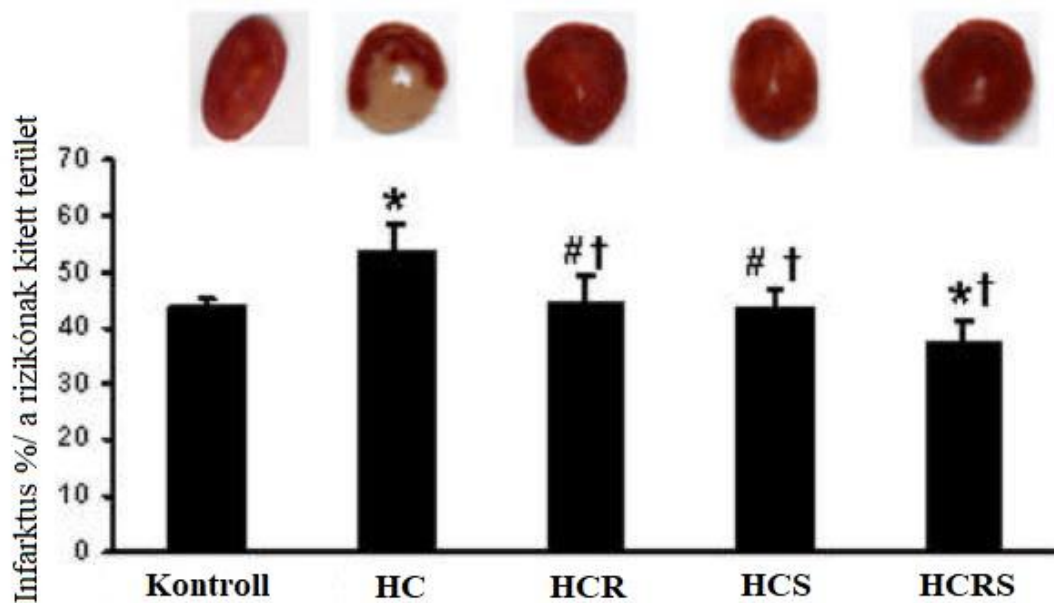
11. ábra. A-E. Posztisztkémiás kamrai recovery resveratrol és statin kezelés hatására hiperkoleszterinémiás patkányokon, kontrollal összehasonlítva.

Az eredmények (LVDP-11A, szívfrekvencia-11B, +dp/dt-11C, aorta kiáramlás-11D, koronária áramlás-11E) 6 állat/csoportra vonatkoznak. * $p < 0,05$ a kontroll csoporttal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a hiperkoleszterinémiás csoporttal összehasonlítva, # $p < 0,05$ a HCRS csoporttal összehasonlítva. Az üres oszlop a kontroll csoportot, a sötét, felfelé átlós oszlop a hiperkoleszterinémiás csoportot, a szaggatott vízszintes oszlop a resveratrol kezelt csoportot, a sötét oszlop a statin kezelt csoportot, a sötét vízszintes vonalas oszlop pedig a kombinált kezeléssel csoportot reprezentálja. BL: baseline, azaz az iszkémia/reperfúzió előtti

Resveratrol és statinok hatása az infarktus méretére

A HC csoport esetén a szív által elszenvedett, 30 perces globális iszkémia, majd az azt követő 2 órás reperfúzió jelentősen megnövelte az infarktus kiterjedését (vagyis a teljes rizikónak kitett területhez viszonyítva az infarktus méretét), összehasonlítva a kezelt csoportokkal. Az értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a HCRS, HCS és HCR csoportokban ($37 \pm 3,6$, $43 \pm 3,3$ and $44 \pm 4,2$) a HC csoportokhoz képest ($53,74 \pm 4,6$) (12. ábra). Pontosabban, a

kombinációs terápia még hatékonyabbnak bizonyult az infarktus méretének csökkentésében ($37\pm 3,6$) a statin ($43\pm 3,3$) és a resveratrol ($44\pm 4,2$) monoterápiákkal összehasonlítva.



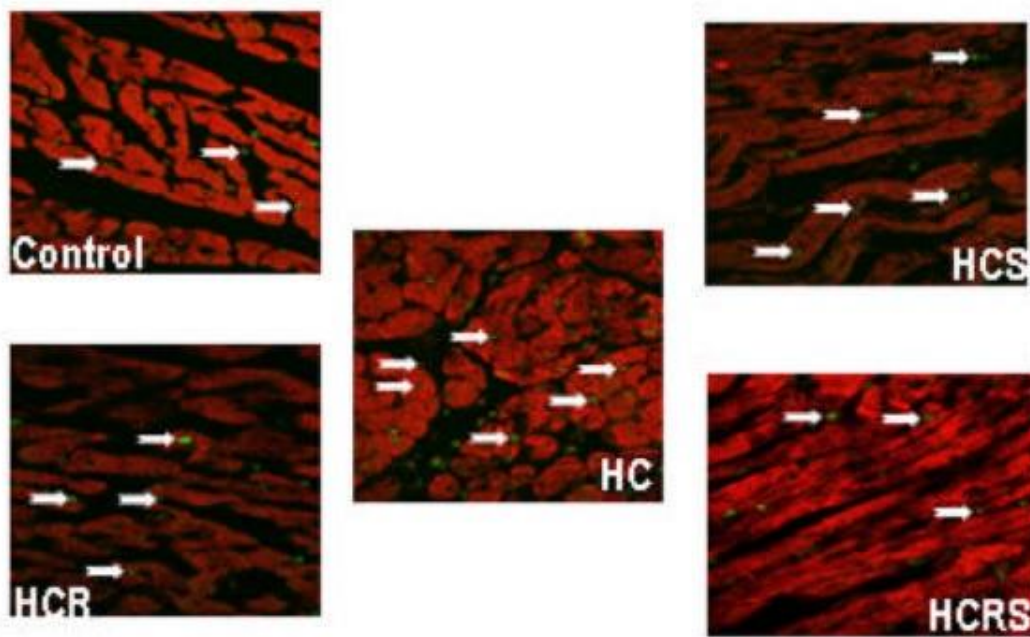
12. ábra. A szívinfarktus mérete %-ban kifejezve, az egész rizikónak kitétt területhez viszonyítva, 30 perc iszkémiát, 2 óra reperfúziót követően.

Az eredmények átlag \pm SD formában kifejezve 6 állat/csoportra vonatkoznak. * $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a HC csoporttal összehasonlítva, # $p < 0,05$ a HCRS csoporttal összehasonlítva.

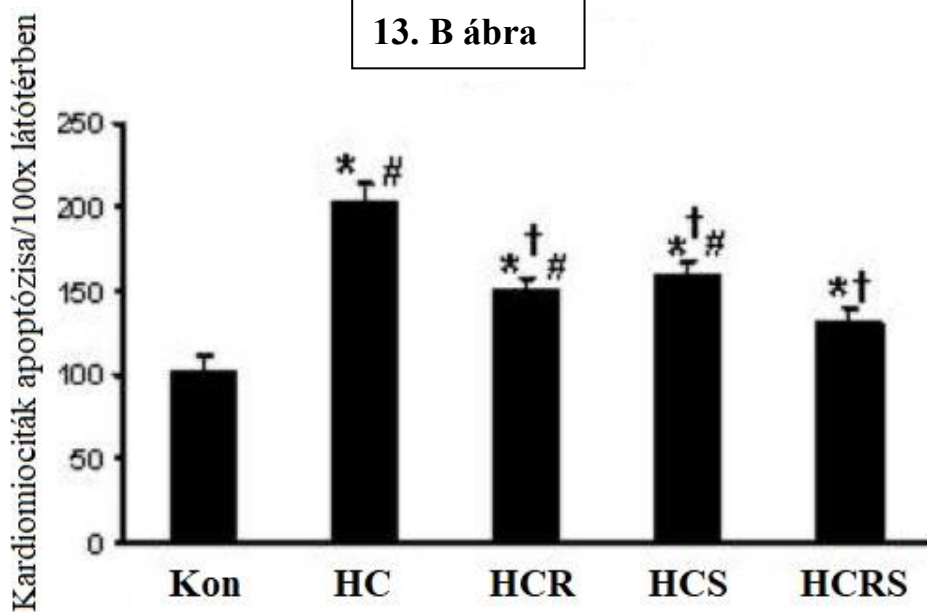
Resveratrol és statinok hatása a kardiomiociták apoptózisára

Jelentős csökkenés mutatkozott a kardiomiociták apoptózisában a HCR, HCS és HCRS csoportokban a HC csoporthoz viszonyítva (13. ábra). Ahogyan várható volt, a csökkenés jelentősebb volt a kombinált terápiaiban a monoterápiákkal összehasonlítva. Ismételtén, a statinok és a resveratrol kombinációjának maximális hatása szignifikánsan eredményesebbnek bizonyult a kardiomiociták védelmében, mint a két hatóanyag külön alkalmazva.

13. A ábra

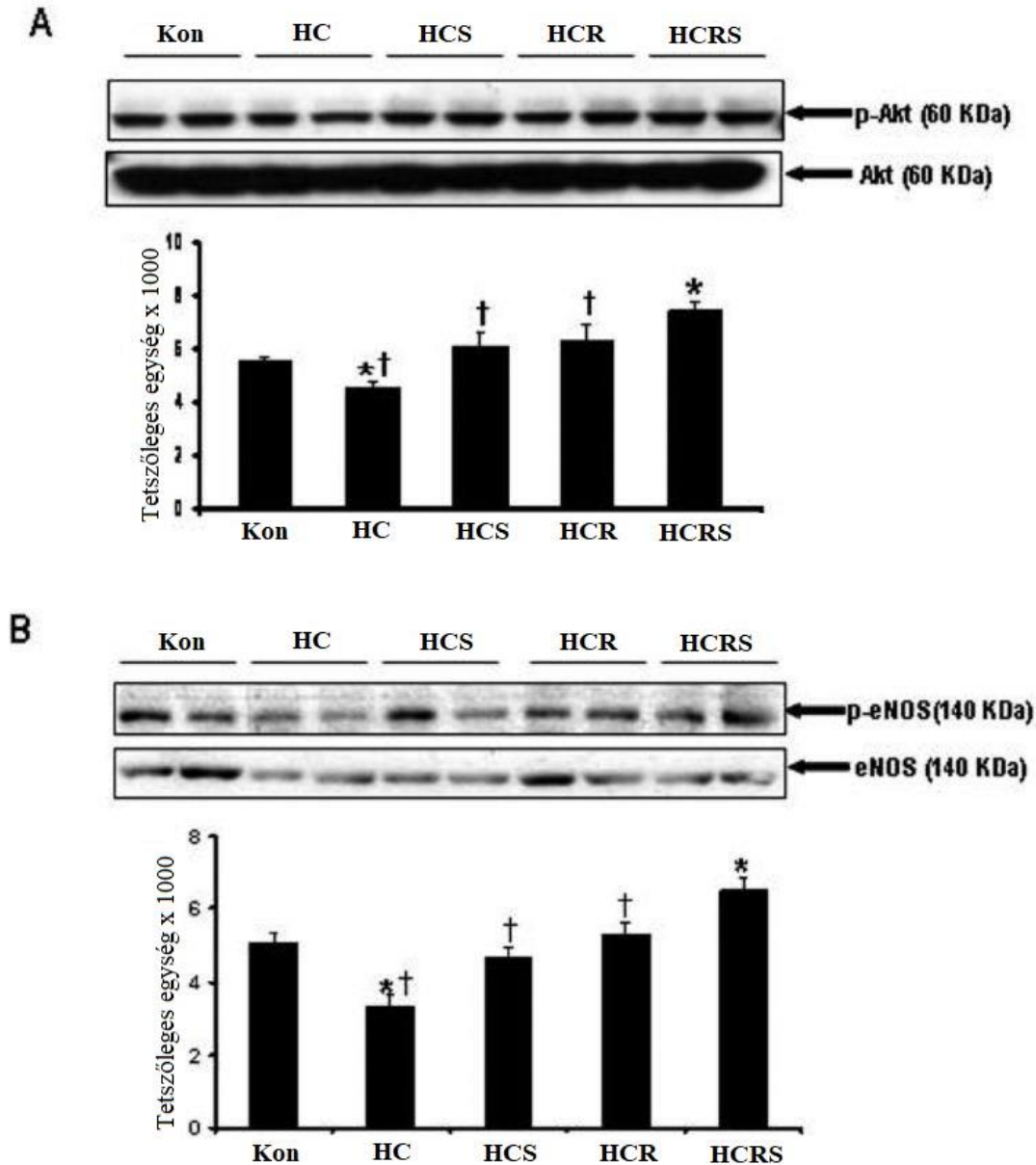


13. B ábra



13. ábra. Kardiomiociták apoptózisa TUNEL assay-vel. A: a kardiomiociták apoptózisa az egyes csoportokban. B: a kardiomiociták apoptózisa grafikusán. Az értékek a kardiomiociták apoptózisát mutatják a 100x nagyítású látótérben. Az eredmények átlag \pm SD. formában kifejezve 6 állat/csoportra vonatkoznak. * $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a HC csoporttal összehasonlítva, # $p < 0,05$ a HCRS csoporttal összehasonlítva.

A foszforilált Akt és eNOS szintje csökkent a HC kezelés hatására a kontrollhoz képest. A resveratrol és a statin kezelés szignifikánsan növelte az Akt és eNOS foszforilációt minden kezelt csoportban a HC csoporttal összehasonlítva (14A és 14B ábrák). A foszforiláció szignifikánsan magasabb volt a kombinált terápiában, mint monoterápiák esetén.

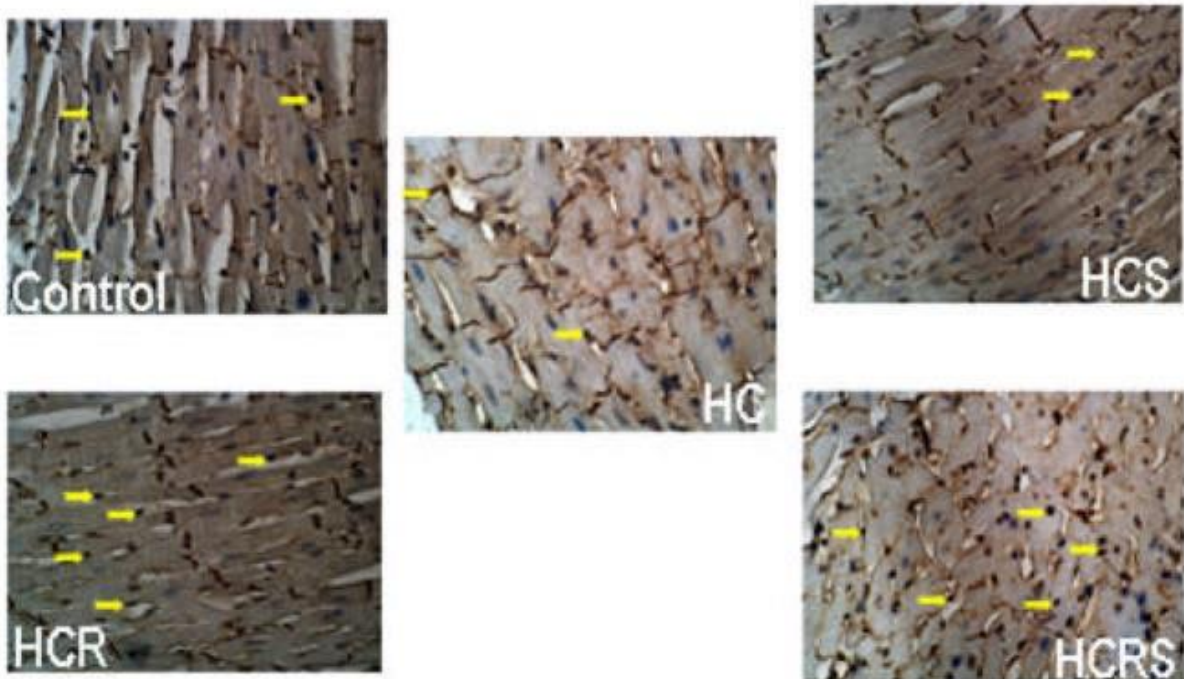


14. ábra. A Western blot analízisek eredményei. A: Foszforilált Akt és foszforilálatlan Akt expressziója, ill. a foszforilált Akt expressziója grafikusán.

* $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a HCRS csoporttal összehasonlítva.

B: Foszforilált eNOS és foszforilálatlan eNOS expressziója, ill. a foszforilált eNOS expressziója grafikusán. * $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a HCRS csoporttal összehasonlítva.

Iszkémia/reperfúziót követően szignifikáns nukleáris β -catenin transzlokációt tapasztaltunk HCR, HCS és HCRS csoportokban a HC kezeléssel összehasonlítva. A transzlokáció jelentősebb volt a HCR csoportban a HCS és HCRS kezelésekhez képest (15. ábra). Noha a kombinált kezelés (HCRS) esetén a transzlokáció valamennyivel a HCR alatt maradt, ugyanakkor jelentősen növekedett a statin kezelt csoporttal összehasonlítva.

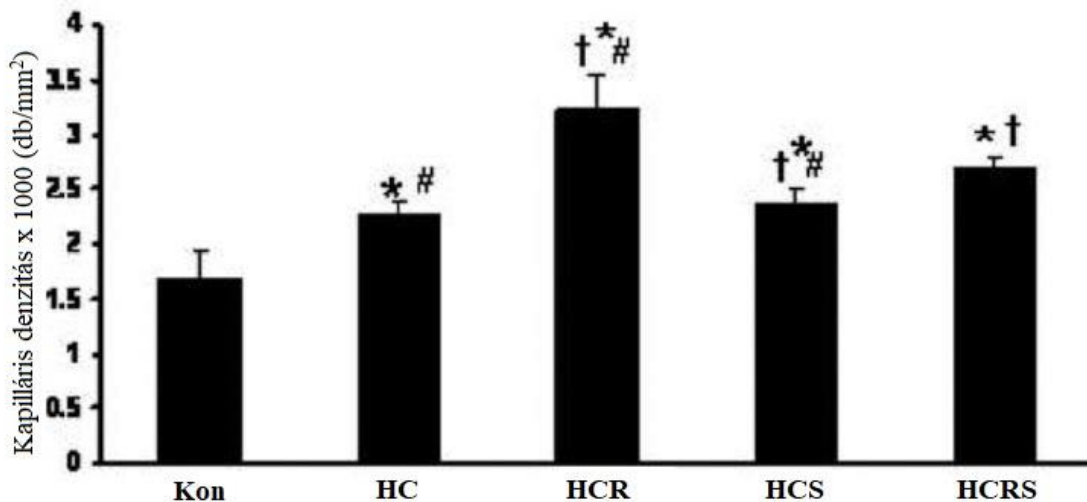


15. ábra. β -catenin immunhisztokémiai jelölése.

A sejtmagokat hematoxilinnel festettük. A nyilak a β -catenin sejtmagba történő transzlokációját mutatják az egyes csoportok esetén.

Resveratrol és statinok hatása a kapilláris denzitás mértékére

A CD-31 meghatározására 400X-os nagyítás mellett, 8, egymással átfedésben nem lévő, infarktusmentes területet vizsgáltunk. Minden szívből 4 szekciót elemeztünk. Minden kezelt csoportban emelkedett kapilláris denzitást tapasztaltunk a kontroll és HC csoportokhoz képest. Az emelkedés szignifikáns volt a HCR csoportban a HCS és a HCRS csoportokhoz képest, korrelálva a VEGF expresszióval, megerősítve az észrevételünket, miszerint az emelkedett CD-31 a resveratrol angiogenezist fokozó hatásából adódhat. A kombinációs terápia jelentős emelkedést mutatott a statin kezeléshez képest, ugyanakkor alulmaradt az individuális resveratrol kezeléssel szemben (16. ábra).



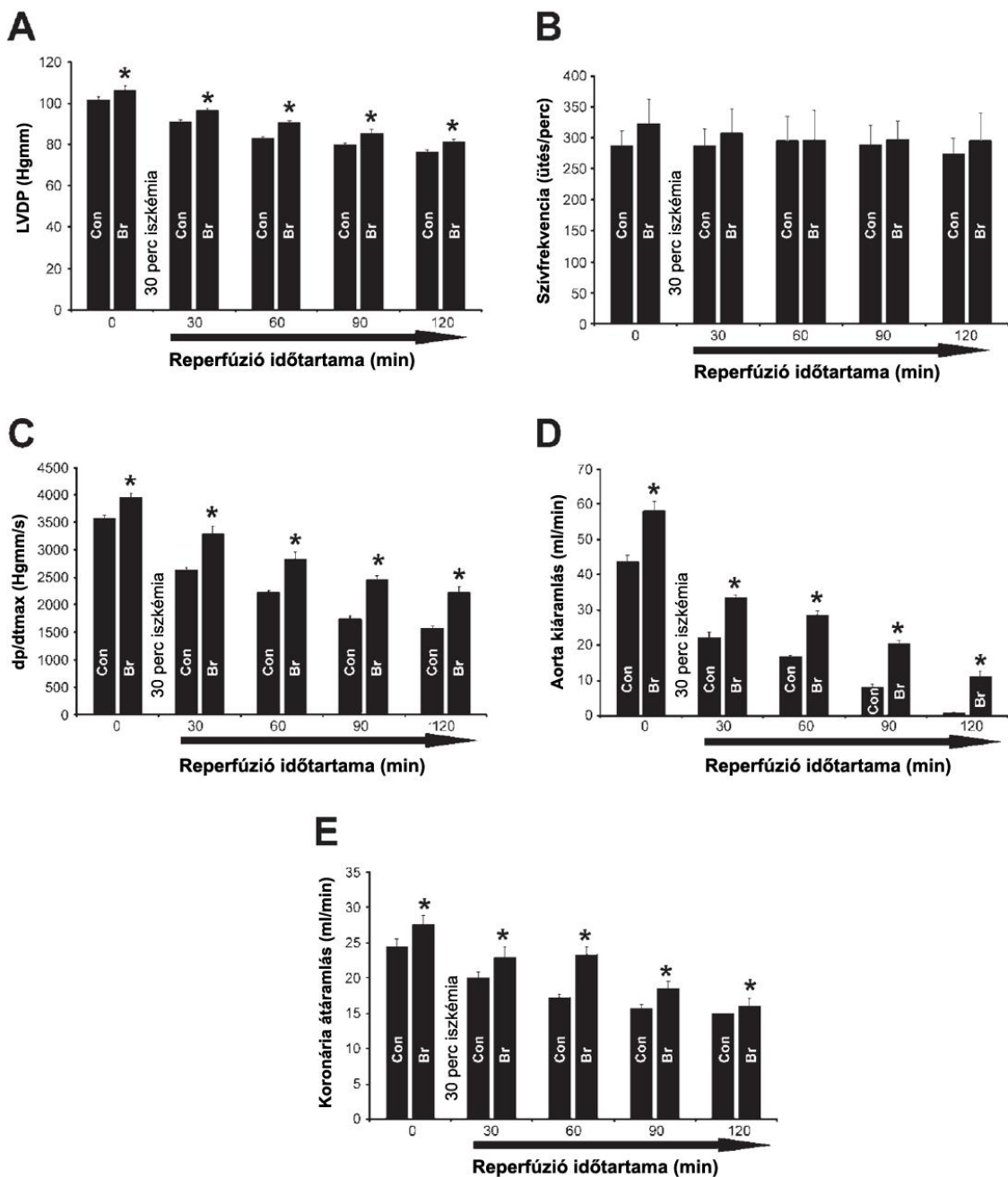
16. ábra. A statin és a resveratrol hatása a kapilláris denzitásra.

A kapilláris denzitás kvantitatív analízise peri-infarktusos területen, 7 nappal a miokardiális infarktus után. Az eredmények átlag \pm SD szórásban kifejezve 6 állat/csoportra vonatkoznak. * $p < 0,05$ a kontrollal összehasonlítva, † $p < 0,05$ a HC csoporttal összehasonlítva, # $p < 0,05$ A HCRS csoporttal összehasonlítva.

Eredmények III.

A bromelain hatása a miokardiális funkciókra

A Br csoportban már az iszkémiát megelőzően is szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetőek a dp/dt_{max} , LVDP, AF és CF értékekben a kontroll állatokhoz képest (17. ábra). A szívfrekvenciában az iszkémia előtt, illetve után sem találtunk szignifikáns eltérést. A Br-kezelt csoportban az LVDP szignifikánsan növekedett mind baseline-ban, mind az iszkémiát követő reperfúzió 30 perces értékénél, a kontrollhoz képest. A dp/dt_{max} a szív kontrakciós erejének jó jelzője, amely megmutatja, hogy mekkora erőt képes generálni a szív a vér kipumpálásához a kamrákból. A Br csoportban a dp/dt_{max} már az alapállapotban emelkedett volt. 120 perc reperfúziót követően (17C ábra) a dp/dt_{max} posztiszkémiás értékei szignifikánsan magasabbak voltak (2,225 vs. 1,578 mmHg/s) a kezeletlen patkányokhoz hasonlítva. Hasonló mintázatot figyeltünk meg az AF (11 vs. 1,0, 17D ábra) és a CF (17E ábra.) esetében is a kontroll csoporthoz viszonyítva.



17. ábra A bromelain (Br) hatásai a bal kamrai nyomásváltozásra (LVDP), (A), szívfrekvenciára (B), nyomásnövekedés maximális sebességére (dp/dt_{max} , C), aorta kiáramlásra (D) és a koronária átváramlásra (E).

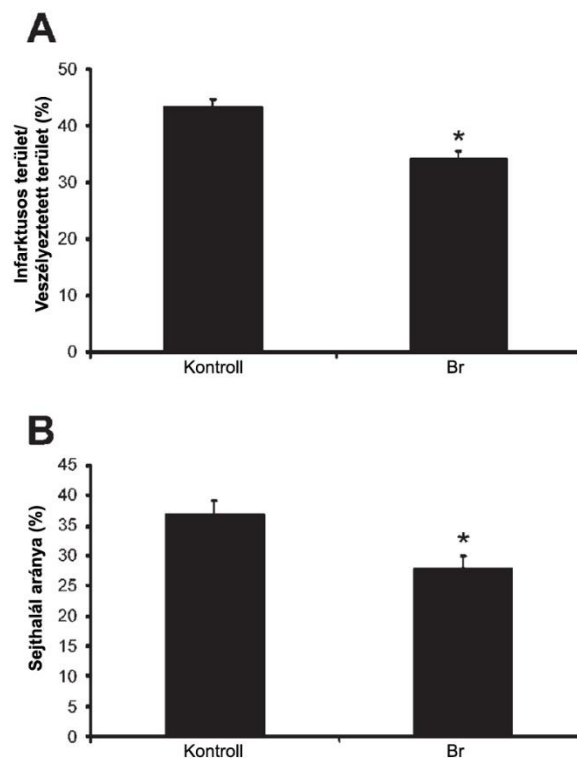
A kontroll (Con) és Br kezelt (Br) állatokból izolált szíveket 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak vetettük alá. Az eredményeket átlag \pm SD formában ábrázoltuk. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a Br és kontroll patkányok között. $n=6$ állatot vizsgáltunk csoportonként.

A bromelain hatása az infarktus kiterjedésére és a miokardiális sejtek apoptózisára

Az infarktusz terület (18A ábra) lényegesen nagyobb volt azokban a kontroll szívekben, melyek 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfúzióknak estek át, az I/R protokollban részt nem vett

szívekhez képest (nem ábrázolt adat). Az értékek észrevehetően csökkentek a Br csoportban a kezeletlen állatokhoz viszonyítva (34% vs. 43%, 18B ábra).

A kardiomiociták apoptózisának kimutatására TUNEL assayt használtunk, α -sarcomeric aktin antitest-jelölés segítségével. A Br kezelés szignifikánsan csökkentette az apoptózist (28% vs. 37%) a kontroll csoporthoz képest.

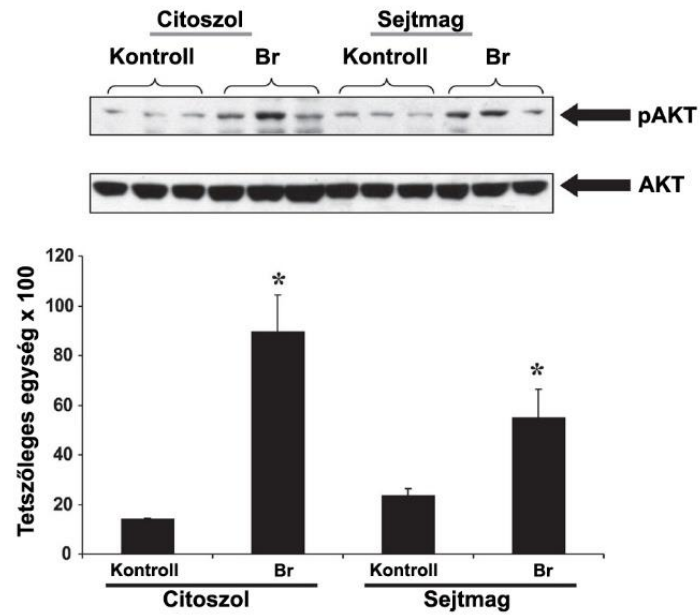


18. ábra. A Br hatásai az infarktusos terület nagyságára (A) és a szívizom apoptózisára (B).

A kontroll és Br kezelt állatokból izolált szíveket 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfúciónak vetettük alá. Az eredményeket átlag \pm SD formában ábrázoltuk. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a Br és kontroll patkányok között. $n=6$ állatot vizsgáltunk csoportonként.

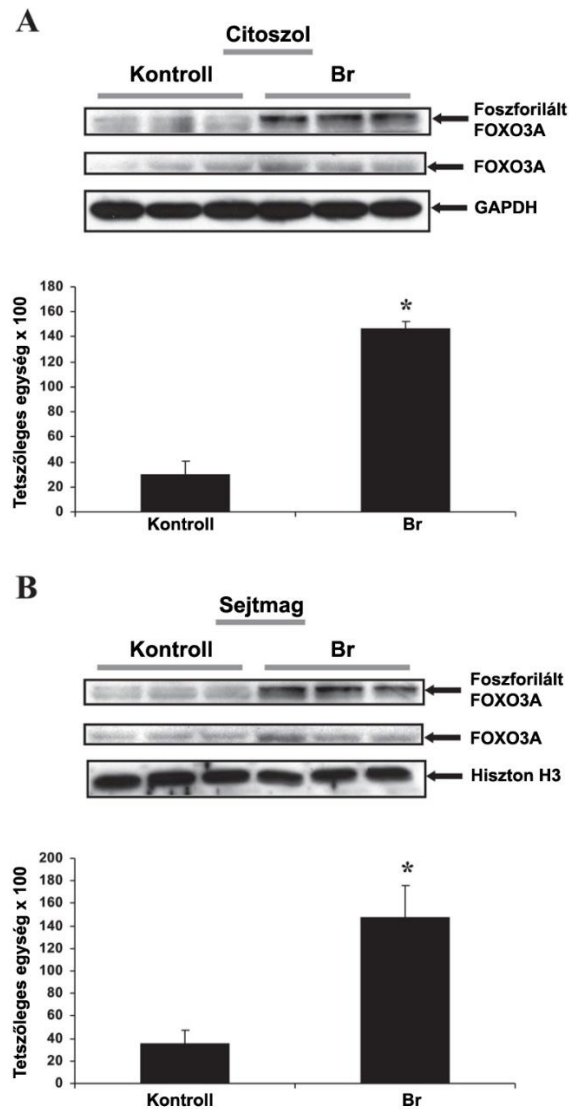
A bromelain hatása az Akt és a FOXO3A foszforilációjának mértékére

Az Akt foszforilációja mind a citoszolikus, mind nukleáris frakcióban növekedett I/R után a Br-kezelt csoportban a kontrollhoz képest (19. ábra). Hasonlóképpen, a Br-kezelés szignifikánsan serkentette a FOXO3A foszforilációját I/R után, a kontroll csoporttal összehasonlítva (20. ábra). Azt feltételezzük, hogy a Br révén foszforilálódó Akt a sejtmagba vándorol, ahol foszforilálja a FOXO3A-t, mely egy fontos túlélési szignált indít el az iszkémiás szívizomban. A FOXO fehérjék Akt-mediált foszforilációja a sejtmagban történik meg, ami miatt a DNS kötő képességük megszűnik, ugyanakkor a 14-3-3 proteinek számára kötőhelyeket képeznek. Az Akt által foszforilált FOXO3A ezután kilökődik a sejtmagból, és a 14-3-3 fehérjével együtt inaktív komplexbe záródik.



19. ábra. szemléltető Western blot a Br hatásáról a foszforilált (p)-Akt expresszióra bal kamrai szívszövetben.

Viszonyítási kontrollként Akt-ot használtunk. A p-Akt szemikvantitatív becslése a citoszol és a sejtmag frakciókban. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a Br és kontroll patkányok között a p-Akt expresszióban.

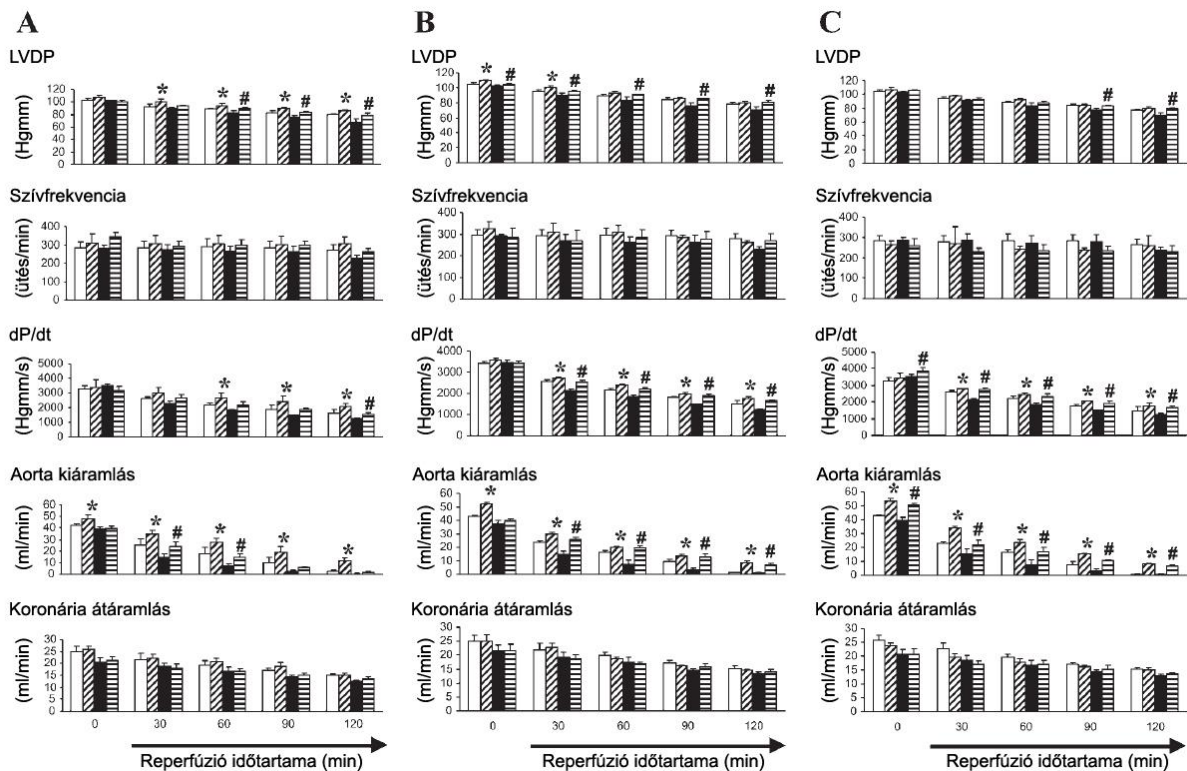


20. ábra. Western blot a Br hatásáról a foszforilált (p)-FOXO3A expresszióra bal kamrai szívszövetben.

Viszonyítási kontrollként FOXO3A-t használtunk. A: citoszol frakció. B: sejtmag frakció. A citoszol frakcióban GAPDH, a nukleáris frakcióban Hiszton H3 fehérjét használtunk kontrollként. A és B, lent: A (p)-FOXO3A kvantitatív becslése a citoszol és sejtmag frakciókban. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a Br és kontroll patkányok között a p-FOXO3A expresszióban.

Eredmények IV.*Niacinhoz kötött króm-komplex alapú Energia formula (Ef)*

Az iszkémia indukciója előtt nem volt észlelhető szignifikáns különbség a szívfunkciós paraméterekben az Ef-kezelt, illetve a kontroll állatokat tekintve. Az iszkémia utáni reperfúzióban az összes szívfunkciós paraméter értéke csökkent, minden csoportban. 30 nap kezelés után a 120 perc reperfúzió során mért LVDP szignifikáns növekedése volt megfigyelhető mind a hím, mind a nőstény állatokban, ugyanakkor, 60 és 90 napnál szignifikáns különbségek voltak észlelhetőek az LVDP-ben, kizárólag a nőstény állatokban, a kontrollokhoz viszonyítva. Az NKK-kezelt patkányokban a dp/dt_{max} és az aorta kiáramlás szignifikáns növekedését tapasztaltuk reperfúzió alatt. 120 perc reperfúzió után a dp/dt_{max} értékek szignifikánsan megemelkedtek a kezeletlen állatokhoz viszonyítva hím és nőstény patkányoknál a 30 napig 2067 ± 210 és 1578 ± 71 vs. 1603 ± 264 és 1237 ± 50 Hgmm/s, 60 napig 1752 ± 75 és 1647 ± 44 vs. $1,499 \pm 172$ és 1231 ± 52 Hgmm/s és 90 napig 1780 ± 180 és 1669 ± 119 vs. 1482 ± 217 és 1261 ± 56 Hgmm/s kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest (21A-C ábra). Az aorta kiáramlás hasonló módon emelkedett hím és nőstény állatokban a 30 napig $11,25 \pm 2,82$ és $1,5 \pm 0,54$ vs. $1,92 \pm 1,38$ és $0,23 \pm 0,41$ ml/min. 60 napig $8,42 \pm 1,02$ és $6,85 \pm 1,01$ vs. $0,92 \pm 0,34$ és $0,5 \pm 0,55$ ml/min és 90 napig $8,4 \pm 0,58$ és $6,67 \pm 0,82$ vs. $0,65 \pm 0,40$ és $0,5 \pm 0,55$ ml/min kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva (21A-C ábra). A szívfunkció jelentős posztisztkémiás javulása az Ef kezelés kardioprotektív hatását bizonyítja.

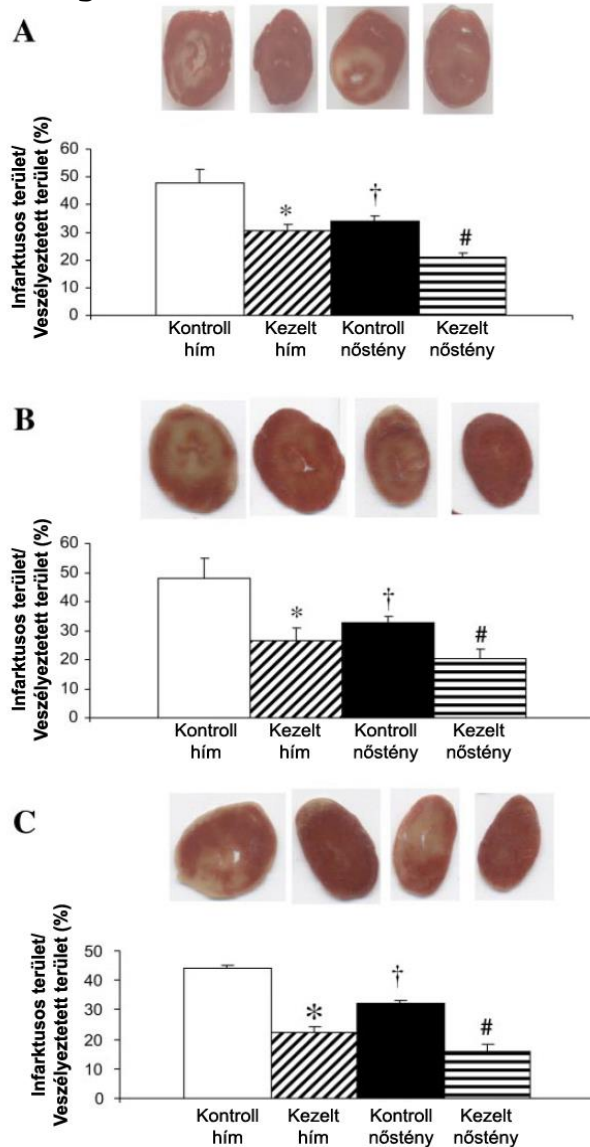


21. ábra. Az energia formula hatása a bal kamrai nyomásváltozásra (LVDP), szívfrekvenciára, nyomásnövekedés maximális sebessége (dp/dtmax), aorta kiáramlásra és koronária átáramlásra 30 (A), 60 (B) és 90 (C) nap kezelést követően.

A hím és nőstény kontroll és Ef kezelt állatokból (n=6) izolált szíveket 30 perc iszkémiának és 2 óra reperfüzióknak vetettük alá. Oszlopok: üres, hím kontroll; ferde sávazás, hím kezelt; teli, nőstény kontroll; vízszintes sávazás, nőstény kezelt. Az eredményeket átlag±SD formában ábrázoltuk. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a hím kezelt és kontroll patkányok között. A # statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelent a nőstény kezelt és kontroll patkányok között.

Az Ef hatása a miokardiális infarktus kiterjedésére

Az infarktus nagysága (az infarktus területének százalékos aránya a teljes veszélyeztetett területhez viszonyítva) szignifikánsan megemelkedett a kezeletlen csoportban 30 perc iszkémia és 2 óra reperfüzió után az iszkémia előtti állapothoz képest. Az értékek számottevő mértékben csökkentek az Ef kezelés hatására. 30 nap ($47,9 \pm 4,7$ vs. $30,6\% \pm 2,3$ hím patkányokban; $33,9 \pm 2,1$ vs. $20,9\% \pm 1,8$ nőstény patkányokban) (22A ábra), 60 nap ($48,1 \pm 6,9$ vs. $26,5\% \pm 4,4$ hím patkányokban; $32,9 \pm 2,1$ vs. $20,5\% \pm 3,1$ nőstény patkányokban) (22B ábra) és 90 nap (44 ± 1 vs. $22\% \pm 2$ hím patkányokban; 32 ± 1 vs. $15,6\% \pm 2,7$ nőstény patkányokban) (22C ábra) után a kontroll iszkémia/reperfüziós csoporthoz viszonyítva. A kezeletlen csoportban a hím és nőstény patkányok között is szignifikáns eltérés mutatkozott az infarktus nagyságát tekintve. 30 nap ($47,9 \pm 4,7$ vs. $33,9\% \pm 2,1$), 60 nap ($48,1 \pm 6,9$ vs. $32,9\% \pm 2,1$) és 90 nap ($43,9 \pm 1,1$ vs. $32,2\% \pm 1,2$) után végzett iszkémia/reperfüziót követően (22. ábra).



22. ábra. 30 (A), 60 (B) és 90 (C) nap Ef kezelés hatása az infarktusos terület nagyságára.

A hím és nőstény kontroll és NKK kezelt állatokból (n=6) izolált szíveket 30 perc iszchémiának és 2 óra reperfúzióknak vetettük alá. Oszlopok: üres, hím kontroll; ferde sávozás, hím kezelt; teli, nőstény kontroll; vízszintes sávozás, nőstény kezelt. Az eredményeket átlag±SD formában ábrázoltuk. A * statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) jelent a hím Ef kezelt és kontroll patkányok között. A # statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) jelent a nőstény Ef kezelt és kontroll patkányok között. A † statisztikailag szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) jelent a hím és nőstény kontroll patkányok között.

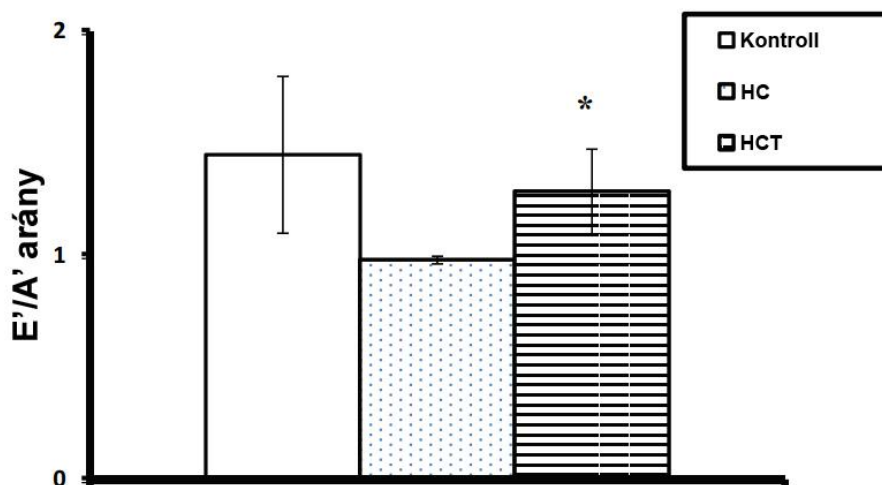
Az Ef hatása az ATP és kreatin-foszfát (CP) szintekre

A kontroll állatokkal összehasonlítva, az Ef kezelt hím patkányokban a miokardium ATP szintje 7, 58 és 59%-kal, a CP szintjei pedig 17, 31 és 59%-kal emelkedtek 30, 60 és 90 nap kezelés hatására. Hasonlóan, az ATP szintek 12, 57 és 80%-kal, a CP szintek pedig 16, 61 és 63%-kal növekedtek 30, 60 és 90 nap kezelés után a nőstény patkányokban is.

Eredmények V.

A meggymag-kivonat (SCSE) és a hiperkoleszterinémia szívizomra gyakorolt hatásának követése ultrahangos képalkotó eljárással

A kísérletes munkánk megerősítéseként az izolált szív kísérlet megkezdése előtt non-invazív eljárással a szívek morfológiai és funkcionális státuszának ellenőrzésére ultrahangos technikákat alkalmaztunk, ahol a hiperkoleszterinémiás szív eltéréseit vizsgáltuk a nem hiperkoleszterinémiás kontroll csoporthoz, illetve meggymag-kivonattal kezelt csoporthoz képest. Az ultrahangos felvételek és az izolált szív funkciós paraméterei korrelációt mutatnak. Az E'/A' arány a szív diasztolés funkciójáról ad felvilágosítást. A szívelégtelenség kialakulásának kezdetén a szív szisztolés funkciója még ép, azonban a diasztolés funkció már sérül, ami az E'/A' csökkenésével indul. A kamrai szeptális miokardium falvastagságának változása még ebben a szakaszban nem következik be. Az echokardiográfiás adatok alapján egyértelműen elmondhatjuk, hogy a szívben diasztolés funkciózavar jelenik meg a 16. hét elteltével (E'/A'). Az E'/A' arány nem-hiperkoleszterinémiás csoportban 1,45, a HC csoportban 0,98 és a HC- kezelt nyulak esetében 1,29 (23. ábra). Ez szintén arra enged következtetni, hogy az SCSE kezelés javította a szív diasztolés funkcióját.



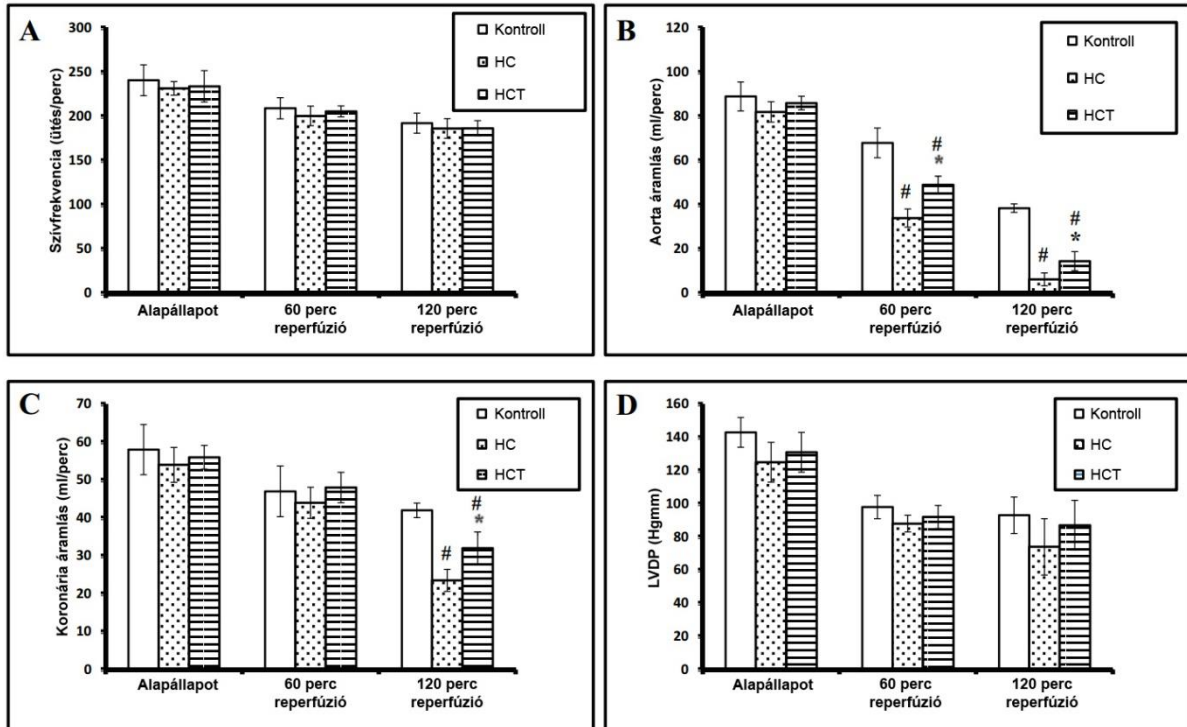
23 ábra. A szöveti E'/A' hányados változása a MKK hatására

A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

Az SCSE hatása a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére

A szívfrekvencia vizsgálataiban nem találtunk szignifikáns eltérést a reperfúzió során (24A ábra). Az AF értékek a preisztkémia során nem mutatnak jelentősebb eltérést, de a reperfúzió 60. és a 120. percében a HC csoportban szemmel láthatóan gyengült a kiáramlás sebessége, viszont a HC SCSE kezelt csoport eredményei jobbnak bizonyultak (24B ábra). A reperfúzió 60. percében a HC csoport 34 ± 3 ml/perc a 120. percen $6,33 \pm 3$ ml/perc, a HC SCSE kezelt

csoport a 60. percben 49 ± 3 ml/perc, a 120. percben $14,5 \pm 3$ ml/perc. Ezekből az értékekből arra következtetünk, hogy a SCSE kezelt állatokban javultak az aorta kiáramlás értékei. A koronária átáramlásnál azt tapasztaltuk, hogy a kezelt csoportnál jelentős javulás figyelhető meg (24C ábra). Az LVDP értékek közötti különbségek nem adódtak szignifikánsnak (24D ábra).

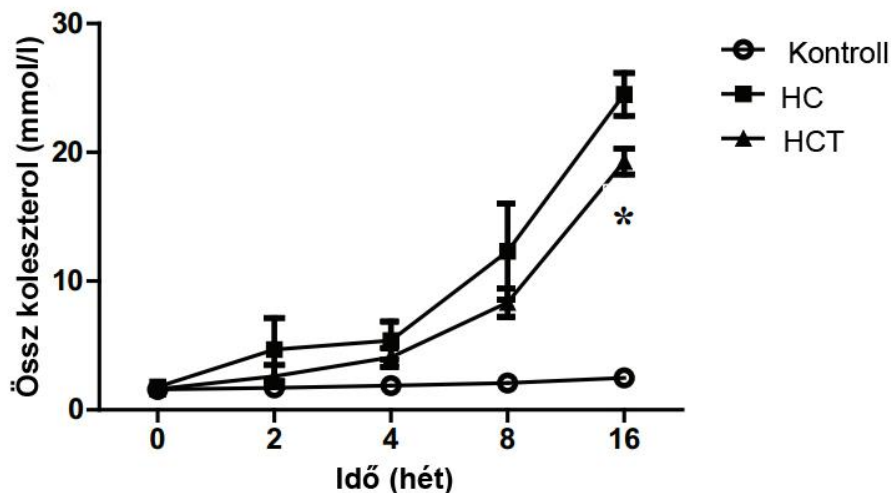


24. ábra. Az izolált szív funkcionális paramétereit alapállapotban, és iszkémia/reperfúzió alatt.

LVDP: bal kamrai nyomás. A # szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez a kontroll csoporthoz viszonyítva. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

A 2%-os koleszterin diéta és SCSE hatása a szérumszintekre

A koleszterin diétában nem részesült (nem-hiperkoleszterinémias) csoportban a szérumban lévő koleszterin egyenletes plazmaszintet mutatott (1,5 mmol/l, 1,7 mmol/l, 1,8 mmol/l, 2,1 mmol/l, 2,4 mmol/l). A hiperkoleszterinémias csoport vérének koleszterinszintje már a 2. héten 4,7 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 4. héten 5,3 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 8. héten 12,3 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 16. héten 24,5 mmol/l-re ($p < 0,05$) emelkedett. Ezen értékek statisztikailag szignifikánsan eltértek a kontroll csoporthoz képest, bizonyítva ezzel a koleszterin diéta hatékonyságát. A SCSE a plazmaszintet 2. héten 2,6 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 4. héten 4,08 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 8. héten 8,3 mmol/l-re ($p < 0,05$), a 16. héten 19,3 mmol/l-re ($p < 0,05$) csökkentette (25. ábra).



25. ábra. A szérumban a koleszterin változása az idő függvényében.

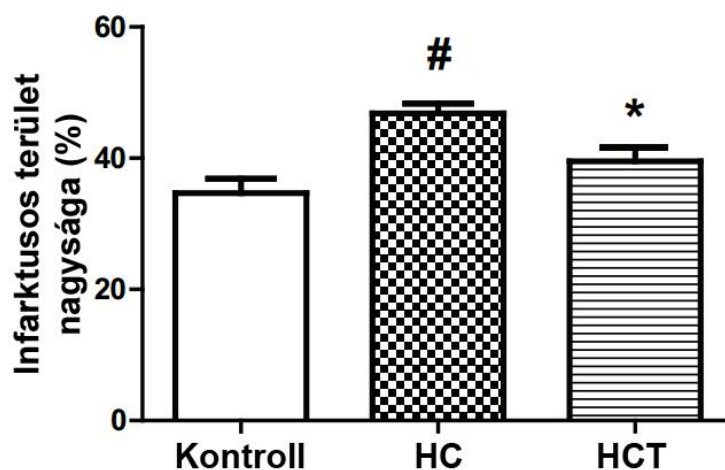
A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

Az SCSE hatása az ateroszklerotikus plakk méretére

A koleszterin dús diéta 0%-ról $75 \pm 11\%$ -ra emelte az ateroszklerotikus plakk méretét, bizonyítva ezzel a koleszterin dús diéta hatékonyságát. A HC SCSE kezelt nyulaknál kisebb értékek figyelhetők meg (58 ± 6).

Az SCSE hatása az infarktusos terület nagyságára

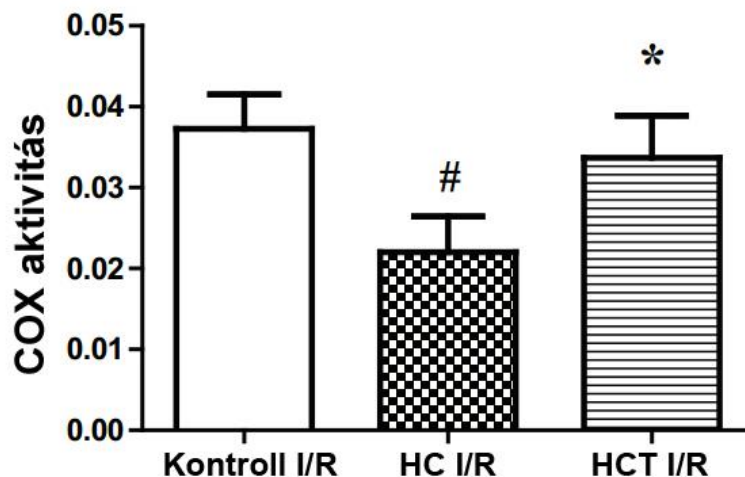
Az infarktusos terület nagyságának vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a HC SCSE kezelt állatoknál jótékony hatásának bizonyult a meggy-mag-kivonat ($47 \pm 1,5$ vs. $40 \pm 2,1$) (26. ábra).



26. ábra. Az infarktusos terület nagysága izolált szívben.

A # szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez a kontroll csoporthoz viszonyítva. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

A 30 perc iszkémiának, majd 120 perc reperfüzióknak alávetett szívizomzatból a COX enzim aktivitását a mitokondriális ferrocitokróm c oxidációjára specifikus kolorimetriás módszerrel határoztuk meg (27. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy az SCSE-kezelt állatok COX aktivitása jelentősen magasabb volt, mint a hiperkoleszterinémiás csoportban mért értékek ($p < 0,05$).

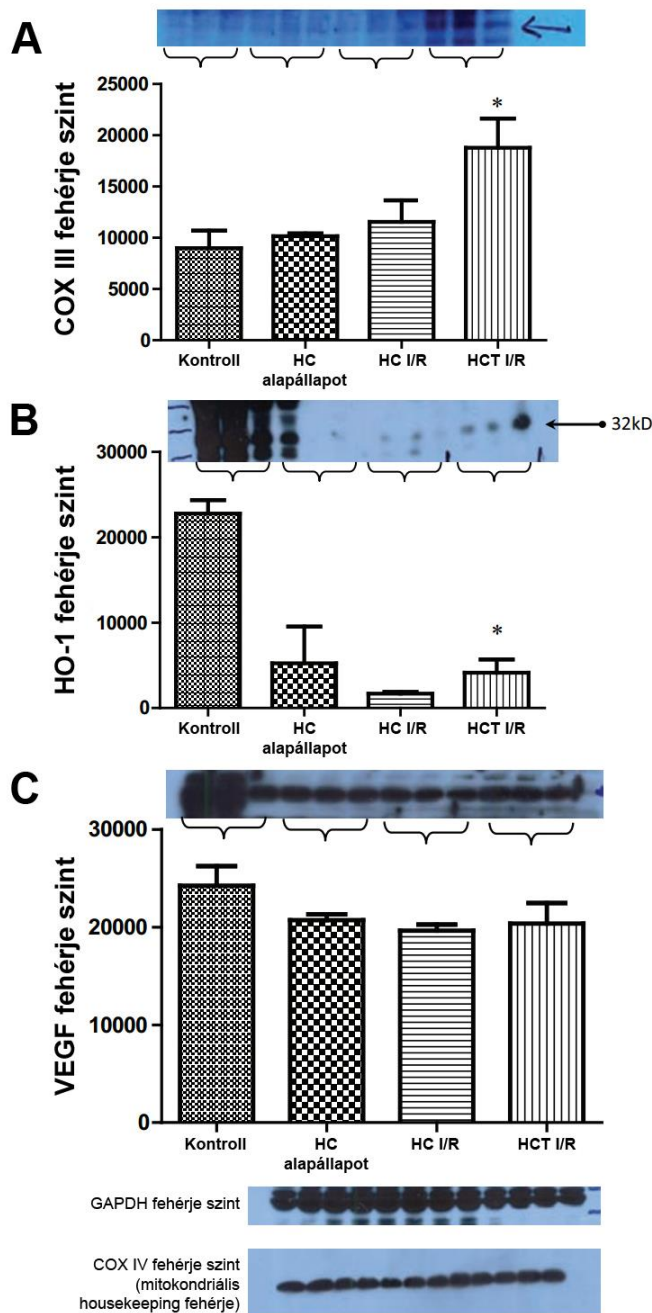


27. ábra. A szívizomzat citokróm c oxidáz (COX) aktivitása iszkémia/reperfüziót (I/R) követően.

A # szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez a kontroll csoporthoz viszonyítva. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

Az SCSE hatása a COXIII, HO-1, VEGF expresszióra

A 28. ábrán foglaltuk össze a Western blot analízis eredményeit. A COX III (28A ábra), HO-1 (28B ábra) és VEGF (28C ábra) értékeit sértetlen, és iszkémia/reperfüziós károsodást szenvedett szívizomzatból is meghatároztuk. A meggyomag kivonattal kezelt nyulak esetében a COX III és HO-1 szintje jelentős mértékben megemelkedett ($p < 0,05$) iszkémia/reperfüziót követően.



28. ábra. A kardiovaszkuláris biomarkerek Western blot analízise.

A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelöl a HC és HCT csoport között.

Eredmények VI.

A medvehagyma liofilizátum (WGLL) HPLC analízise

Az alliin (S-allil-L-cisztein-szulfoxid) az *Allium* fajokban nagyobb mennyiségben előforduló aminosavszármazék, mely az alliináz enzim természetes szubsztrátja. A liofilizátum alliin tartalmát HPLC módszerrel határoztuk meg, mely 0,261 tömegszázaléknak adódott (RSD% = 0,45%).

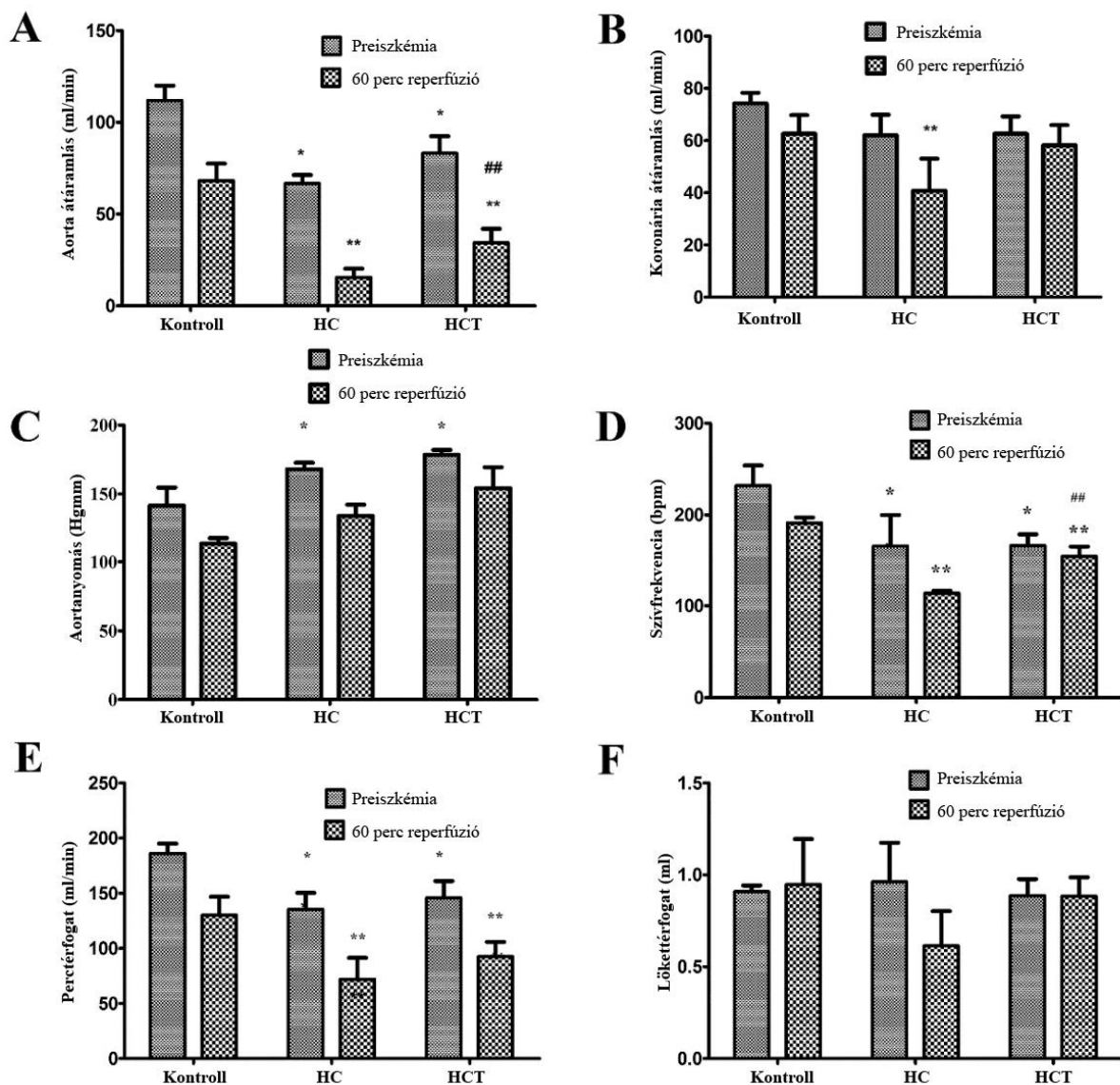
A bal kamra végdiasztolés átmérője (EDD) M-módban jelentős emelkedést mutatott a hiperkoleszterinémias (HC) állatokban ($1,242 \pm 0,045$ cm a HC csoportban vs. $1,016 \pm 0,091$ cm a kontrollban). A medvehagyma liofilizátummal (WGLL) kezelt hiperkoleszterinémias csoportban (HCT) azonban nem volt megfigyelhető különbség a kontrollhoz viszonyítva ($1,184 \pm 0,020$ cm). A frakcionális rövidülés (FS) és az ejekciós frakció (EF) adatok erős korrelációt mutattak a paraszternális hossz- és rövidtengelyi mérések között. Az FS és EF értékei szignifikánsan csökkentek a HC állatokban a kontroll csoporthoz hasonlítva (FS (HC): $29,010 \pm 1,056$, vs. FS (kontroll): $32,310 \pm 0,718$; EF (HC): $49,810 \pm 1,140$, vs. EF (kontroll): $56,910 \pm 1,2949$). A HCT csoportban továbbá a frakcionális rövidülés és az ejekciós frakció jelentős emelkedése következett be a HC csoporthoz képest (FS (HCT): $32,970 \pm 1,131$; EF (HCT): $55,990 \pm 1,756$). A bal kamra diasztolés működését Doppler pulzushullám (PW) módban határoztuk meg, a mitrális korai diasztolés beáramlási sebesség/pitvari korai diasztolés beáramlási sebesség (E/A) arány alapján. Az E/A értéke jelentősen alacsonyabb volt a hiperkoleszterinémias állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva (HC: $1,207 \pm 0,037$ vs. kontroll: $1,376 \pm 0,045$), azonban a medvehagyma kezelés nem befolyásolta a fenti paramétert számottevő mértékben (HCT: $1,344 \pm 0,076$) a kontrollhoz képest. Az E hullám lassulási sebessége (DecT) jelentősen megnyúlt a HC csoportban (HC: $87,440 \pm 3,534$ ms vs. kontroll: $71,250 \pm 4,101$ ms), azonban a WGLL kezelt nyulakban szignifikánsan csökkent a HC kontrollhoz viszonyítva (HCT: $69,540 \pm 4,787$ ms). A szöveti sebesség (TVI) mérés a csökkent E'/A' értékek felé mutató, nem szignifikáns trendet mutatott a medvehagymával kezelt állatokban. Meglepő módon, a jobb kamrai funkció, melyet a szisztolés csúcssebesség (S') hullámok és a trikuszipidális gyűrű síkjának elmozdulása (TAPSE) jellemez; jelentős javulást mutatott WGLL kezelés hatására. Az S' hullámok amplitúdója jelentősen megemelkedett a HCT állatokban a HC kontrollhoz viszonyítva (HCT: $9,156 \pm 0,210$ cm/s vs. HC: $8,103 \pm 0,216$ cm/s), csakúgy, mint a TAPSE értékei (HCT: $0,646 \pm 0,050$ cm vs. HC: $0,5762 \pm 0,015$ cm). A jobb kamrai E'/A' értékei szintén enyhe fokú csökkenést mutattak a WGLL kezelt csoportban.

Átlag ± SEM	HR (bpm)	Ao (cm)	LV ESD (cm)	LV EDD (cm)	FS PLAX (%)
Kontroll	180.8 ± 4.145	0.946 ± 0.024	1.016 ± 0.091	1.655 ± 0.050	39.370 ± 5.021
HC	150.2 ± 4.303 *	0.919 ± 0.025	1.242 ± 0.045 *	1.756 ± 0.063	29.220 ± 0.803 *
HCT	185.0 ± 7.053 **	0.898 ± 0.012	1.184 ± 0.020	1.793 ± 0.031	33.820 ± 1.312 **
	EF PLAX (%)	LV mass PLAX (g)	FS SAX (%)	EF SAX (%)	LV mass SAX (g)
Kontroll	56.910 ± 1.294	6.632 ± 0.478	32.310 ± 0.717	54.130 ± 0.961	6.573 ± 0.351
HC	49.810 ± 1.140 *	8.218 ± 0.628	29.010 ± 1.056 *	49.430 ± 1.517 *	8.315 ± 0.792 *
HCT	55.990 ± 1.756 **	8.769 ± 0.169 *	32.970 ± 1.131 **	54.930 ± 1.522 **	8.195 ± 0.226 *
	E/A	DecT (ms)	E/E'	LVOTVmax (cm/s)	LVOTVTI (cm)
Kontroll	1.376 ± 0.045	71.250 ± 4.101	1.417 ± 0.058	84.280 ± 2.131	0.071 ± 0.002
HC	1.207 ± 0.037 *	87.440 ± 3.534 *	1.775 ± 0.101	87.940 ± 5.719	0.080 ± 0.005
HCT	1.344 ± 0.076	69.540 ± 4.787 **	1.718 ± 0.155	77.150 ± 2.157	0.0685 ± 0.002
	E'/A'	MAPSE (cm)	RV S' (cm/s)	RV E'/A'	TAPSE (cm)
Kontroll	1.303 ± 0.058	0.527 ± 0.018	8.935 ± 0.273	1.336 ± 0.051	0.576 ± 0.012
HC	1.109 ± 0.071	0.571 ± 0.025	8.103 ± 0.215 *	1.233 ± 0.092	0.576 ± 0.015
HCT	1.065 ± 0.117	0.592 ± 0.030 *	9.156 ± 0.210 **	1.055 ± 0.077 *	0.644 ± 0.020 **

2. táblázat. Az echokardiográfiás vizsgálat eredményei.

Rövidítések: HR: szívfrekvencia; bpm: ütés/perc; Ao: aorta átmérő; LV: bal kamra; ESD: végszisztolés átmérő; EDD: végdiasztolés átmérő; FS: frakcionális rövidülés; PLAX: paraszternális hossztengetyeli nézet; SAX: paraszternális rövidtengetyeli nézet; EF: ejekciós frakció; LV mass: a bal kamra számított tömege; E/A: mitrális korai diasztolés beáramlási sebesség és pitvari korai diasztolés beáramlási sebesség hányadosa; DecT: korai telődési sebesség lassulási ideje; E/E': korai diasztolés mitrális beáramlás és a laterális és szeptális szövet Doppler korai diasztolés sebessége átlagának hányadosa; LVOTVmax: a bal kamra ürülésének maximális sebessége; LVOTVTI: a bal kamrai ürülés sebességgörbéjének integráltja; E'/A': a laterális fal korai diasztolés és pitvari diasztolés sebességének szöveti Doppler hányadosa; S: szisztolés csússebesség; MAPSE: mitrális gyűrű síkjának szisztolés elmozdulása; TAPSE: trikuszipidális gyűrű síkjának szisztolés elmozdulása. A * kontroll csoporthoz viszonyított, a ** a HC csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli (p<0,05).

A diétával kiváltott hiperkoleszterinémia és a WGLL kezelés a szív funkcionális paramétereire gyakorolt hatásait a 29. ábra foglalja össze. A következő paramétereket határoztuk meg: aorta kiáramlás (AF, 29A ábra), koronária átáramlás (CF, 29B ábra), aortanyomás (AoP, 29C ábra), szívfrekvencia (HR, 29D ábra), perctérfogat (CO, 29E ábra) és lökettérfogat (SV, 29F ábra). A HC és HCT állatokban az AF, HR és CO értékei szignifikáns csökkenést mutattak a kontroll csoporthoz viszonyítva (p<0,05). Az iszkémiás állapotot megelőző AoP értéke jelentősen magasabb volt a kontroll nyulakhoz képest (p<0,05). 60 perc reperfúziót követően az AF, CF, HR és CO minden csoportban csökkenést mutatott a preiszkémiás állapot értékeihez viszonyítva (p<0,05). A HCT csoportban az AF és HR szignifikáns mértékben javult a reperfúzió alatt a kontroll és HC állatokhoz hasonlítva (p<0,05). Ezen eredmények, összevetve az echokardiográfiás adatokkal (2. táblázat) tovább erősítik, hogy a WGLL kardioprotektív hatásokkal rendelkezik.

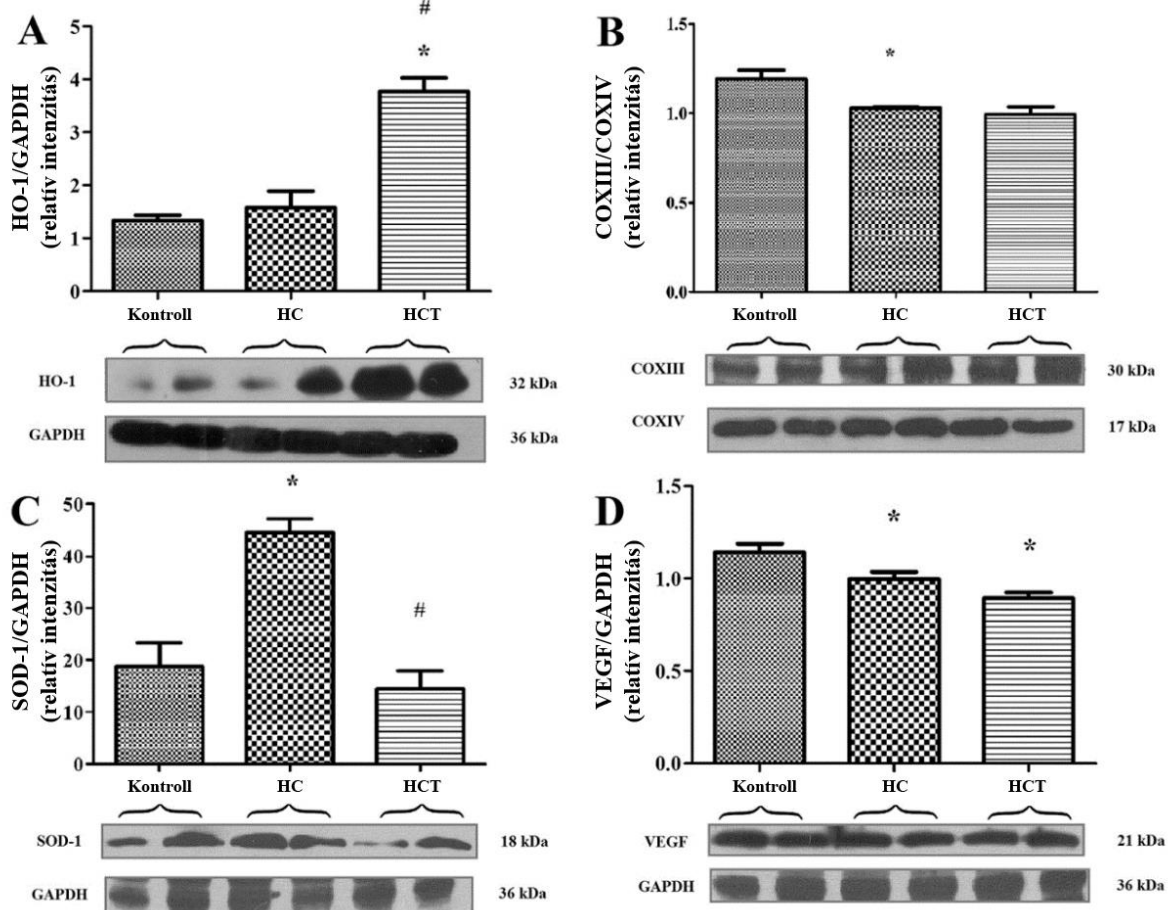


29. ábra. Hiperkoleszterinémia és WGLL hatása a szív működésre.

A * kontroll csoport preiszkémiai értékéhez, a ** a kontroll csoport 60 perc reperfüziós értékéhez, a ## a HC csoport 60 perc reperfüziós értékéhez viszonyított szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).

A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása a szív működés biomarkereire

A szív anyagcseréjében szerepet játszó fő mediátorok Western blot módszerrel kimutatott fehérjék expresszióját a 30. ábrán tüntettük fel. A HO-1 fehérje kifejeződése a HCT állatokban jelentősen megemelkedett a HC csoporthoz hasonlítva (30A ábra, $p < 0,05$). A SOD-1 szöveti expressziója a HC csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontroll és WGLL kezelt állatokhoz viszonyítva (30C ábra, $p < 0,05$). A COXIII és VEGF fehérjék expressziója alacsonyabbnak mutatkozott a HC és HCT csoportban a kontroll nyulakban mért értékekhez képest (30B, 30D ábra, $p < 0,05$).

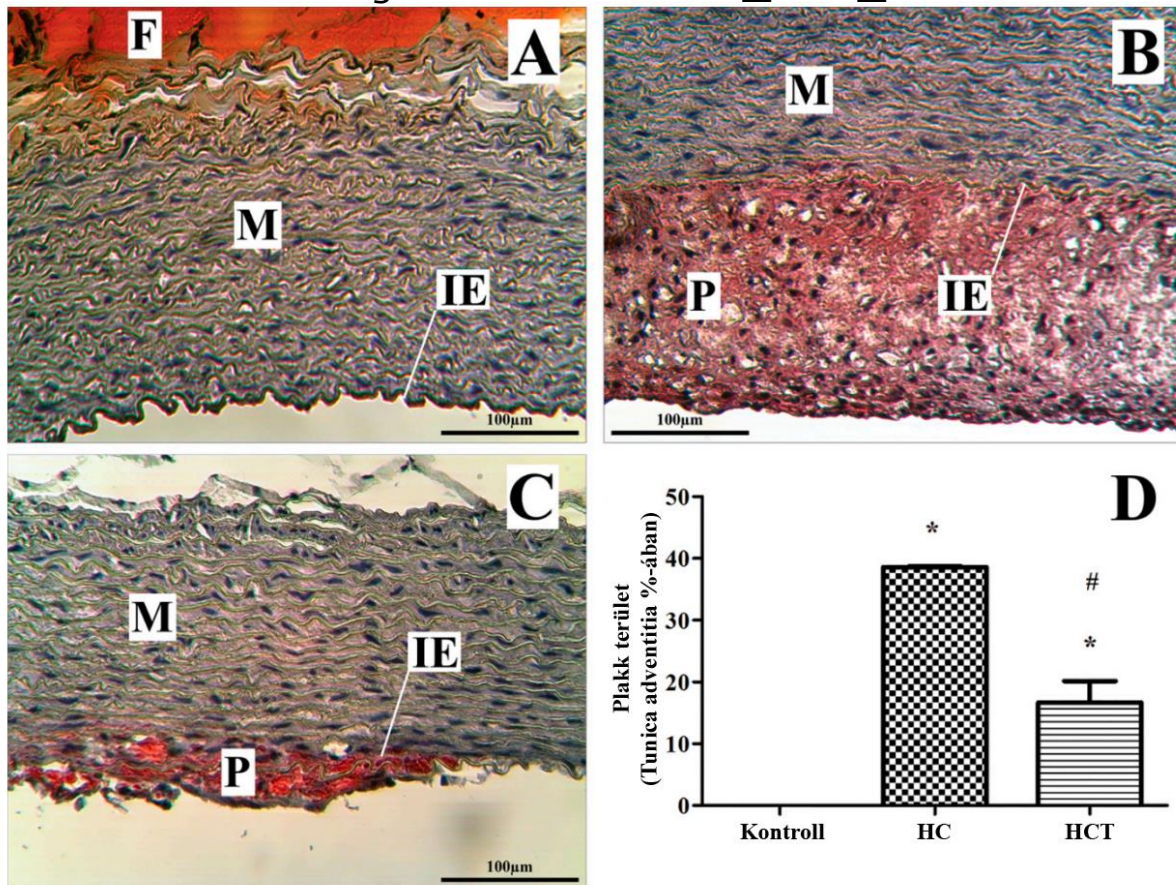


30. ábra. A szív működést jellemző biomarkerek Western blot analízise.

A GAPDH és COXIV fehérje szinteket használtuk referenciaként. A * a kontroll csoporthoz, a # a HC csoport értékeihez viszonyítva jelez szignifikáns különbséget ($p < 0,05$).

A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása az ateroszklerózis kialakulására

Az aorta minták hematoxilinnel és Red Oil O festékkel jelzett metszeteit a 31. ábra szemlélteti. A normál kísérleti táppal etetett kontroll nyulak mintáin ateroszklerotikus elváltozások nem voltak megfigyelhetők (31A ábra). A 8 hetes kísérleti időszak végére a HC csoportban 35% Red Oil O pozitív területet mutattunk ki az aortában (31B ábra). Az ateroszklerózis mértéke a hiperkoleszterinémiás nyulakban jelentősen nagyobb volt (31D ábra, $38,610\% \pm 0,146\%$) a kontroll állatokhoz viszonyítva ($p < 0,05$). Szerényebb mértékű Red Oil O festődést figyeltünk meg a HCT nyulak esetében (31C ábra). A WGLL kezelt állatok aortájában szignifikánsan alacsonyabb mértékű ateroszklerózis volt kimutatható a hiperkoleszterinémiás kontroll csoporthoz hasonlítva (31D ábra, $16,710\% \pm 3,421\%$, $p < 0,05$).



31. ábra. Az aorta szövettani elemzése.

A-C: A kontroll, HC és HCT metszetek hematoxin- Oil Red O festése 25x-ös nagyításban. Rövidítések: F: a tunica adventitia zsírszövege; M: tunica media; IE: belső lamina elastica; P: ateroszklerotikus plakk. A * a kontroll csoporthoz, a # a HC csoport értékeihez viszonyítva jelez szignifikáns különbséget ($p < 0,05$).

A hiperkoleszterinémia és WGLL hatása a szérum paraméterekre

A kísérlet végén vett vérminták analízisét a 3. táblázat tartalmazza. A TC és LDL értékek kettő nagyságrenddel, a HDL nyolc nagyságrenddel volt magasabb a HC, és hat nagyságrenddel a HCT csoportban a kezeletlen kontroll nyulak plazmaszintjeihez viszonyítva ($p < 0,05$). Ugyanakkor a plazma TC és LDL koleszterin értékek a HCT csoportban szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkoztak a HC kontrollhoz hasonlítva ($p < 0,05$), mely a WGLL lehetséges protektív szerepére utal. A HC nyulak ApoA plazmaszintjei ($0,022 \pm 0,003$) jelentősen alacsonyabbak voltak a kontroll csoporthoz ($0,042 \pm 0,005$) és a WGLL kezelt állatokhoz képest ($0,056 \pm 0,008$, $p < 0,05$). Az ApoA szintek tekintetében nem láttunk szignifikáns különbséget a kontroll és a HCT csoport között ($p > 0,05$). A HCT és HC nyulak ApoB szintjei jelentősen magasabbnak mutatkoztak a kezeletlen csoport értékeihez viszonyítva ($p < 0,05$), ugyanakkor a HCT csoport ApoB szintje ($0,172 \pm 0,019$) jelentősen alacsonyabb volt, mint a HC értéke ($0,280 \pm 0,063$, $p < 0,05$). A három csoport TG szintjeiben nem figyeltünk meg statisztikailag

szignifikáns eltérést. További eredmény, hogy a gyulladási marker C-reaktív protein (CRP) szintje jelentősen megemelkedett a HC állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A GOT májenzim szintek a HC nyulakban jelentősen megnöttek ($48,8 \pm 16,22$) a kontroll ($29,670 \pm 2,895$) és HCT állatokkal ($24,910 \pm 2,708$) összehasonlítva ($p < 0,05$). Az LDH ($316,6 \pm 37,17$) és a (CK) ($2851 \pm 600,800$) plazmaszintek szignifikánsan csökkentek a HCT csoportban a hiperkoleszterinémias kontroll nyulakhoz viszonyítva ($791,90 \pm 325,4$ és 4955 ± 1353 , $p < 0,05$).

Csoportok	TC	LDL-C	HDL-C	ApoA	ApoB
Kontroll	0.793 ± 0.067	0.230 ± 0.023	0.523 ± 0.045	0.042 ± 0.005	0.015 ± 0.003
HC	$26.370 \pm 3.660^{* \#}$	$23.550 \pm 3.032^{* \#}$	$4.427 \pm 0.656^*$	$0.022 \pm 0.003^{* \#}$	$0.280 \pm 0.063^{* \#}$
HCT	$20.030 \pm 1.947^{* **}$	$17 \pm 1.942^{* **}$	$3.314 \pm 0.369^*$	$0.056 \pm 0.008^{**}$	$0.172 \pm 0.019^{* **}$
	TG	CRP	GOT	LDH	CK
Kontroll	0.788 ± 0.035	0.100 ± 0.014	29.670 ± 2.895	726.400 ± 170.700	4213 ± 623.200
HC	1.367 ± 0.335	$0.728 \pm 0.362^*$	$48.800 \pm 16.220^*$	791.900 ± 325.400	4955 ± 1353
HCT	1.052 ± 0.339	0.596 ± 0.231	$24.910 \pm 2.708^{**}$	$316.600 \pm 37.170^{**}$	$2851 \pm 600.800^{**}$

3. táblázat. A szérum paraméterek analízise.

Rövidítések: TC: össz koleszterin; LDL: alacsony denzitású lipoprotein-koleszterin; HDL: magas denzitású lipoprotein-koleszterin; ApoA: apolipoprotein A-I; ApoB: apolipoprotein B; TG: triglicerid; CRP: c-reaktív protein; GOT: glutamát-oxalacetát transzamináz; LDH: laktát dehidrogenáz; CK: kreatin-kináz. A * kontroll csoporthoz viszonyított, a ** a HC csoporthoz viszonyított, a # a HCT csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).

Eredmények VII.

A WGLL hatása az *in vivo* szívfunkciós paraméterekre

Az echokardiográfiás vizsgálatok mindegyike 20 perces időintervallumon belül lett elvégezve, és minden állat stabil szívműködést és légzésritmust mutatott a mérés alatt, és a procedúra végeztével probléma nélkül felébredt az altatásból. Amint azt az 4. táblázat mutatja, a frakcionális rövidülés (FS) és az ejekciós frakció (EF) értékek tekintetében nem volt különbség a csoportok között. A MAPSE által jellemzett szisztolés funkció szintén nem mutatott szignifikáns eltérést a kezelési csoportok között, csakúgy, mint a szívfrekvencia (HR). A jobb kamrai szisztolés működés meghatározása a TAPSE értékek mérésével történt. A TAPSE értékek a kontroll állatokban a normál tartományban maradtak ($2,308 \pm 0,074$ mm), de a PAH patkányok esetében jelentős csökkenés következett be ($1,697 \pm 0,098$ mm) a kezeletlen csoporthoz viszonyítva. A WGLL és sildenafil-kezelt állatok TAPSE értékei szignifikánsan magasabbak voltak a PAH kontrollhoz hasonlítva (WGLL: $2,021 \pm 0,071$ mm, sildenafil: $2,390 \pm 0,069$ mm). A bal kamrai diasztolés funkciót Doppler PW módszerrel határoztuk meg, a jellemző paraméter a mitrális billentyűnél mérhető E/A aránya. A kontrollhoz viszonyítva azt

találtak, hogy az E/A arányt sem a monokrotalin injekció, sem a WGLL, vagy a sildenafil kezelés nem befolyásolta jelentősen a kísérlet 8 hete során.

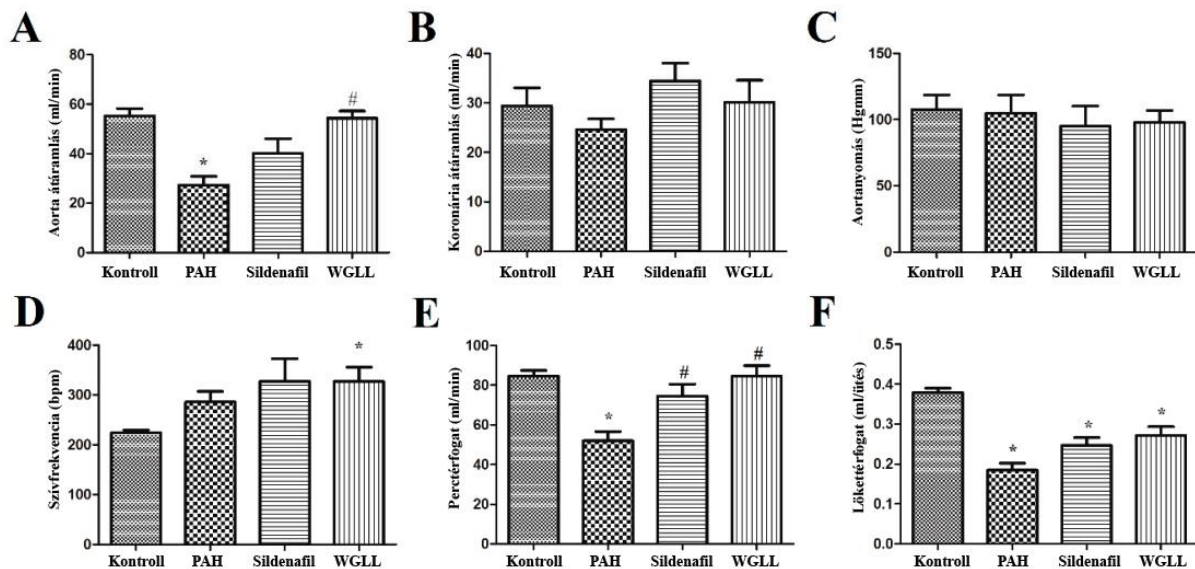
Paraméter	Kontroll	PAH	Sildenafil	WGLL
LV Ejekciós Frakció (%)	73.39 ± 3.638	82.61 ± 2.911	76.93 ± 2.294	76.13 ± 2.327
LV Frakcionális rövidülés (%)	38.64 ± 3.268	47.75 ± 3.432	40.84 ± 2.177	40.49 ± 2.059
LV tömeg (g)	1.388 ± 0.085	1.343 ± 0.037	1.487 ± 0.036	1.469 ± 0.057
Lökettérfogat (ml)	0.459 ± 0.070	0.456 ± 0.056	0.445 ± 0.081	0.452 ± 0.032
Szívfrekvencia (bpm)	269.5 ± 16.21	274.2 ± 9.37	264.3 ± 10.39	243.1 ± 9.76
LVOT maxPG (Hgmm)	2.225 ± 0.247	2.415 ± 0.260	2.401 ± 0.381	2.128 ± 0.179
LVOT meanPG (Hgmm)	1.032 ± 0.112	1.067 ± 0.096	1.169 ± 0.185	0.876 ± 0.074
LVOT Vmax (m/s)	0.753 ± 0.041	0.746 ± 0.445	0.748 ± 0.082	0.720 ± 0.032
LVOT Vmean (m/s)	0.432 ± 0.025	0.451 ± 0.018	0.463 ± 0.045	0.398 ± 0.017
Lat S' (cm/s)	32.29 ± 1.782	40.51 ± 2.710	50.39 ± 2.278 *	39.36 ± 3.565
MV E vel (cm/s)	65.81 ± 3.860	64.71 ± 3.046	58.09 ± 2.906	63.56 ± 2.484
MV A vel (cm/s)	40.15 ± 4.253	37.54 ± 5.484	30.82 ± 1.054	39.19 ± 2.385
MV E/A arány	1.841 ± 0.167	1.856 ± 0.165	1.903 ± 0.052	1.745 ± 0.129
MAPSE (mm)	2.085 ± 0.089	1.961 ± 0.098	1.905 ± 0.057	1.944 ± 0.150
TAPSE (mm)	2.308 ± 0.074	1.697 ± 0.098 *	2.390 ± 0.069 #	2.021 ± 0.071 #

4. táblázat. Az echokardiográfiás vizsgálatok eredményei.

Rövidítések: LV: bal kamra; bpm: ütés/perc; LVOT maxPG: bal kamrai kiáramlás maximális nyomásgrádiense; LVOT meanPG: bal kamrai kiáramlás átlagos nyomásgrádiense; LVOT Vmax: bal kamrai kiáramlás maximális sebessége; LVOT Vmean: bal kamrai kiáramlás átlagos sebessége; Lat S': szisztolés hullámok a mitrális billentyű oldalsó részén; MV E vel: bal kamrai korai telődési sebesség; MV A vel: bal kamrai késői telődési sebesség; MV E/A arány: bal kamrai korai és késői telődés sebességének hányadosa; MAPSE: mitrális gyűrű elmozdulása; TAPSE: trikuszipidális gyűrű elmozdulása. A * a kontroll csoporthoz viszonyított, a # a PAH csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli (p<0,05).

WGLL hatása az in vitro szívfunkciós paraméterekre

Az izolált dolgozó szív modell bal kamrai paramétereit az 32. ábra foglalja össze. A monokrotalin kezelés jelentősen csökkentette az aorta kiáramlást (AF) a kontroll csoport értékeihez képest (PAH: 27,38±3,447 ml/perc vs. kontroll: 55,33±2,932 ml/perc), és a WGLL kezelést követően az AF szintén elérte a kontroll értéket (54,36±2,864 ml/perc). A koronária átáramlás (CF) és az aortanyomás (AoP) nem változott szignifikáns mértékben a csoportok között. A WGLL állatok esetében a szívfrekvencia jelentős mértékben megemelkedett a kontroll csoporthoz viszonyítva (WGLL: 327,5±28,22 ütés/perc vs. kontroll: 224,0±5,579 ütés/perc).

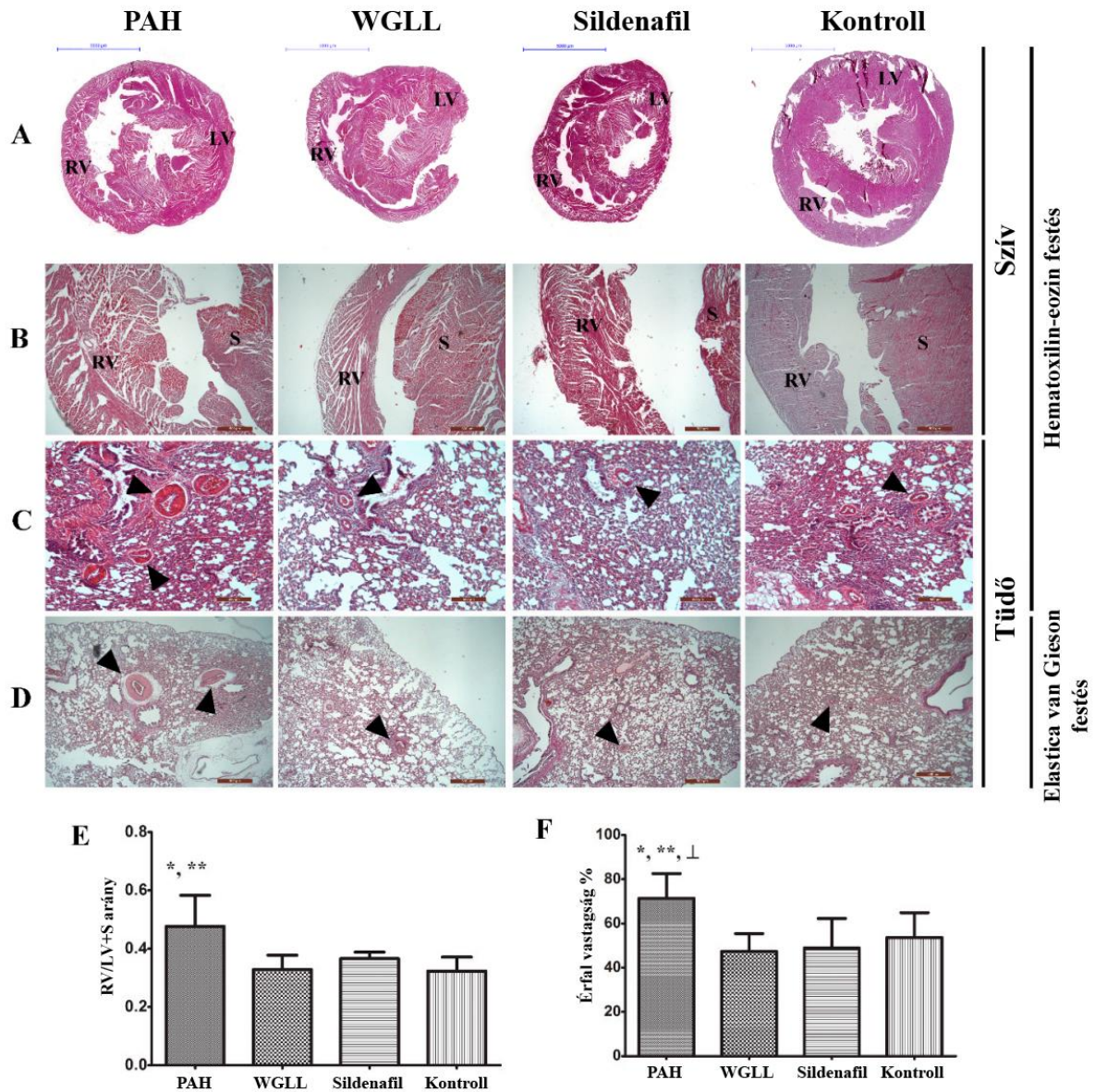


32. ábra. A sildenafil és WGLL kezelés hatása a szív működésére.

Rövidítések: bpm: ütés/perc. A * a kontroll csoporthoz viszonyított, a # a PAH csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).

Mikroszkópos vizsgálatok

A hematoxin-eozinnal (HE) festett szív metszetek szövettani elemzését a 33. ábra mutatja be. A jobb és bal kamrai (RV+LV) metszetek jól látható szövetkárosodást mutatnak mind a három MCT-kezelt csoportban (PAH, WGLL, sildenafil), míg a kontroll csoport alaktanilag egészséges (33B ábra). A PAH csoportban a szövetkárosodást a szívizomsejtek megrövidülése, hiperbazofília, hipereozinofília, az izomrostok hullámos megjelenése, ödéma, lézió és apoptózis formájában nyilvánult meg. A PAH patkányoknál jelentős hipertrófia alakult ki a jobb kamrai izomzatban, míg a WGLL-kezelt csoportban csak mérsékelt makroszkópos hipertrófia látható a jobb kamrában a PAH kontrollhoz hasonlítva. A HE és EVG festéssel jelzett tüdő metszetek a 33C és 33D ábrán láthatóak. A jobb kaprai hipertrófiát (RVH), melyet $RV/(LV+S)$ arányként jellemeztünk, a 33E ábra mutatja be. Az $RV/(LV+S)$ arány a PAH csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontroll és WGLL állatokhoz hasonlítva (PAH: $0,477 \pm 0,044$, kontroll: $0,323 \pm 0,020$, WGLL: $0,328 \pm 0,020$). A pulmonális artériák és arteriolák ($< 50 \mu\text{m}$ átmérő) falvastagságának százalékos aránya (%MWT) a következő egyenlet segítségével került kiszámításra: $\%MWT = (M1+M2)/ED \times 100$. A PAH csoportban a falvastagság az összes többi csoporthoz viszonyítva megnőtt (PAH: $71,39 \pm 2,628\%$, kontroll: $53,64 \pm 3,240\%$, WGLL: $47,32 \pm 2,084\%$, sildenafil: $48,91 \pm 3,444\%$). A WGLL és sildenafil-kezelt patkányokban nem figyeltünk meg jelentős eltérést a kontroll állatok érfal vastagságához képest (33F ábra).



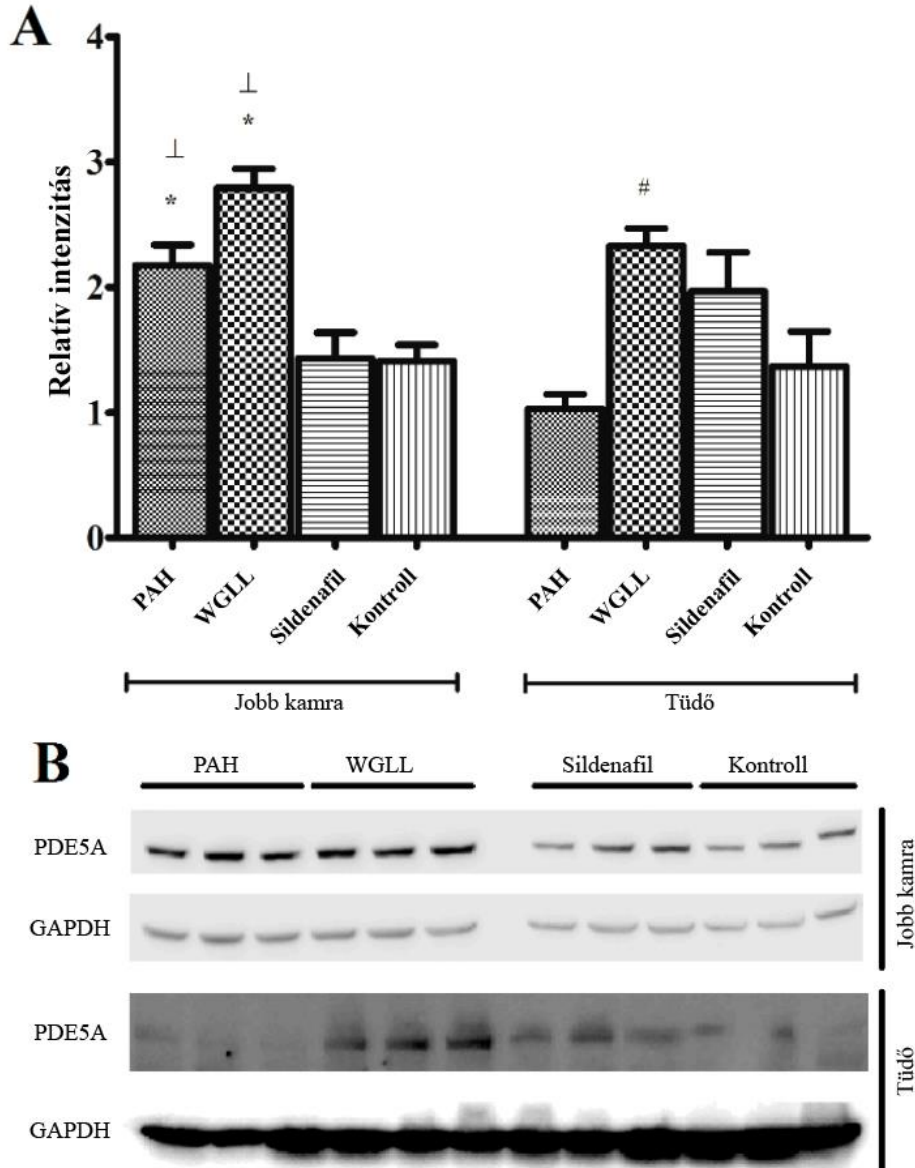
33. ábra. A szív és tüdőmetszetek szövettani analízise (A: reprezentatív ábra, B-D: 40x-es nagyítás).

Rövidítések: RV: jobb kamra; LV: bal kamra; S: interventrikuláris szeptum. A fekete háromszögek a kis pulmonális ereket jelölik. A * a kontroll csoporthoz viszonyított, a ** a WGLL csoporthoz viszonyított, a ⊥ a sildenafil csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).

WGLL hatása a PDE5 expresszióra

A jobb kamrában és a tüdőben mért PDE5A expressziót a 34A és 34B ábra mutatja be. A szívben a PDE5A expresszió szignifikánsan magasabb volt a PAH és WGLL csoportban a sildenafil és kontroll állatokhoz viszonyítva (PAH: $2,174 \pm 0,110$, WGLL: $2,690 \pm 0,096$, sildenafil: $1,432 \pm 0,139$, kontroll: $1,410 \pm 0,088$). Emellett a sildenafil kezelés láthatóan gátolta a PDE5A expressziót a jobb kamrában. A WGLL és PAH csoportok jobb kamrai homogenizátumainak PDE5A expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést egymáshoz

hasonlítva. Ezzel szemben a tüdőben a WGLL csoportban mért PDE5A expresszió jelentősen magasabb volt, mint a PAH patkányoknál, illetve az MCT csoportok nem különböztek statisztikailag szignifikáns mértékben az egészséges kontrolltól (kontroll: $1,367 \pm 0,189$, WGLL: $2,329 \pm 0,094$, sildenafil: $1,968 \pm 0,209$, PAH: $1,029 \pm 0,079$).



34. ábra. A Western blot analízis eredményei.

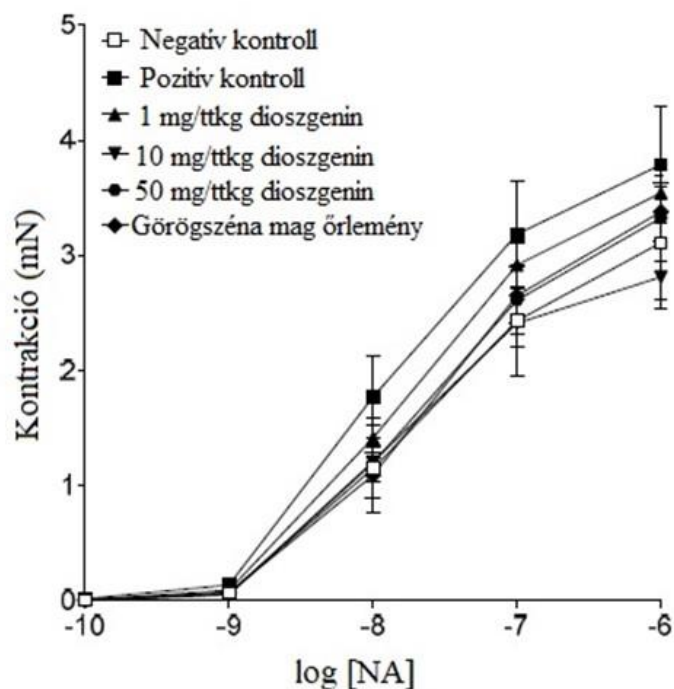
A GAPDH fehérje szinteket használtuk referenciaként. A * a kontroll csoporthoz viszonyított, a # a PAH csoporthoz viszonyított, a † a sildenafil csoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli ($p < 0,05$).

Eredmények VIII.*A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai a testsúly-növekedésre*

A 6 hetes kezelést követően sem a testsúly, sem az éhomi glükóz, sem az inzulin plazmakoncentráció nem mutatott jelentős különbségeket az egyes csoportok között. Ezen eredmények mutatják, hogy az alkalmazott állatmodellben sem obezitás, sem inzulinrezisztencia (a metabolikus szindróma két jellemző kóros állapota) nem alakult ki. Következésképpen, a görögszéna, illetve a diosgenin kezelés sem okozott jelentős változást a testsúlyban és a glükóz homeosztázisban sem.

A noradrenalinra adott válasz izolált éren

A 6 csoport között nem mutatkozott szignifikáns különbség az egyes noradrenalin koncentrációra adott válaszok tekintetében (35. ábra). Ugyanakkor egy statisztikailag nem szignifikáns növekedés tapasztalható a pozitív kontroll csoport (magas zsír- és szénhidrát diéta) noradrenalin-érzékenysége esetén (a negatív kontroll/normál tápos csoporttal összehasonlítva), mely az NO csökkent termelődéséből és/vagy nehezebb hozzáférhetőségéből is eredhet.



35. ábra. A noradrenalin (NA) hatása a görögszéna mag őrléménnyel, illetve különböző koncentrációjú dioszeninnel kezelt magas zsír- és szénhidrát (HFHS) étrenden tartott, valamint a kezeletlen HFHS diétás pozitív kontroll és normál tápos negatív kontroll patkányokból izolált abdominális aortára.

Az X tengely a noradrenalin koncentrációk tízes alapú logaritmusát, az Y tengely az aorta gyűrűk (a nyugalmi értéken felüli) kontrakciós erejét mutatja. A gyűrűk hossza a vizsgálataink

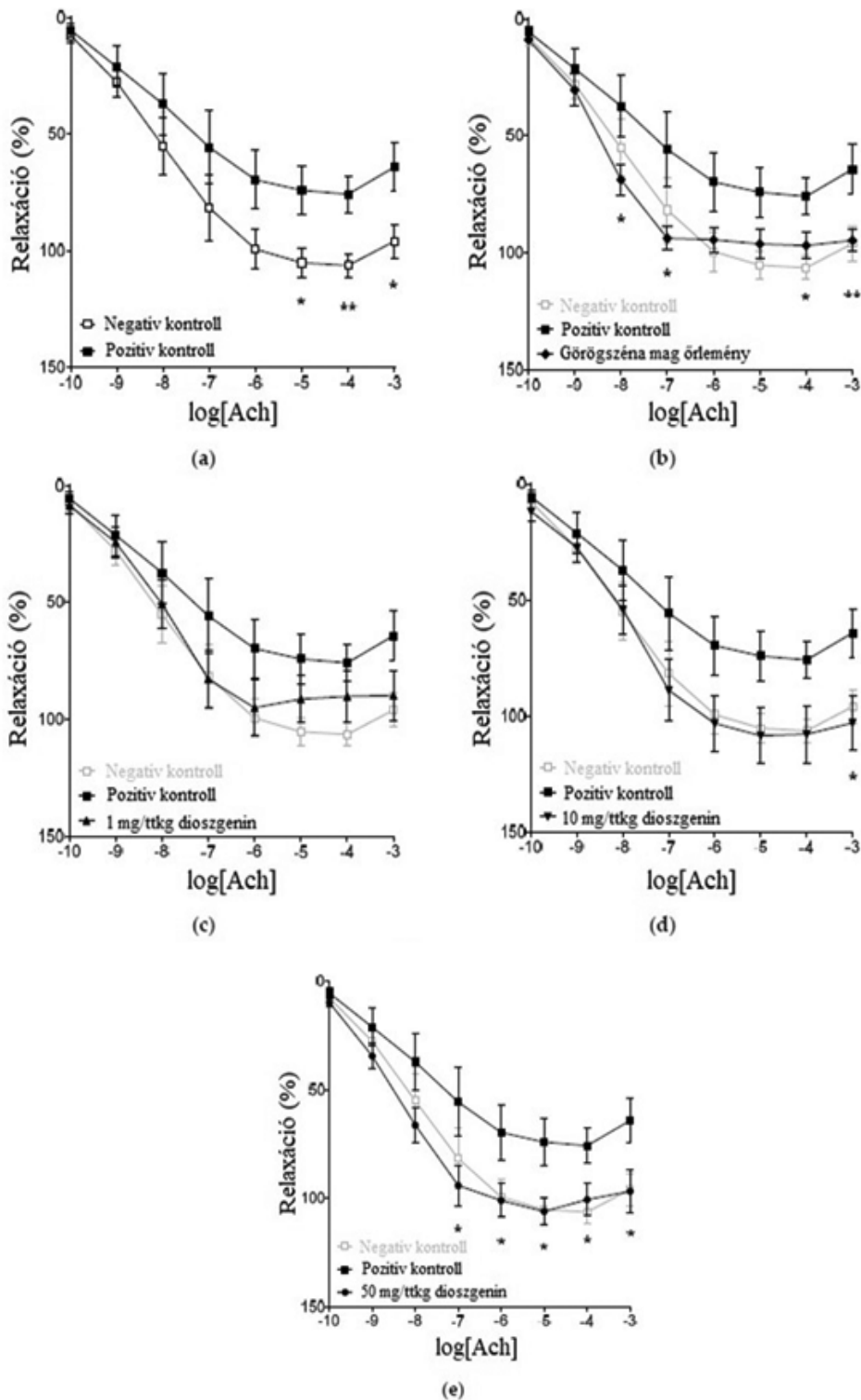
során végig azonos volt. A jelölések a noradrenalin hatásának átlagát mutatják az egyes csoportok esetén (\pm SEM).

Az acetil-kolinra adott válasz izolált éren

A negatív kontroll csoport esetén (mely állatok normál tápot és csapvizet kaptak) 10-100 μ mol/l acetil-kolin (Ach) teljesen megszüntette az EC_{50} noradrenalin-kiváltotta pre-kontrakciót. A pozitív kontroll csoporttal (HFHS étrenden tartott állatok) összehasonlítva, a 10, 100, 1000 μ mol/l koncentrációk esetén szignifikáns különbség mutatkozott (36A ábra). Az alkalmazott HFHS diétás patkánymodellben, az obezitás és az inzulinrezisztencia hiányának ellenére (36. ábra), az endotél diszfunkció a károsodott szénhidrát/lipid metabolizmusra utal.

A 2 g/ttkg/nap görögszéna mag őrlemény kezelés szignifikánsan javította az acetil-kolinra adott választ (még viszonylag alacsony koncentrációk esetén is), majdnem teljesen ellensúlyozva a HFHS diéta okozta káros hatásokat (36B ábra). A diosgenin kezelés, melynek a görögszéna hatóanyagaként a kedvező hatást tulajdonítottuk, a görögszéna magőrleményhez hasonlóan hatott jelen modell esetén. Noha az 1 mg/ttkg/nap diosgenin statisztikailag nem ért el szignifikáns eredményt (a csoport individuális acetil-kolin válaszána nagy szórása miatt) (36C ábra), a 10 és 50 mg/ttkg/nap diosgenin kezelések már szignifikánsan nagyobb acetil-kolin kiváltotta relaxációt eredményeztek (főként közepes és nagyobb acetil-kolin koncentrációk esetén), a pozitív kontroll csoporttal összehasonlítva (36D, 36E ábra). Mindazonáltal, az acetil-kolinra adott válasz tekintetében nem volt szignifikáns különbség a görögszéna és a diosgenin kezelésben részesülő csoportok között.

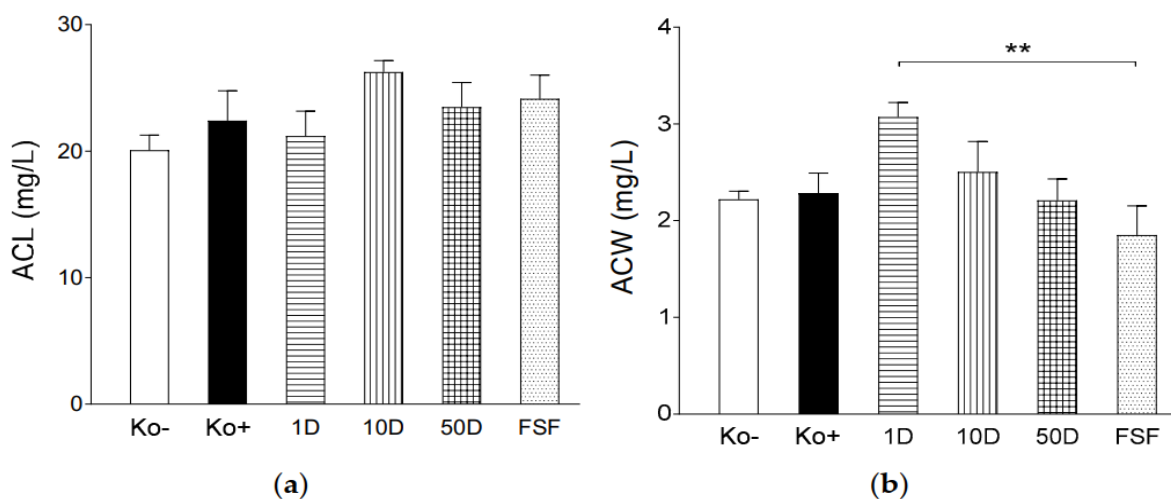
Ugyanakkor a 2 g/ttkg/nap görögszéna mag őrlemény kezelés (mely diosgenin tartalom tekintetében a 10 mg/ttkg/nap mennyiségnek felel meg) két érdekes különbséget mutatott a diosgenin kezeléssel összehasonlítva. Egyrészt, a görögszéna-kezelt csoport esetén volt a leghatékonyabb az acetil-kolin koncentráció-hatás (E/c) görbe, mely a görögszéna mag őrlemény számos összetevője komplex hatásának tulajdonítható. Másrészt, kizárólag a görögszéna kezelés tudta szignifikánsan növelni a relaxáció mértékét a 10 nmol/l (tehát egy viszonylag alacsony) acetil-kolin koncentráció esetén, noha az acetil-kolin kiváltotta maximális relaxáció (nem szignifikánsan) kisebb volt, mint a negatív kontroll vagy a diosgenin-kezelt csoport esetén. Szintén érdekes megfigyelés, hogy az egyes diosgenin koncentrációk nagyjából hasonló acetil-kolin választ adtak, a növekvő diosgenin koncentráció jelentősen csökkentette az eredmények szórását, homogenizálva a minták acetil-kolin válaszáat.



36. ábra. Az acetil-kolin hatása a görögszéna mag örleménnyel (B), valamint különböző dózisú diosgeninnel kezelt magas zsír- és szénhidrát tartalmú (HFHS) étrenden tartott (C-E), illetve a pozitív (HFHS) és negatív (normál táp) kontroll (a) csoportok patkányainak izolált aorta abdominalisára.

Minden aortagyűrűt noradrenalinval prekontraháltunk az acetil-kolin beadása előtt. Az X tengely az acetil-kolin koncentráció tízes alapú logaritmusát, az Y tengely az aortagyűrűk kontrakciójának százalékos csökkenését mutatja. A jelölések az acetil-kolin hatásának átlagát mutatják az egyes csoportok esetén (\pm SEM). A csillagok a csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelölik (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Vizsgáltuk az egyes kezelések, étrendek hatását a plazma glutation szintjére, illetve glutation-átalakító enzimek aktivitására és antioxidáns kapacitására. A pozitív kontroll csoportban (a negatív kontrollal összevetve) nőtt az oxidált glutation szint, mely arra enged következtetni, hogy a magas zsír- és szénhidrát tartalmú (HFHS) diéta a vér oxidoreduktív egyensúlyát az oxidatív irányba tolja. Valószínűleg a HFHS diéta által kiváltott oxidatív stressz kompenzációs mechanizmusaként, a pozitív kontroll csoport esetén nőtt a redukált glutatin plazmaszintje is, mely a redukált és oxidált forma változatlan arányához vezetett. Ugyanakkor megfigyelhető volt, hogy a diosgenin és a görögyszéna kezelés egyaránt drámaian csökkentette a glutation koncentrációt mind a két forma esetén. Figyelembe véve, hogy a diosgenin és a görögyszéna bizonyos összetevői (beleértve a diosgenint) képesek voltak ellensúlyozni a HFHS diéta okozta oxidatív stresszt, látható, hogy ezen anyagok még kis glutation plazmaszintek esetén is képesek antioxidáns hatást kifejteni. A glutation-peroxidáz aktivitás nem mutatott jelentős különbséget az egyes csoportok között. Ugyanakkor a glutation-reduktáz szintje, mely az oxidált glutation visszaalakításában, redukálásában vesz részt, szignifikánsan alacsonyabb volt a diosgenin és a görögyszéna kezelt csoportokban mind a negatív mind a pozitív kontroll csoportokhoz képest. Ez utóbbi eredményeink egybevágnak a korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint a diosgenin és talán a görögyszéna néhány egyéb összetevője is hatásos antioxidáns, mely csökkenti a glutation igényt. A glutation (és más endogén oxidoreduktív) rendszer ellensúlyozó folyamatai, melyek egy dinamikus funkcionális egyensúly fenntartására törekcsenek az exogén faktorokkal (például a diosgenin diétával) szemben, arra engednek következtetni, hogy a vér lipid- és a vízdoldékony vegyületeinek antioxidáns kapacitása nem tér el nagymértékben a kísérleti csoportok különböző kezeléseitől (37. ábra).



37. ábra. A magas zsír- és szénhidrát diéta (high-fat, high-sugar diet, HFHS; Pozitív Kontroll; Ko+), a HFHS diéta 2 g/ttkg/nap görögyszéna mag örlemény kezeléssel (Fenugreek seed; FSF), valamint HFHS diéta 1, 10 és 50 mg/ttkg/nap diosgenin kezeléssel (1D, 10D és 50 D) kombinált hatása a vér lipid (A) és vízdoldékony (B) vegyületeinek antioxidáns kapacitására Wistar patkányokban.

A negatív kontroll (Ko-) csoport állatai hagyományos tápot kaptak a kezelés során. Az oszlopok az egyes csoportok átlagértékeit mutatják (\pm SEM). A csillagok a csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelölik (**: $p < 0,01$).

Eredmények IX.

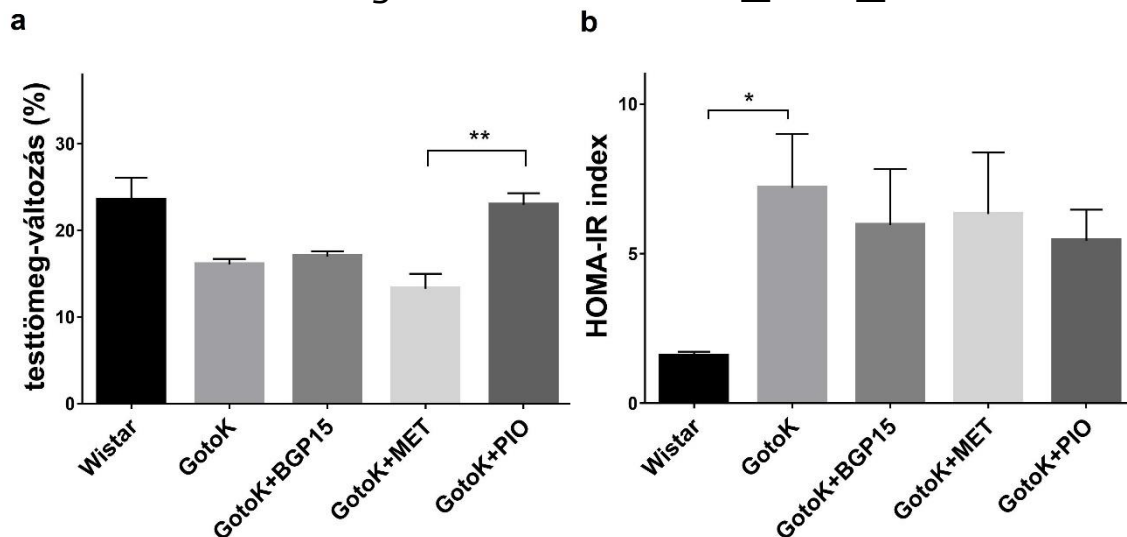
BGP-15 hatása a Goto-Kakizaki és Wistar patkányok metabolikus paramétereire

Az 5. táblázat és a 38. ábra a szérumban inzulín és glükóz szintek mellett a különböző patkány csoportok (Wistar, GotoK, BGP-15 kezelt GotoK, metforminnal kezelt GotoK és pioglitazonnal kezelt GotoK, 12 héten keresztül) testsúlyát ábrázolja. A kísérlet kezdetén a 4 GotoK csoportba tartozó patkányok testsúlya szignifikánsan nem különbözött. Az állatok véletlenszerű elosztása ellenére a GotoK és GotoK+MET csoportok kiinduláskor mért testtömege némileg alacsonyabb volt a Wistar patkányokéhoz képest. A GotoK csoportok esetében nem volt megfigyelhető testsúly növekedés, egy kivétellel: a Dunn's post hoc teszt a kísérlet végpontjában különbséget mutatott a MET és PIO állatok súlygyarapodásában. A 12 hetes periódus után a GotoK patkányok éhomi glükózszintje szignifikánsan emelkedett volt a Wistar kontrollokéhoz képest, és bár minden kezelés csökkentette a szérumban glükózszintjét, csak a pioglitazon kezelés hatása érte el a szignifikancia szintet ($p < 0,05$). Az inzulínrezisztenciát jelző HOMA-IR indexet a végpontban mért bazális szérumban glükóz és inzulín értékek alapján számítottuk, az így kapott eredmény szignifikáns eltérést mutatott a GotoK és Wistar patkányok között ($p < 0,05$).

	Éhomi glükóz (mmol/l)	Éhomi inzulín (μ IU/ml)	Kezdeti testtömeg (g)	Végponti testtömeg (g)
Wistar	6,280 \pm 0,4283	5,850 \pm 0,1323	407,8 \pm 3,798	539,8 \pm 22,45
GotoK	13,62 \pm 0,6256*	12,53 \pm 3,292	313,8 \pm 4,070*	374,0 \pm 6,266*
GotoK+BGP15	10,92 \pm 0,5607	12,30 \pm 3,793	318,3 \pm 5,566	383,8 \pm 9,024
GotoK+MET	11,20 \pm 1,002	12,82 \pm 4,104	312,7 \pm 5,655*	361,7 \pm 12,27*
GotoK+PIO	7,880 \pm 0,3121#	14,83 \pm 2,768	316,3 \pm 3,658	411,3 \pm 10,40

5. táblázat. A Wistar és a GotoK patkányok testtömege és éhomi glükóz- és inzulín plazmaszintjei.

A GotoK diabéteszes állatok plazma glükóz szintje magasabb volt, a pioglitazon-kezelt állatok glükóz értékei szignifikánsan csökkentek a kezeléseik végére. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc teszttel. *: vs. Wistar; #: vs. GotoK ($p < 0,05$)

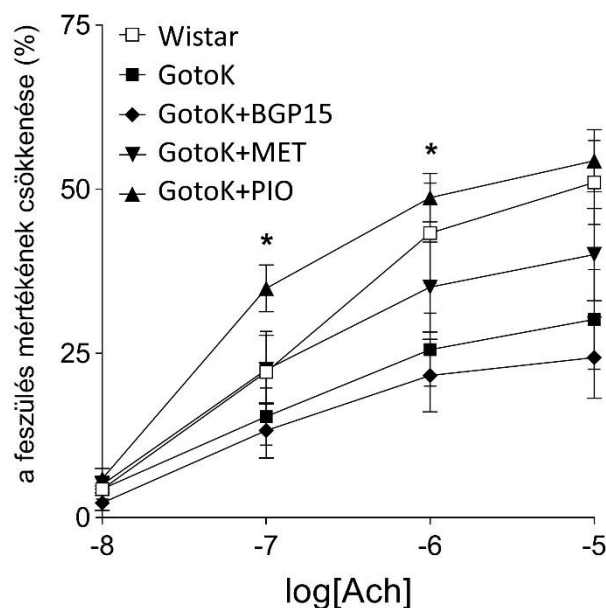


38. ábra. Metabolikus paraméterek.

Az „a” diagram az állatok testtömegének változását szemlélteti a kezdeti- és végpont (0. és 12. hét) között. A pioglitazon-kezelt patkányok testtömege gyarapodott a legnagyobb mértékben. A „b” diagram a HOMA-IR indexet szemlélteti, jól látható, hogy a GotoK állatok inzulinrezisztensek voltak. Az adatok átlag SEM-ben vannak ábrázolva, $n=6$ /csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn’s post-hoc teszttel. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik (vs. Wistar); *: $p<0,05$; **: $p<0,01$.

BGP-15 hatása az endotél-függő vazorelaxációra

Wistar patkányok aorta-mintáiban $10 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú acetil-kolin hozzávetőlegesen 50%-kal csökkentette az előzetesen 10nmol/l koncentrációjú norepinephrinnel létrehozott prekontrakciót (39. ábra). A kezelés nélküli GotoK csoportban az acetil-kolinra adott vazodilatáció mértéke alacsonyabb volt a Wistar állatokban létrejött válaszhoz képest (ez nem érte el a szignifikancia szintjét, valószínűleg a relatíve kis elemszám és a következményes nagy szórás miatt), így a GotoK patkányok endotél funkciója nagyobb mértékben károsodott, mint a Wistar csoporté. A BGP-15 és a metformin kezelés nem javította szignifikánsan a Goto-Kakizaki állatok aortájának acetil-kolinra irányuló csökkent fogékonyságát, habár a metformin magasabb dózisban úgy tűnt, hogy fokozza az endotél-függő vazorelaxációt. Ezzel szemben a pioglitazon szignifikánsan növelte az acetil-kolinra adott választ, annak 100nmol/l és $1 \mu\text{mol/l}$ -os koncentrációja esetén (a kezeletlen GotoK csoporthoz viszonyítva). Továbbá a pioglitazon-kezelés jelentős mértékű vazorelaxációt okozott ($p=0,1261$ $0,1 \mu\text{mol/l}$ Ach koncentráció) a Wistar csoportban tapasztaltakhoz képest is.



39. ábra. Endotél-függő vazorelaxáció.

Az acetyl-kolin egyre növekvő koncentrációban csökkenti az érgyűrű feszülését. A kezeletlen GotoK állatokban az Ach-ra adott válasz kismértékben csökkenni látszott, ellenben a pioglitazon-kezelt csoportban a vazorelaxáció szignifikánsan magasabb a GotoK-hoz viszonyítva. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, egyutas variancia-analízis, Geisser-Greenhouse korrekcióval és Tukey poszt-tesztel. *: GotoK+PIO vs. GotoK, $p < 0,05$.

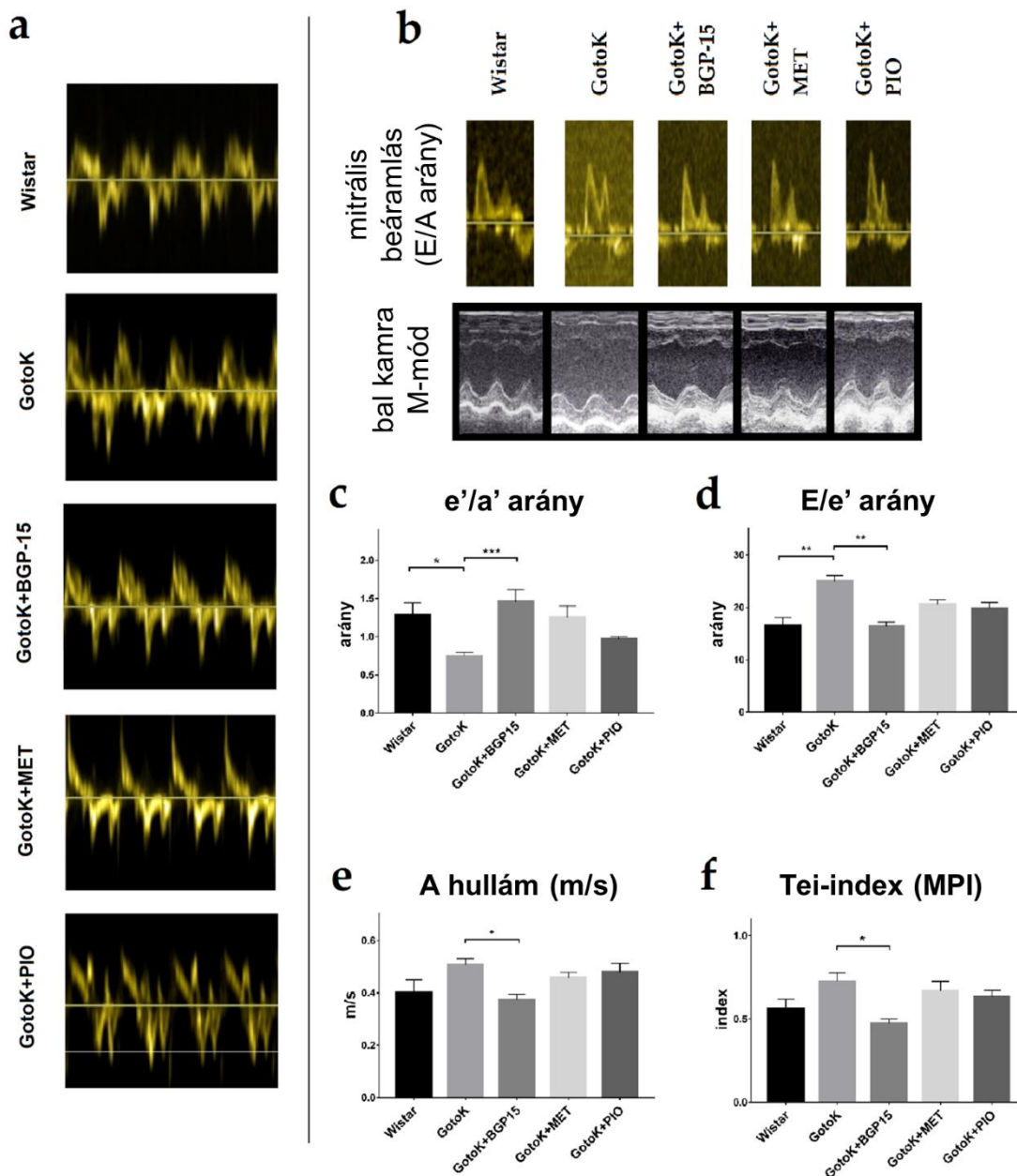
A BGP-15 javítja a diasztolés funkciót

Paraméter	Wistar	GotoK	GotoK+BGP-15	GotoK+MET	GotoK+PIO
LVIDd (mm)	7,267±0,278	6,918±0,167	7,243±0,183	6,483±0,425	7,323±0,400
LVIDs (mm)	4,365±0,201	4,515±0,095	4,69±0,193	3,940±0,200	4,478±0,345
FS (%)	39,94±1,474	33,27±1,667	37,62±0,727	38,85±1,715	39,21±1,608
EF (%)	68,92±1,813	60,36±2,343	66,13±0,891	67,94±2,068	67,98±2,110
MV E (m/s)	0,612±0,047	0,883±0,024**	0,648±0,021##	0,763±0,025	0,810±0,033
MV A (m/s)	0,402±0,048	0,507±0,023	0,372±0,022#	0,457±0,021	0,480±0,032
E/A arány	1,554±0,070	1,735±0,117	1,762±0,066	1,698±0,0840	1,645±0,089
MV DecT (ms)	53,83±3,692	62,33±2,883	55,00±3,759	58,00±3,425	53,00±3,162
e'/a' arány	1,284±0,158	0,744±0,056*	1,458±0,155#	1,249±0,153	0,968±0,032
E/e' arány	16,48±1,512	24,92±1,114**	16,31±0,918##	20,58±0,766	19,74±1,156
LVOT Vmax (m/s)	0,768±0,037	0,998±0,026**	0,780±0,029#	0,768±0,008#	0,812±0,039
IVCT (ms)	15,67±2,906	18,00±3,777	18,83±3,516	22,83±3,167	16,83±2,272
IVRT (ms)	32,50±1,258	30,33±3,007	32,50±1,057	35,17±1,515	34,00±1,438
LV ET (ms)	87,67±3,116	63,67±1,961*	101,7±3,703###	87,83±5,282	80,67±1,745
Tei-index (MPI)	0,558±0,058	0,724±0,051	0,471±0,027#	0,669±0,055	0,632±0,039
RV E (m/s)	0,332±0,026	0,497±0,044	0,368±0,034	0,383±0,048	0,364±0,027
RV A (m/s)	0,498±0,041	0,628±0,073	0,578±0,033	0,235±0,003#	0,356±0,074

6. táblázat. A patkánymodell-kísérletekből származó echokardiográfias paraméterek (2D-, M-mód-, Doppler- és TDI-echokardiográfia).

A GotoK állatok diasztolés funkciója romlott a kontrollhoz képest, míg a BGP-15-kezelt patkányok diasztolégiája szignifikánsan javult, gyakorlatilag megőrzött maradt. A rövidítések magyarázata és a paraméterek által jelzett funkciók az Anyagok és módszerek Echokardiográfia fejezetében kerültek ismertetésre. Az adatok átlag \pm SEM-ben vannak megadva, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc teszttel. *: vs. Wistar (p<0.05); **: vs. Wistar (p<0,01); #: vs. GotoK (p<0,05); ##: vs. GotoK (p<0,01); ###: vs. GotoK (p<0,001).

Eredményeinket a 6. táblázat és a 40. ábra foglalja össze. Az echokardiográfiával értékelhető diasztolés funkció romlott a GotoK patkányokban a Wistar kontrollhoz képest, de a BGP-15 kezelés hatására normalizálódott. A korai és késői mitralis anulus mozgási sebesség aránya (e'/a') megfordult a GotoK csoportban ($0,744 \pm 0,056$, p=0,0386 vs. Wistar), de szignifikánsan emelkedett a BGP-15-tel kezelt állatokban ($1,458 \pm 0,155$, p=0,0023 vs. GotoK). Az E/e' arány (amely a bal kamrai töltőnyomás becslésére alkalmas) nőtt a GotoK patkányokban (p=0,0045 vs. Wistar), azonban a BGP-15 adása normalizálta az értéket (p=0,0019 vs. GotoK). A korai (E) és késői (A) mitrális beáramlási csúcsebességek hányadosa emelkedett a GotoK csoportban, azonban az E/A arány és a DecT értékei nem különböznek szignifikánsan a GotoK és Wistar patkányokban.



40. ábra. Illusztratív echokardiográfiás felvételek.

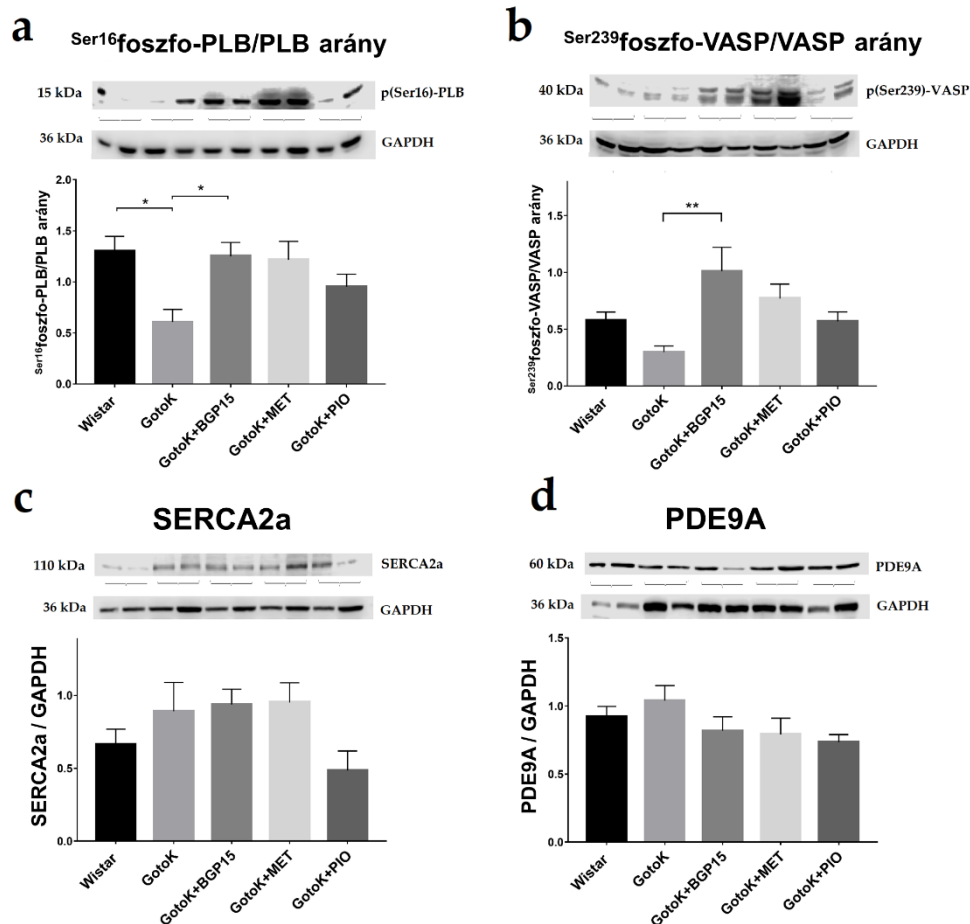
„a” diagram: TDI felvételek, az e' és a' hullámok negatív irányban láthatók. „b” diagram: mitrális beáramlás (pozitív irányú E és A hullámok), valamint bal kamrai M-mód felvételek. „c” diagram: e'/a' arány grafikon, a diasztolés funkciót jelzi; „d” E/e' arány, a kamrai töltőnyomásra utal; „e” diagram: Dopplerrel mért A hullám, a pitvar hozzájárulása a kamratelődéshez; „f” diagram: Tei-index, vagy miokardiális teljesítmény (MPI), a kisebb index jobb teljesítményt jelöl. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc teszttel. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik (vs. Wistar); *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

A szisztolés funkció kis mértékben romlott a GotoK csoportban, mivel a bal kamrai ejekciós idő (LV ET) megrövidült (p=0,05 vs. Wistar), de növekedett a GotoK+BGP15 csoportban (p=0,0001 vs. GotoK), továbbá a frakcionált rövidülés (FS) csökkenése nem érte el a szignifikancia szintjét (p=0,087 vs. Wistar). A globális kardiális funkció értékelésére használt

Tei-index enyhe romlását figyelhettük meg a GotoK állatokban ($p=0,388$ vs. Wistar) és szignifikánsan javult a BGP-15 kezelés eredményeképpen, mivel az ejekció időtartama is megnőtt ($p=0,0147$ vs. GotoK). A metforminnal kezelt GotoK patkányok esetében az e'/a' arány megőrzött volt, a szisztolés funkciót leíró paraméterek (frakcionált rövidülés, ejekciós frakció) változása nem volt szignifikáns a kezeletlen GotoK csoporthoz képest. A pioglitazon kezelés hatására (összehasonlítva a nem kezelt GotoK patkányokkal) nem történt változás az echokardiográfiás paraméterek terén.

A BGP-15 emeli a foszfolamban és a VASP fehérjék foszforilációs szintjét

A Western blot analízist foszfo-specifikus antitestekkel végeztük (célpontok a következők voltak: foszfolambán (PLB) 16-os szerin aminosava és a vazodilatátor-stimulált foszfoprotein (VASP) 239-es szerin aminosava), melynek eredményeképpen a patkány miokardiumokban a PLB és a VASP foszforilációs szintjében jelentős eltéréseket találtunk (41. ábra). A foszfo(Ser16)-PLB / nem foszforilált forma (pPLB/PLB) aránya szignifikánsan csökkent a GotoK csoportban a Wistarban mérthez képest ($p=0,0171$), de nőtt a BGP-15 kezelés hatására a cukorbeteg GotoK állatok értékeihez képest ($p=0,0348$). A metformin kezelés hasonló tendenciát mutatott ($p=0,1432$ vs. GotoK). Mivel a PLB 239-es szerin aminosava a Protein Kináz G (PKG) foszforilációs célpontja, ezért a foszfo (Ser239)-VASP (amely így PKG aktivitás becslésére alkalmas) expresszióját is megmértük, és meghatároztuk a foszfo (Ser239)-VASP / nem foszforilált VASP (pVASP/VASP) arányt is. A pVASP/VASP aránya a pPLB/PLB arányhoz hasonlóan alakult, hiszen a kezeletlen GotoK csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett a BGP-15-tel kezelt állatokban ($p=0,0094$), a metformin kezelés pedig nem okozott szignifikáns emelkedést ($p=0,0877$ vs. GotoK). A kezelési csoportok között nem észleltünk eltérést a SERCA2a kifejeződésében. A ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) lebontásáért felelős foszfo-diészteráz 9A (PDE9A) expressziós szintje sem különbözött szignifikánsan a csoportok között.



41. ábra. A Western blot vizsgálatok eredményei.

A SERCA pumpa funkcióját reguláló foszfolambán (PLB) fehérje foszforilációja csökkent a GotoK csoportban, ugyanakkor szignifikánsan nőtt a BGP-15-kezelt csoportban („a” panel). A PKG-célpont VASP protein foszforiláltsága hasonló sémát mutatott („b” panel). A SERCA2a expressziója nem változott szignifikánsan („c” panel), és a PDE9A szintek változása sem érte el a szignifikancia határát („d” panel). Az expressziókat GAPDH háztartási fehérjére normalizáltuk, a „kDa” a kilodaltonban megadott molekulatömeg. Átlag±SEM, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn’s post-hoc teszt. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: p<0,05; **: p<0,01.

Eredmények X.

A hiperkoleszterinémia hatása a szívfunkciós paraméterek változására echokardiográfia segítségével

Eredményeinket a 7. és 8. táblázat foglalja össze. Az echokardiográfias paraméterekben szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a HC és Kontroll nyulak között, főleg a diasztolés funkciót leíró mutatók területén. A HC csoportban nőtt a bal pitvar mérete, a bal kamra tömege és relatív falvastagsága, a kiáramlási traktus sebessége és nyomásgrádiense, míg az E/A és a szeptális e'/a' arányok csökkentek, valamint a decelerációs idő megnyúlt és az E/e' arány is

emelkedett. Az izovolumetriás relaxációs idő extrém módon megnyúlt, a miokardium globális teljesítményét jelző Tei index értéke pedig nőtt. Ami a szisztolés funkciót illeti, az ejekciós frakció (EF) és a frakcionált rövidülés (FS) kis mértékben csökkent (de a normál tartományon belül maradt), míg a mitrális anulus síkírányú szisztolés kitérésére (MAPSE) nem volt hatással a kezelés. Speckle Tracking echokardiográfia során csökkent globális longitudinális szisztolés funkciót (GLS) detektáltunk a HC állapotokban a Kontroll csoporthoz képest. A Speckle Tracking echokardiográfia során a globális longitudinális szisztolés kamrafunkciót a GLS (global longitudinal strain) értékkel jellemezhetjük. A global longitudinal strain negatív irányú, a miokardium rostjainak maximális összehúzódását úgymond a tömörödését mutatja meg az eredeti (relaxált) állapothoz képest. A GLS értéke az egészséges 21,34%-ról 16% körüli értékre csökkent a HC csoportban, mely az ejekciós frakciónál specifikusabban jelzi a kezdődő szisztolés elégtelenséget (8. táblázat, 42. ábra).

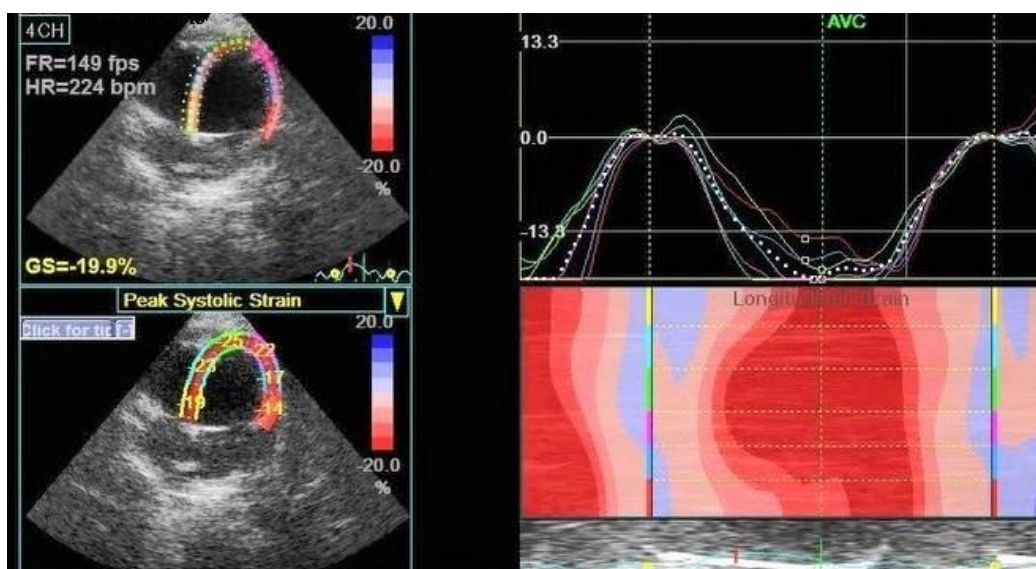
2D és M-mód	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
Bal pitvar területe (cm ²)	0,833 ± 0,029	1,633 ± 0,065 ****	<0,0001
IVSd (mm)	2,27 ± 0,139	2,882 ± 0,176 *	0,0149
BK tömege (g)	4,651 ± 0,433	8,035 ± 0,655 ***	0,0005
RWT (%)	0,283 ± 0,017	0,362 ± 0,018 **	0,0050
FS (%)	30,78 ± 0,434	28,44 ± 0,669 **	0,0099
EF (%)	62,22 ± 0,619	58,33 ± 0,898 **	0,0026
MAPSE (mm)	5,488 ± 0,093	5,661 ± 0,254	0,5147
LVOT paraméterek	Kontroll	HC	p érték
Vmax (m/s)	0,923 ± 0,018	1,204 ± 0,021 ****	<0,0001
Vmean (m/s)	0,601 ± 0,018	0,701 ± 0,027 **	0,0076
maxPG (mmHg)	3,453 ± 0,139	5,832 ± 0,199 ****	<0,0001
meanPG (mmHg)	1,747 ± 0,104	2,637 ± 0,172 ***	0,0004

7. táblázat. A 2D- és M-mód echokardiográfia eredményei.

A HC csoportban igen markáns különbségek jelentek meg a Kontroll csoporthoz viszonyítva. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001. A rövidítések magyarázata az Anyagok és módszerek Echokardiográfia fejezetében található.

Doppler és TDI	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
E hullám (m/s)	0,630 ± 0,022	0,698 ± 0,047	0,2049
A hullám (m/s)	0,391 ± 0,012	0,653 ± 0,042 ****	<0,0001
E/A arány	1,624 ± 0,068	1,069 ± 0,039 ****	<0,0001
DecT (ms)	55,44 ± 2,001	71,22 ± 2,666 ***	0,0002
TDI e'/a' arány	1,233 ± 0,060	0,935 ± 0,054 **	0,0020
E/e' arány	8,002 ± 0,164	13,20 ± 1,091 ***	0,0002
IVRT (ms)	30,78 ± 1,188	56,56 ± 2,588 ****	<0,0001
Tei-index (MPI)	0,528 ± 0,013	0,8385 ± 0,049 ****	<0,0001
Strain (STE)	Kontroll	HC	p érték
GLS	-21,34 ± 0,664	-16,07 ± 1,029 ***	0,0007

8. táblázat. A Doppler- és Speckle Tracking (STE) echokardiográfia során nyert adatok. A HC csoport diasztolés és szisztolés funkciója is szignifikánsan romlott. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001. A rövidítések magyarázata az Anyagok és módszerek Echokardiográfia fejezetében található.



42. ábra. Speckle Tracking (STE) echokardiográfias módszerünk során kapott reprezentatív kép.

HC hatása a morfolometriai paraméterekre

Az eredményeket a 9. táblázatban foglaltuk össze. Az aterogén diétán tartott nyulak testsúlya és a bal kamra tömege is szignifikánsan nőtt a normál tápot kapó egyedek értékeihez viszonyítva. Mivel a kísérleti állatok testsúlya fluktuált, a bal kamra tömegét egy statikusabb paraméterre, a tibia hosszra normalizáltuk. A tüdő és vese nedves/száraz tömegarányaiban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezelési csoportok között.

Testtömeg (g)	3064 ± 87	4153 ± 86 ***
A szív tömege (g)	7,795 ± 0,418	12,25 ± 0,535 ***
A szív tömege/testtömeg	0,00253 ± 0,0003	0,00294 ± 0,0002
BK tömege (g)	6,22 ± 0,337	10,13 ± 0,534 ***
BK tömege/tibiahossz	0,605 ± 0,046	0,828 ± 0,038 **
BK tömege/testtömeg	0,00087 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0002
Tüdő nedves/száraz tömegarány	5,254 ± 0,147	5,118 ± 0,094
Vese nedves/száraz tömegarány	3,421 ± 0,058	3,281 ± 0,191

9. táblázat. Morfometriai paraméterek.

A HC csoportban a bal kamra tömege szignifikánsan nőtt. A szervek nedves/száraz tömegaránya még nem mutat különbséget a csoportok között. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Szérum paraméterek

A szérum paramétereket a 10. táblázat foglalja össze. Egészséges állatokban az összes vizsgált laboratóriumi érték a normál tartományba esett, ehhez képest a HC csoportban drámaian emelkedett a szérum koleszterin, az LDL és az apolipoprotein B (ApoB) szint. Az aterogén-index és az ApoB/ApoA arány szignifikánsan nőtt a beteg csoportban a Kontroll nyulakhoz képest. A májenzimek esetében nem tapasztaltunk változást. A HC állatokban a troponin-T és a kreatinin szint magasabb volt, viszont a kreatin-kináz MB izoenzime (CK-MB) nem változott. Tanulmányunk limitációjaként fontos megjegyezni, hogy a BNP előalakjaként ismert N-terminális pro-BNP (NT-pro-BNP) szintje minden állatban a detektálható szint alatt volt, így statisztikai elemzést ezzel a paraméterrel nem tudtunk végezni.

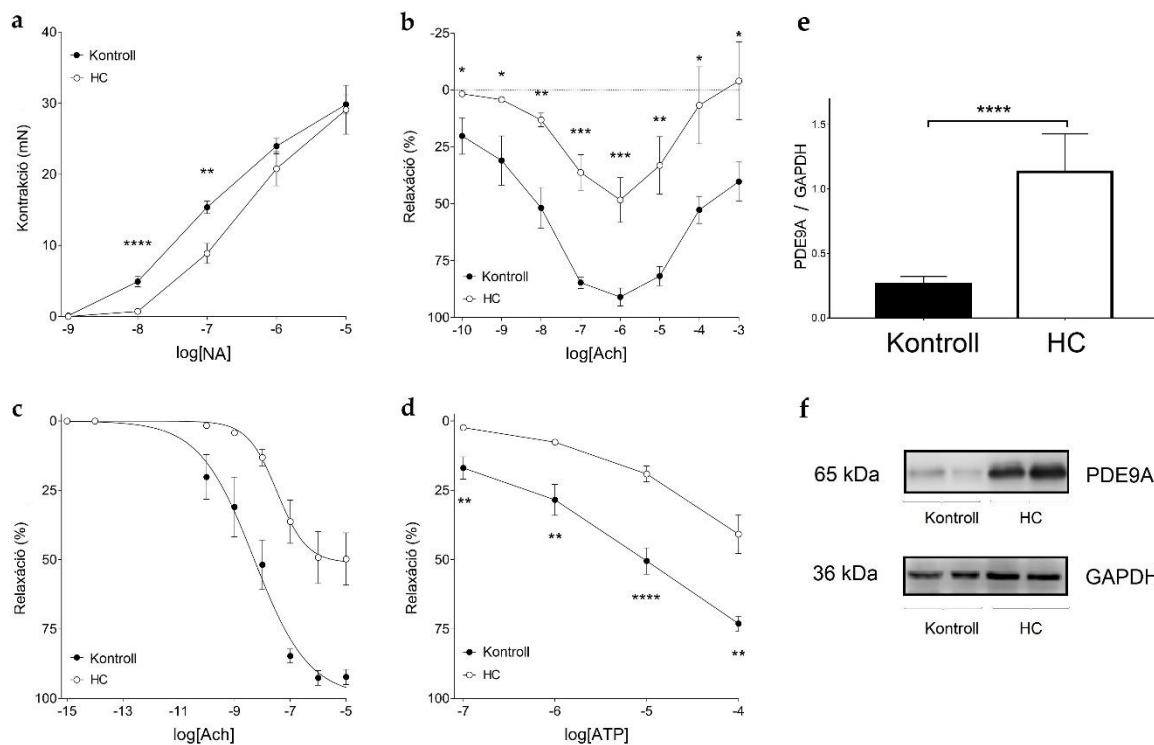
	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
Össz-koleszterin (mmol/l)	1,753 ± 0,0187	32,360 ± 2,164 ****	<0,0001
LDL (mmol/l)	0,725 ± 0,312	32,030 ± 1,813 ****	<0,0001
ApoB (mmol/l)	0,026 ± 0,005	0,154 ± 0,006 ****	<0,0001
HDL (mmol/l)	0,963 ± 0,092	6,428 ± 0,600 ****	<0,0001
ApoA (mmol/l)	0,149 ± 0,011	0,034 ± 0,007 ****	<0,0001
Aterogén-index	1,986 ± 0,391	5,499 ± 0,458 ***	0,0001
ApoB/ApoA arány	0,188 ± 0,041	3,691 ± 0,492 ****	<0,0001
Triglicerid (mmol/l)	1,139 ± 0,136	1,001 ± 0,225	0,6959
AST (GOT) (U/l)	22,710 ± 6,781	33,47 ± 3,016	0,1056
ALT (GPT) (U/l)	64,140 ± 19,660	57,730 ± 5,479	0,6813
Kreatinin (µmol/l)	71,430 ± 12,040	116,100 ± 5,984 **	0,0013
CK-MB (U/l)	1154,0 ± 276,9	785,6 ± 126,1	0,1754
CRP (mg/l)	0,079 ± 0,070	0,325 ± 0,073 *	0,0359
Troponin T (ng/l)	7,438 ± 1,199	20,21 ± 2,778 **	0,0092

10. táblázat. Szérum paraméterek

A HC csoportban drámai hiperkoleszterinémia alakult ki, az aterogén-index szignifikánsan nőtt. A kreatinin, CRP és troponin T értékei is magasabbnak bizonyultak a Kontroll-hoz képest. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok szignifikancia szintjét jelölik, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001.

Endotél-függő vazorelaxáció

A 10 és 100 nmol/l-es koncentrációban alkalmazott noradrenalinra adott kontraktilis válasz szignifikánsan különbözött az egészséges és beteg csoportban, hiszen a HC nyulakban gyengébb összehúzódást tapasztaltunk (43. ábra). 1 µmol/l koncentrációjú acetil-kolin (Ach) mindkét kezelési csoportban relaxációt idézett elő, nagyobb koncentrációban viszont kontrakciót okozott. Az aterogén étrenden tartott állatok esetében az aortagyűrűk relaxációja minden esetben kisebb mértékű volt. A Hill-egyenlet segítségével meghatározott E_{max} és logEC₅₀ értékek szignifikánsan különböztek a két csoportban: az E_{max} jelentős csökkenést mutatott, míg a logEC₅₀ kis mértékben emelkedett az aterogén diéta hatására. Az ATP relaxációt okozott az előzetesen noradrenalinnal kontrahált érgyűrűkön, mely válasz a Kontroll csoportban szignifikánsan erősebb volt, így azt mondhatjuk, hogy az aterogén étrend az ATP-indukálta artériás relaxációt is rontotta. Ez az eredmény megerősíti a korábbi, klasszikus vazodilatátor Ach-val végzett kísérletek megállapításait. A mellkasi aorta mintákon Western blot vizsgálatot is végeztünk, amely fokozott PDE9A expressziót ábrázolt a beteg csoport ereiben, összehasonlítva az egészséges artériákkal.



43. ábra. Az izolált érgyűrű-preparátumokon végzett kísérletek eredményei.

„a” panel: A noradrenalinra (NA) adott kontraktív válasz (a nyugalmi feszüléshez képest), x tengely: NA koncentrációk logaritmusai, y tengely: kontraktív erő (millinewton, mN). A „b” panel az acetil-kolinra (ACh) adott választ, a „c” panel az endotél-függő vazorelaxációt szemlélteti, az x tengely az ACh koncentráció logaritmusai, az y tengely a kontraktív erő %-os csökkenése, a „d” panel a Hill-egyenlet illesztése utáni görbét mutatja meg. A „e” panelen az ATP hatása látható, prekontrakció után. Az „f” panelen a nyulak torakális aorta-mintáiból meghatározott PDE9A expressziója látható a Kontroll és HC csoportokban, míg az „f” panel a reprezentatív blotokat szemlélteti. Az adatok átlag \pm SEM-ben vannak megadva, a *-ok szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

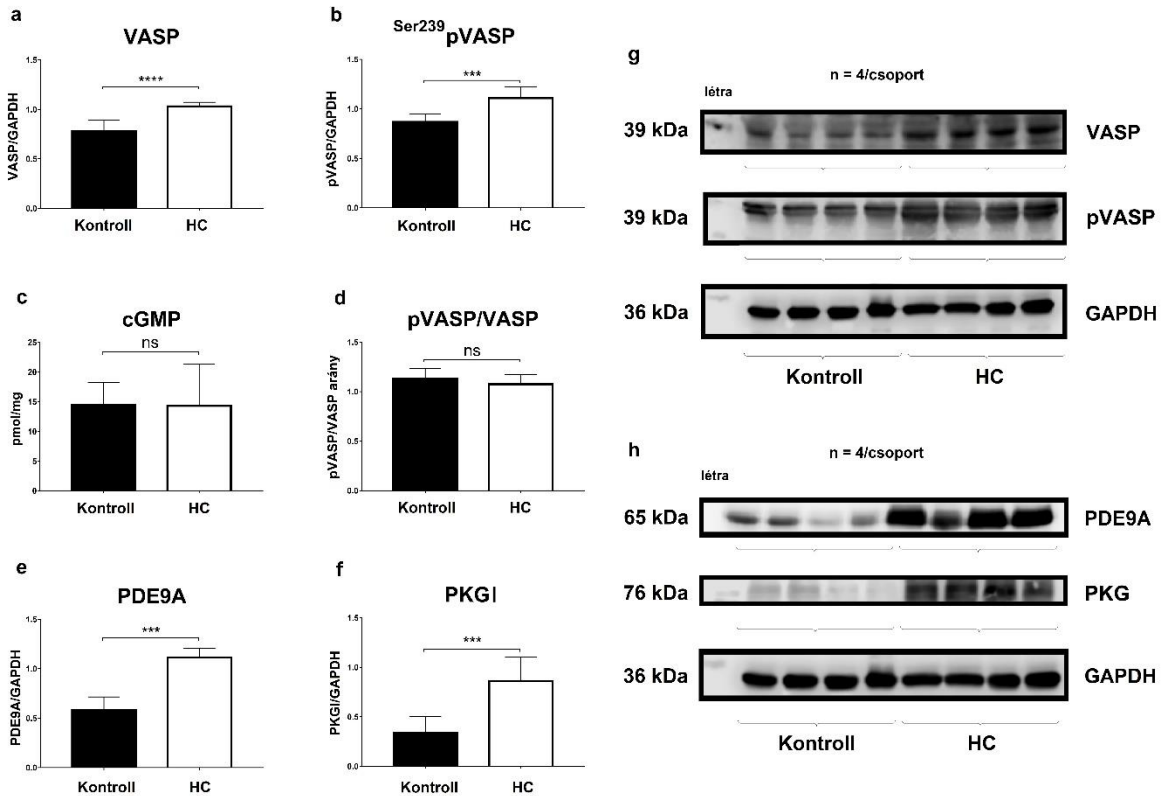
Hiperkoleszterinémia hatása a szövettani elváltozásokra

A HC-nyulak intima rétege szignifikánsan vastagabb volt a kontrollhoz viszonyítva. A beteg csoportban a habos sejteket tartalmazó vastag plakkok miatt az intima vastagsága 1,5-szer nagyobb volt, mint a vaszkuláris média mérete. A két kezelési csoport közötti különbséget tudjuk szemléltetni a kalkulált intima/media aránnyal is: $1,623 \pm 0,079$ (HC) vs. $0,043 \pm 0,004$ (Kontroll). Az érelmeszesedés következtében az intima/media arány is szignifikánsan megnőtt.

VASP, foszforilált VASP, és PDE9A expressziója

A fehérjéket bal kamrai szövetmintákból izoláltuk, az eredmények három különböző mérés átlagaiból származnak. GAPDH-ra standardizáltunk, ezt követően mintegy kétszeres emelkedést tapasztaltunk a PDE9A szintjében a HC csoport mintáiban, az egészséges

nyulakhoz képest ($p < 0,001$). A VASP és a foszforilált VASP (pVASP239) kifejeződése szignifikánsan magasabb volt a koleszterindús diétán tartott nyulakban, viszont a pVASP/VASP arány nem változott, amely változatlan PKG1 aktivitásra utal. A cGMP szintek között sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (44. ábra).



44. ábra. A Western blot és ELISA eredményei.

A VASP („a” panel) és a foszforilált VASP („b” panel) expressziója is emelkedett a HC csoportban. A változatlan cGMP-szint és pVASP/VASP arány („c-d”) változatlan PKG aktivitásra utal, ugyanakkor a PKG expressziója szignifikánsan növekedett („f” panel). A cGMP degradálásában részt vevő PDE9A expressziója szignifikánsan magasabb a HC csoportban („e”). A „g-h” paneleken reprezentatív blotok láthatóak. Az adatok átlag \pm SEM-ben vannak megadva, kétmintás t-próba, ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

I. A resveratrol szív működésre gyakorolt hatásai STZ indukált diabéteszben

Vizsgálatunk egyik novuma, egyben legfontosabb eredménye a resveratrol vércukorszint csökkentő hatása STZ-kezelt állatok esetén, melynek háttérében eddig még fel nem derített folyamatok állnak. Ugyanakkor több mechanizmus is elképzelhető a szakirodalom alapján. Egyrészt a vázizmok fokozott nitrogén-monoxid termelése ismertén csökkenti a vércukorszintet a vázizom vérkeringésének és a glükóz felhasználásának a fokozásával [221]. Másrészt, az oxidatív stressz csökkentése mérsékli az inzulinrezisztenciát a redox-érzékeny foszforilációk gátlásával és az inzulin receptor szubsztrát1 downregulációjával [222]. Ismert, hogy a hiperglikémia fokozza a reaktív oxigén gyökök képződését [223]. Így a resveratrol indukálta vércukorszint csökkenés megvédheti a szívet az oxidatív stressztől, akár iszkémia/reperfúzió esetén is.

Vizsgálataink alapján szintén felmerül, hogy a resveratrol-indukált, iszkémia/reperfúzió alatt kialakuló oxidatív stressz mérséklése NO/Trx-1/HO-1/VEGF mediált, illetve egy nagy potenciállal rendelkező antioxidáns enzim, az Mn-SOD aktivitásán keresztül valósul meg. Ezt az elméletet eredményeink számos fontos pontja támogatja. Korábbi tanulmányok szerint az emelkedett szuperoxid (O_2^-) képződés a diabéteszrel párosult hiperglikémiás állapot a HO-1 upregulációjának csökkenését okozza [224]. Vizsgálatainkban, a resveratrol kezelésben részesült diabéteszes patkányokban szignifikánsan emelkedett a Trx-1 és HO-1, mely folyamat gátolható volt nitrogén-monoxid-szintáz inhibitorral. Feltételezzük, hogy a resveratrol hatásai nagyrészt vagy kizárólag a nitrogén-monoxid [44, 190] vagy a tioredoxin és HO-1 [219] indukcióján keresztül valósulnak meg. A tioredoxin egy 13-Kd redox (redukció/oxidáció)–aktív fehérje [225], mely ditiol aktív része reverzibilisen redukálható Trx reduktázzal [226]. A Trx-1 különböző betegségekben alkalmazható oxidatív stressz marker, hiszen olyan oxidatív stresszorok, mint a hidrogén-peroxid, ultraviola sugárzás [227] vagy gyulladás [228] indukálják. A Trx-1 többféle biológiai hatással is rendelkezik, így az aktív oxigén gyökök semlegesítése, valamint redox érzékeny molekulák (NF κ B, AP-1) szabályozása [227]. A szabadgyökök gátlása mellett, nemrég derült fény arra, hogy a Trx-1 képes védeni a sejteket az oxidatív stressz indukálta apoptózistól, valamint megelőzni az STZ indukálta diabéteszt [229]. További részletes vizsgálat szükséges a Trx-1 klinikai szerepének megállapításához. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a Trx-1 több terápiás megközelítésben is potens lehet bizonyos krónikus betegségek, mint a diabétesz kezelésében.

A HO-1 és más túlélő folyamatok citoprotektív hatása *in vitro* és *in vivo* ismertek [230]. Ugyanakkor a mechanizmus maga kevésbé ismert. A HO-1 és a reaktív termékei antioxidáns és

gyulladásgátló hatással rendelkeznek, melyek alapján felmerül a HO-1 protektív hatása diabéteszes miokardiális infarktus szövödményében. Liu és csapata [231] homoizigóta HO-1 egereket használva kimutatták, hogy a HO-1 hiánya súlyosítja a miokardiális károsodást, különösen diabéteszes állapot fennállásakor. Ugyanezen vizsgálatban, az iszkémia/reperfúzió során emelkedett a HO-1 expresszió, mely a HO-1 protektív hatását mutatja diabéteszes miokardiális infarktusban. Szintén ebben a vizsgálatban, STZ injekciót követően a kialakuló hiperglikémia hasonló mértékű volt HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} egerek esetén, de a HO-1^{-/-} diabéteszes egerek sokkal súlyosabb miokardiális infarktust szenvedtek el, mely alapján a HO-1 expresszió véd az infarktus ellen. A HO-1 az első és egyben sebesség meghatározó enzim a hem lebontásában, mely hatására biliverdin, szabad vas és szén-monoxid (CO) képződik. A biliverdin a biliverdin-reduktáz hatására hamar bilirubinná alakul. A HO-1 protektív hatásai feltehetően ezen katabolizmusból származó metabolitoktól függenek, melyek a diabéteszes miokardiumban központi szerepet játszanak fontos biológiai válaszok szabályozásában. A HO rendszeren keresztül képződő CO és a bilirubin fontos protektív faktorok a miokardium iszkémia/reperfúzió okozta szövödmények esetén [232]. A HO-1 védő hatásában a CO nagy jelentőségét bizonyítja, hogy az exogén CO teljes mértékben képes a HO-1 hatását utánozni transzplantált szív iszkémia/reperfúziós sérülések megelőzésében [233]. Ezzel összhangban, a resveratrol indukált HO-1 expresszió protektív hatását figyeltük meg a vércukorszint szabályozásban és miokardium védelmében diabéteszes állatok esetén.

A resveratrol kezelést követően csökkent vércukorszintet tapasztaltunk, mely szignifikánsan megemelkedett Mn-SOD aktivitással párosult. Shen és kutatócsoportja [234] kimutatta, hogy az Mn-SOD túltermelődése jótékony hatással volt a mitokondriális légzési láncre és normalizálta a diabéteszes mitokondrium méretét. Emellett az Mn-SOD megtartotta a diabéteszes szív morfológiáját és teljesen normalizálta a diabéteszes kardiomiociták kontraktilitását. Kísérletünkben, az emelkedett Mn-SOD aktivitás fokozott védelmet biztosíthatott a diabéteszes mitokondriumnak és hozzájárult a szív teljes körű védelméhez.

A másik fontos eredményünk, hogy a diabéteszes állatok resveratrol kezelése emelkedett VEGF expresszióval jár együtt. Ismert, hogy az NO és a vérerek növekedése és fejlődése között szoros kapcsolat van, különösen a VEGF-mediált folyamatokban. Az NOS illetve az NO inhibitorok gátolják mind az endogén, mind a VEGF indukálta angiogenezist [235]. Továbbá, az emelkedett NO expozíció, akár exogén, akár az eNOS genetikai túlműködése jelentősen fokozza a VEGF szintézist az endotélium sejtjeiben [236]. Leírták azt is, hogy a VEGF fokozza a Bcl-2 expressziót, mely végsősoron javítja az endotélsejtek túlélését toxikus, oxigénhiányos környezetben [237]. Ezek alapján az emelkedett VEGF szintnek szerepe lehet az endotélsejtek apoptózisának csökkentésében. Egy másik vizsgálatban a VEGF, mint potenciális

angiogenezist fokozó vegyületet, egy új, foszfatidilinozitol-3-OH-kinázt (PI3-K) és Akt-ot tartalmazó útvonalon keresztül emelte az intracelluláris adhézios molekula-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1) expresszióját, mely az agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek migrációját eredményezte. A VEGF kezelés *in vitro* fokozta az Akt foszforilációt PI3K dependens útvonalon [238]. Vizsgálatainkban az iszkémia/reperfúziót követően, a resveratrol-kezelt diabéteszes miokardiumban túlélő útvonalak aktiválódását figyelhettük meg, melyek a nagymértékű Akt foszforilációnak is tulajdoníthatóak és amelyek L-NAME hatására csökkentek a resveratrol kezelés ellenére. Az emelkedett mértékű kardiomiocita apoptózis, melyet diabéteszes miokardiumon tapasztaltunk, valószínűsíthetően nitrogén-monoxid dependens és VEGF-mediált túlélő folyamatok aktiválása révén jelentősen csökkent a resveratrol kezelés esetén. Mindezek alapján a resveratrol lehetséges klinikai szerepe a diabéteszsel járó érkárosodás megelőzésében nitrogén-monoxid-mediált mechanizmussal valósul meg.

Kutatásunkban a resveratrol NO mediáltan indukálta a Trx-1, HO-1 és VEGF expressziót diabéteszes miokardiumon. Emellett a resveratrol csökkentette a vércukorszintet és a kardiomiociták apoptózisának mértékét, amely emelkedett Mn-SOD aktivitással párosult diabéteszes patkány szíven. Ez az új mechanizmus újabb terápiás lehetőséget jelenthet diabéteszes betegek klinikai kezelésében.

II. Resveratrol és statin kardioprotektív hatása hiperkoleszterinémiában

Jelen kutatásunkban szintén bemutattuk, hogy a koleszterindús táplálkozás okozta miokardiális komplikációk, mint a megnövekedett infarktusz terület, az apoptózis mértéke, a károsodott angiogenezis mind javíthatók resveratrol kezeléssel. Emellett prezentáltuk, hogy a statin és resveratrol kombinált terápia mennyivel eredményesebbnek bizonyul HC-miokardium kezelésében, mint a statinok önmagukban. Vizsgálatunkban a szérumban koleszterin csaknem duplája volt a HC állatokban a kontrollokhoz képest. Emellett számos korábbi tanulmány is igazolja, hogy a HC patkánymodellekben, vazoaktív anyagok hatására változik a vaszkuláris funkció és a mikrovaszkuláris reaktivitás [239, 240].

A hiperkoleszterinémia a normál értékekhez képest emelkedett vér koleszterinszintet jelent. Az ismereteink túlnyomó többsége alapján, a hiperkoleszterinémia és más lipid rendellenességek a kardiovaszkuláris megbetegedések (CHD) fontos szerzett rizikófaktora. A CHD rizikóját jelentősen emeli az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) emelkedése, valamint a nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) csökkenése. Emellett a CHD kapcsolatban áll a koronáriák endotél diszfunkciójával és miokardiális perfúziós rendellenességekkel is [241]. Több klinikai vizsgálat is alátámasztja, hogy a statin terápia a koronáriabetegségek mind elsődleges mind másodlagos

prevenciójában hatékony. Ismert továbbá, hogy a statinok kardioprotektív hatásukat a szérumban lipidszint csökkentő hatásuktól függetlenül is, pl. az endotél funkció és az NO szintézis megőrzésével fejtik ki. Egyes vizsgálatok szerint a statinok mind pro- mind anti-angiogenetikus hatással rendelkeznek. Alacsony dózisban a statinok pro-angiogenetikus hatásait az Akt aktiválásán keresztül fejtik ki, mely az eNOS foszforilációjához és így NO termeléséhez vezet [242]. A statinok emellett fokozzák a VEGF expressziót [243]. A statinok iszkémiás/reperfúziós miokardiumra gyakorolt protektív hatásának legelfogadottabb magyarázata az eNOS-NO rendszer upregulációja [41, 244]. Annak ellenére, hogy számos új megközelítés van a koleszterinszint csökkentésének, a terápia alappillérei továbbra is a statinok maradtak. A szakirodalomban mind a statinok, mind a resveratrol NO mechanizmusokon keresztül is kifejtik kardioprotektív hatásukat. Ugyanakkor korábbi eredményeink szerint a resveratrol, a vörösborban is fellelhető polifenol, a lipidszint csökkentő hatása mellett más tulajdonságokkal is rendelkezik. Patkány MI modellben Trx-1, NO/HO-1 és VEGF mechanizmusain keresztül szignifikánsan fokozta az angiogenezist [44]. Vaszkuláris simaizomsejt kultúrában gátolta a proliferációt [245], mely az ateroszklerózis progressziójában fontos szerepet játszik [246]. Korábbi tanulmányunkban [219], a resveratrol-mediált Trx-1 indukció, a HO-1, pro-angiogenetikus faktorok, és a kardioprotektív VEGF egymást követő expresszióját indította el *in vitro* és *in vivo* modellekben. Jelen vizsgálatunkban alkalmazott kombinált terápia sokkal eredményesebbnek bizonyult HC miokardiumon, mint a statin terápia önmagában. Az Akt és az eNOS foszforilációja sokkal drasztikusabb volt, összehasonlítva akár a statin, akár a resveratrol önálló kezelésével. A kombinált terápia esetén kardiomiociták apoptózisában tapasztalt szignifikáns csökkenés az Akt és az eNOS fontos szerepét jelzi az iszkémia/reperfúzió okozta sérülések elleni kardioprotekcióban. Az Akt aktiválódása foszforilációt indukál és gátolja a GSK-3 β -t, mely gátolja a mitokondriális pórusok nyitását, ezzel a permeabilitást, ami a sejtapoptózis és nekrozis első lépcsője [247]. Ugyanakkor az aktivált eNOS, NO felszabaduláshoz és cGMP útvonalon mitokondriális K_{ATP} csatorna aktiváláshoz vezet, akut kardioprotekciót hozva ezzel létre [248]. Ugyanakkor jelen vizsgálatban, miokardiális infarktus után, a resveratrol monoterápiában és statinnal kombinált kezelés során egyaránt fokozódott a β -catenin transzlokációja, amit VEGF expresszió követett, mely a következményes angiogenezis fokozódásával tartós kardioprotekcióhoz vezetett, jelezve ezzel β -catenin lehetséges jótékony hatását. Szakirodalom alapján a β -catenin, az angiogenezis kritikus mediátora [249], egy sejtplazma multiprotein komplexben foszforilálódik, melynek tagjai az adenomatózus polipózis coli fehérje (adenomatous polyposis coli protein, APC) az axin és a GSK-3 β [249-252]. A β -catenin foszforilációjának gátlásakor, a β -catenin felhalmozódik és a sejtmagba transzlokálódik, ahol T-sejt specifikus transzkripciós faktorokkal

(T-cell transcription factors/lymphoid-enhancer binding factor; TCF/LEF) képez komplexet így képes lesz bizonyos target gének repressziójára vagy aktiválására úgy, mint c-Myc, ciklin D1, fibronectin, VEGF, Bcl-2 és túlélő gének [253, 254]. VEGF expresszió növekedést tapasztaltunk a HC, HCR, HCS, HCRS csoportokban egyaránt a kontrollhoz képest. Kutatásunkban az angiogenezis válasz mértéke (melyet CD31 jelzéssel mutattunk ki) a többihez képest jelentős volt a resveratrol kezelt csoportban. Ugyanakkor a megnövekedett kapilláris denzitás a HC csoportokban lehet a miokardiális perfúzió fenntartására irányuló kompenzatórikus válasz. A resveratrol és a statin kezelés önmagában vagy kombinációban is képes volt a miokardiális mikrovaszkularizáció felépítését és funkcióját is megtartani. Ebből eredően a statin és resveratrol által kiváltott, infarktusos miokardium neovaszkularizációja egy hosszútávú kardioprotekciót jelenthet a kamrai remodelinggel szemben. Emellett mind a két hatóanyag hatása dóziszfüggőnek látszik, hiszen kétfázisú hatással rendelkeznek az angiogenezis tekintetében. Az általunk használt statin mennyisége (1 mg/ttkg) nem igazán fokozta az angiogenezist, ugyanakkor a resveratrol alkalmazott dózisa igen. Az említett molekuláris hatások növelhették a kardiális progenitor sejtek számát, erősítve ezzel a miocitózist, a proliferációt, amely az infarktus méretének csökkenéséhez vezetett a kezelt csoportokban.

Eredményeink egyértelműen bemutatják, hogy a statinok resveratrollal történő kombinációja hatékonyabb és jótékonyabb az iszkémia lefolyásában, mint a statinok önmagukban. További biokémiai és farmakológiai vizsgálatokat végzünk, hogy feltárjuk az önálló és a kombinált kezelések hatásmechanizmusában rejlő részleteket iszkémiás miokardiumon.

III. A bromelain (Br) kardioprotektív hatásai

Tanulmányunk elsőként ad bizonyítékot arról, hogy az intraperitoneális Br kezelés kardioprotektív hatást biztosít globális I/R modellben. Br hatására javult a kamra posztisztkémiás felépülése, és csökkent az elhalt terület mérete, valamint az apoptózis mértéke a kezeletlen állatokhoz viszonyítva. Vizsgálatunkat úgy terveztük, hogy a Br kezeléssel az iszkémia kiváltása előtt „prekondicionáljuk” a szívet annak érdekében, hogy az iszkémiás sérülés kialakulását lassíthassuk, illetve a reperfúzió során megjelenő károsodásokat megelőzhessük.

Jelen kísérlet számos ponton mutat arra, hogy a Br farmakológiai prekondicionáló szerként működhet. Eredményeink szerint a Br az apoptózis gátlásával csökkentette az infarktus kiterjedését, és elősegítette a posztisztkémiás felépülést, azaz prekondicionálta a szívet a károsodással szemben. Emellett potens koszorúér-tágító, melyet a megnövekedett CF igazol.

Megfigyeléseink alapján azt feltételezzük, hogy a Br-mediált kardioprotektív hatás az Akt-FOXO jelátviteli kaszkád aktiválódásán keresztül jöhetett létre. Kísérletünkben az Akt foszforiláció emelkedése következett be Br kezelés hatására, mely hozzájárulhatott a szívizomsejtek csökkent apoptózisához és az infarktusz terület mérséklődéséhez I/R károsodást követően. Apoptózis számos különböző kardiovaszkuláris megbetegedésben előfordul, és a csökkent pumpafunkció egyik fő okának tekintik. Az iszkémiás szívizomzatra jellemző, hogy reperfúzió közben apoptotikus sejthalál és DNS fragmentáció következik be. Újabb adatok szerint infarktus után közvetlenül, és a későbbi fázisokban a távolabb eső, életképes szívizomzatban is az apoptózis a sejthalál fő oka [255]. Az Akt szerin vagy treonin foszforilációja döntő szerepet játszik a sejt túlélési kaszkádban [64], mivel az Akt több olyan fehérje szubsztrátot foszforilál, melyek génátírást szabályoznak, ilyenek a FOXO család tagjai is. Az Akt megemelkedett expressziója a jobb szívizomkontrakcióhoz is hozzájárul [256], emellett elősegíti a növekedési faktorok által mediált túlélést és gátolja az apoptotikus sejthalált [257]. Az utóbbi időben egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az Akt-FOXO jelátviteli kaszkád és a FOXO szabályozása és transzlokációja fontos szerepet játszanak a sejt túlélési útvonalaiiban. A forkhead transzkripciós faktorok közé tartozó FOXO alcsalád az Akt egyik célpontja. Három tagja ismert, a FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL-1) és a FOXO4 (AFX), melyek mindegyikét az Akt képes inaktíválni [67, 258]. A FOXO transzkripciós faktorokról feltételezik, hogy különböző sejtfunciókat szabályoznak, mint például differenciálódás, anyagcsere-folyamatok, proliferáció és túlélés [259, 260]. Az aktív FOXO transzkripciós faktorok több proapoptotikus gént aktiválnak, ezáltal hozzájárulnak az apoptózis folyamatának beindításához. Az Akt által mediált foszforiláció azonban a FOXO kizárását jelenti a sejtmagból, ezáltal a forkhead transzkripciós program leáll.

Br kezelés hatására a FOXO3A mind a sejtmagban, mind a citoszolban foszforilálódott, ezáltal gátolva a proapoptotikus jelátvitelt. Feltételezzük, hogy a p-Akt révén nukleuszban foszforilált FOXO3A kilökődik a sejtmagból és inaktíválódik. A FOXO forkhead doménjeinek foszforilálása feltehetően a DNS-kötő képességet bontja meg, ezenkívül úgy tűnik, hogy a FOXO foszforilált állapotban nagyfokú affinitást mutat 14-3-3 fehérjék felé. A FOXO így kipumpálásra kerül a citoszolba, ahol az ubikitin proteaszóma rendszer célpontjává válik [261]. Elképzelhető, hogy az Akt aktiválódása, és ezen keresztül a proapoptotikus FOXO3A gátlása tehető felelőssé a Br kezelés hatására tapasztalt szívfunkció javulásért.

Vizsgálatunk eredményei elsőként adnak bizonyítékot arra, hogy a Br jótékony hatásai az Akt foszforilálásán alapulnak, mely a FOXO3A foszforilálását váltja ki. Ez a foszforilációs sorozat köthető az apoptotikus sejthalál gátlásához. Igazoltuk, hogy a kísérletünk körülményei között a Br jelentősen csökkentette a miokardiális infarktus mértékét és javította a posztisztkémiás

szívfunkciót, bizonyítva, hogy a Br legalább részben kardioprotektív az iszkémia/reperfúzióval kapcsolatos károsodással szemben.

IV. Niacinhoz kötött króm komplex alapú Ef hatásai az iszkémia/reperfúziós károsodás során

Vizsgálatunk eredményei szerint az orális Ef kezelés mind hím és nőtény patkányokban kardioprotektív hatást hozott létre, mely a kamrai funkció jelentősebb fokú posztiszkémiás helyreállításában és kisebb infarktusz terület megjelenésében nyilvánult meg a kontroll állatokhoz viszonyítva. A szívben magasabb ATP, CP és szinteket mutattunk ki a kezeletlen csoporthoz képest. Az AMP/ATP arány emelkedése aktiválja az AMPK-t, mely számos down-regulált célmolekula foszforilációját indítja el, és az ATP szint megtartott marad. A D-ribóztól ismeretes, hogy alacsony energiaszintek esetén 5-foszforibozil-1-pirofoszfáttá alakul, mely kulcsmolekula az ATP szintézis során. Szubkrónikus Ef kezelés során nem figyeltünk meg jelentős eltéréseket a kontroll állatokhoz viszonyítva, továbbá a kiválasztott szervek abszolút, és testsúlyhoz viszonyított százalékos súlyában sem nyilvánultak meg különbségek (nem ábrázolt adat). Az Ef kezelés nem okozott változást a lipid peroxidációban, és DNS fragmentációt sem váltott ki a 30, 60 és 90 napos kezelést követően (nem ábrázolt adat). A hematológiai, klinikai kémiai és hisztopatológiai vizsgálatok nem mutattak ki nem kívánt mellékhatásokat egyik vizsgált szervben sem (nem ábrázolt adat). Ezen eredmények alátámasztják, hogy az Ef széles körben biztonságos készítmény. Bár a króm, mint nyomelem, esszenciális a megfelelő inzulin működéshez, és a szabályos fehérje, zsír, és szénhidrát anyagcseréhez [262], a krómnak általánosságban rossz a felszívódása és a biohasznosulása a szervezetben. Jelen vizsgálatunkban az Ef kezelés során tapasztalt emelkedést a szívizomsejtek ATP és CP szintjeiben három lehetséges szabályozó mechanizmus hozhatta létre: a p-AMPK szintek növekedése, a ribóz, vagy az aminosav bevitel, mely közvetve/közvetlenül az az energiaforrás, mely az ATP termelést és felhasználást szabályozza.

A kutatások alapján az ashwagandha segít megtartani a bal kamrai pumpafunkciót iszkémia/reperfúziós károsodást követően [263]. Ezek a protektív hatások feltehetően az antioxidáns enzimeknek (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz) és a HSP-knek köszönhetőek. Olyan transzgenetikus egerek szívében, melyek humán HSP-eket expresszálnak a miokardiumban, nagymértékben javult a szívizom felépülése és csökkent az infarktusz terület nagysága kísérletes iszkémia/reperfúziót követően [264, 265]. A HO-1 enzimről ismert, hogy a hem molekulát hasítja, szénmonoxidot és az antioxidáns hatású biliverdint képezve. Liesuy és Tomar bizonyította, hogy a hemoxigenáz aktivációja eredményeként felszabaduló bilirubin közvetlen szerepet játszik az oxidatív stressz elleni védelemben [266]. Ezenkívül a

hemoxigenáz indukciója ferritin szintézisével is együtt jár, mely citoprotektív antioxidánsként ismeretes [267]. HO-1 knockout egerek hipoxia hatására nagyobb mértékű infarktust mutattak, ami a HSP-32 fontos protektív szerepét erősíti meg [268]. Az Ef kezelt állatok felépülése az aminosav tartalomnak is köszönhető. Pasini és munkatársai kimutatták, hogy krónikus aminosav kezelés csökkenti az iszkémia során fellépő diasztolés nyomásemelkedést, és izolált szívben reperfüzió alatt anélkül segíti elő a kamrai nyomás helyreállítását, hogy az iszkémiát megelőző hemodinamikai paramétereket változtatná. Ezenkívül az aminosavak fontos molekulák, például a glutation prekursorai, mely potenciális szerepet játszhat az iszkémiás szívizom védelmében [269]. Más tanulmányok arról számolnak be, hogy az L-arginin a nitrogén-monoxid prekuzora, mely a vérátáramlás növelésével szintén protektív hatású iszkémia/reperfüziós károsodás során [270].

V. A meggy-mag-kivonat (SCSE) és a hiperkoleszterinémia szívizomra gyakorolt hatása

Jelen tanulmány a fokozott koleszterin bevitel hatásait vizsgálta számos olyan paraméter alakulására, melyek közismerten összefüggnek a hiperkoleszterinémia patogenezisével, valamint a HO-1 aktivitás növelésével, valamint ezen fenti tényezők lehetséges javítását a kísérleti állatokban. Ahogyan az várható volt, a 2% koleszterinnel dúsított tápon tartott nyulak szérum koleszterin szintje jelentősen megemelkedett a kontroll állatokhoz viszonyítva a 16 hetes kísérleti periódus végére ($p < 0,05$). Ezzel együtt a koleszterindús diéta mellett 30 mg/kg meggy-mag-kivonattal is kezelt nyulak koleszterin szintje szignifikáns módon javult a kezeletlen HC csoporthoz hasonlítva ($p < 0,05$). Kísérletünk bizonyítja, hogy egy HO-1 enzimet indukáló vegyület (SCSE) képes a koleszterin szintet csökkenteni. Érdekes módon, korábbi vizsgálatok szerint a szintén HO-1 működését serkentő statinok, melyeket a koleszterinszint csökkentésére alkalmaznak, gyulladásgátló és antioxidáns hatásukat nem a HO-1 enzim aktivitásának fokozásán keresztül váltják ki hiperkoleszterinémiás betegekben [271]. Jelen tanulmány eredményei arra utalnak, hogy amennyiben a koleszterin szintet HO-1 dependens útvonalon is lehetséges csökkenteni, akkor valószínűleg a SCSE hatékonyabban indukálja az enzimet, mint a statinok [272]. A meggy-mag kivonat koleszterin szint csökkentő hatását figyelembe véve várható volt, hogy a HCT nyulakban a plakk-képződés jelentősen lecsökkent a hiperkoleszterinémiás, de kivonattal nem kezelt állatokhoz viszonyítva ($p < 0,05$). A hiperkoleszterinémiával összefüggő szívbetegségekre jellemző a csökkent szívfunkció, a miokardiális infarktus, illetve a diasztolé alatt csökkent kamrai telődés [273-275]. Mindezen kóros elváltozásokat az általunk alkalmazott nyúl modell reprodukálta, és a SCSE kezelés hatékonyan ellensúlyozta ezeket a folyamatokat ($p < 0,05$). A SCSE ateroszklerózissal szemben

mutatott, valamint szívre gyakorolt jótékony hatása tovább hangsúlyozza a meggymag kivonat kiegészítő terápiás lehetőségeit a humán gyógyászatban.

Az iszkémia/reperfúziós károsodást szenvedett szívizomzatban a SCSE kezelésben részesült állatok esetében a COX enzim aktivitása és expressziója szignifikáns mértékben fokozódott a kezeletlen, hiperkoleszterinemiás nyulakhoz viszonyítva ($p < 0,05$). A COX fontos szerepet tölt be ATP szintézisben és anyagcserében [276], és a COX enzimet befolyásoló vegyületek – mint a SCSE – jelentős új terápiás lehetőségeket tárnak fel, különösen a szív és érrendszeri megbetegedések kezelésében.

A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján nehéz kielégítően megválaszolni, hogy a SCSE kezelés miért nem befolyásolta a VEGF expressziót iszkémia/reperfúzió során. Ez az angiogén jelátvivő molekula az erek fejlődését serkenti, sérülés vagy az embrionális fejlődés során de egyes daganatok túlélésében is szerepet játszik a neovaszkularizáció elősegítésével [277, 278]. A koszorúérbetegségekre jellemző az endotél progenitor sejtek számának csökkenése, mely az érfalregeneráció kimerüléséhez vezet; ezt a folyamatot a statinok és a VEGF is képes javítani [279]. A jelen tanulmányban alkalmazott SCSE, mely a statinokhoz hasonlóan HO-1 inducer hatással rendelkezik, nem befolyásolta a VEGF kifejeződését a szívizomzatban, mely arra utal, hogy a VEGF indukció nem a HO-1 aktivitáshoz köthető jelátviteli folyamatok eredménye. Megfigyelésünk klinikai jelentőségét az adatok alapján korai lenne megítélni.

Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a SCSE a kardiovaszkuláris betegségek és egyéb, gyulladásos kórképek megelőzésében és terápiájában juthat fontos szerephez. Olcsó és egyszerű hozzáférhetősége mellett további előnye az elhanyagolható toxicitás [138], s ennek okán a SCSE akár a statin terápia hatékony kiegészítő szere lehet, és a gyógyászat egyéb területein is potenciálisan eredményes növényi hatóanyagként juthat szerephez.

VI. Medvehagyma liofilizátum (WGLL) vizsgálata hiperkoleszterinemiában

A WGLL bioanalízise alapján a medvehagyma levele 0,261% alliin tartalmazott. Ez a vegyület a fokhagymában is megtalálható szulfoxid molekula, mely a cisztein aminosavból származtatható [280], emellett számos élettani hatással rendelkezik, mérsékeli az ateroszklerózis kialakulásában szerepet játszó biomarkerek expresszióját, hozzájárul a hidroxil gyökök semlegesítéséhez, és egyéb antioxidáns hatása is van [281]. Az alliin emellett stabilizálja és fokozza az immunválaszt, mely hatásról a fokhagyma széles körben ismeretes [282]. Az echokardiográfiás vizsgálat eredményei jól mutatják a hiperkoleszterinémia és a WGLL kezelés hatásait. Az adatok élettani jelentőségét legegyszerűbben négy pontban foglalhatjuk össze:

(1) A stabil szív- és légzésritmus, melyet az M-mód és a Doppler mérések során figyeltünk meg, arra utalnak, hogy a hiperkoleszterinémia jelentősen nem befolyásolta a nyugalmi kardiopulmonális működést. Ezen eredményünk összevethető korábbi megfigyeléseinkkel [193].

(2) A normál táppal etetett kontroll állatokhoz viszonyítva a bal kamrai végdiasztolés átmérő (EDD) a HC nyulakban jelentősen megemelkedett, és erős korreláció volt megfigyelhető a frakcionális rövidülés (FS) és az ejekciós frakció (EF) paraszternális hossz- és rövidtengelyi metszetei között. A WGLL kezeléssel kapcsolatban kimutattuk, hogy a kontroll HC csoporthoz képest a medvehagyma liofilizátumot kapott állatok FS értéke szignifikánsan megemelkedett. A kórosan megemelkedett EDD szívbetegségben magasabb mortalitási kockázatot jelent [283], valamint a csökkent FS és EF az újabb kísérletes adatok szerint hozzájárul a fibrózis kialakulásához [284]. Ezek alapján eredményeink azt sugallják, hogy a WGLL kezelés javíthatja a szívbetegek túlélési esélyeit, és csökkenti a fibrózisra való hajlamot.

(3) A Doppler PW-mód vizsgálattal nyert adatok alapján az etetéssel előidézett hiperkoleszterinémia jelentős mértékben rontotta az E/A értékeket a normál tápon tartott kontroll nyulakhoz viszonyítva. A WGLL-kezelt állatok a kezeletlen kontroll csoport értékeihez közelítő értékeket mutattak. Továbbá a HC állatoknál az E hullám lassulási idejének (DecT) szignifikáns megnyúlása volt kimutatható, mely a kamrák károsodott telődési mintázatára utal. A WGLL kezelés jelentős mértékben javította a diasztolés funkciót.

(4) Meglepő módon, a koleszterindús táppal kezelt állatokban a WGLL terápia a jobb kamrai funkció jelentős javulását eredményezte, melyet a szisztolés csúcssebesség (S') és a trikuszipidális billentyű szisztolé alatti kitérésének (TAPSE) emelkedése jelez. Az S' csökkenése jobb kamrai diszfunkcióra utal, melyet a HC kontroll nyulakban meg is figyeltünk, azonban a medvehagyma liofilizátum hatására ez az elváltozás teljes mértékben helyreállt, bizonyítva a WGLL jótékony hatását a jobb kamrai működésre. Szívelégtelenségben szenvedő betegeknél a trikuszipidális anulus sebességének lecsökkenése összefügg a jobb kamrai diszfunkció súlyosságával. Érdekes módon, WGLL hatására a TAPSE értékei még a normál tápon tartott kontroll csoporthoz képest is szignifikáns emelkedést mutattak. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a medvehagyma kivonat pozitívan befolyásolja a jobb kamrai szisztolés működést, de a hatás relevanciájának, illetve háttérének megállapításához további vizsgálatokra lesz szükség. Az izolált dolgozó szív kísérlet során a hiperkoleszterinémiás kontroll, illetve a HCT csoport esetében az aortanyomás csökkenését tapasztaltuk az iszkémiát megelőző nyugalmi állapotban a normál tápon tartott kontroll nyulakhoz viszonyítva. Ezen túl az iszkémia/reperfúziós károsodás az AF, CF, HR és CO jelentős csökkenését eredményezte a nyugalmi (preiszkémiás) állapothoz hasonlítva. A WGLL kezelésben részesült állatoknál az AF

és HR jelentős mértékben javult, mely a liofilizátum antiiszkémiás tulajdonságaira utal. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi vizsgálatainkkal, melyek során szintúgy igazoltuk, hogy az oxidatív stressz csökkentése a szívben az iszkémiából történő gyorsabb felépülést eredményezi [285-287]. A medvehagyma liofilizátum kardioprotektív hatását olyan szempontból is értelmezhetjük, hogy miokardiális iszkémia esetén csökken az aortanyomás, ugyanakkor a koronáriakeringés és a bal kamrai nyomás is. Emiatt az aortanyomást csökkentő hatások károsak, illetve előnyösek is lehetnek [288]. Így, bár a hiperkoleszterinémias állapotokban megfigyelhető megemelkedett nyugalmi AoP arra utal, hogy egy ilyen fokú nyomásnövekedés már kóros mértékű, a tény, hogy a WGLL kezelés nem befolyásolta az AoP értékét, azt feltételezi, hogy a kivonat elhanyagolható hatással rendelkezik az aortanyomásra.

Ezekben a vizsgálatokban a HO-1 expresszió fokozását *Prunus cerasus* (meggy) magjából készült kivonatokkal értük el. Jelen tanulmány bizonyítja, hogy hasonló hatást a medvehagyma levelének liofilizátuma is képes kiváltani. Azonban meg kell jegyezni, hogy mivel a WGLL egyéb hatásokkal is rendelkezik, nem lehet megállapítani, hogy a medvehagyma kezeléssel kiváltott HO-1 expresszió milyen mértékben járult hozzá a kardioprotektív hatáshoz.

A hiperkoleszterinémias kontroll állatok szívizomzatában iszkémia/reperfúziós károsodást követően a SOD1 enzim szintje jelentősen megemelkedett, míg WGLL hatására az expresszió a kontroll csoportéhoz hasonló szinten maradt. Mind az apoptotikus jelátvitelben, mind az oxidatív stresszel szemben kialakuló adaptív mechanizmusokban részt vesznek olyan folyamatok, melyekben a SOD1 aktivitás kritikus szerepet játszik. Az enzim a szuperoxidot semlegesíti, és a folyamat végtermékeként O_2^- és hidrogén-peroxidot (H_2O_2) hoz létre [289]. A H_2O_2 a reaktív oxigéngyökök (ROS) csoportjába tartozik, és az apoptotikus jelátvitel, illetve az oxidatív szövetkárosítás révén roncsolja az iszkémiás szívizomzatot [290].

A SOD1 enzim azáltal védi ki a ROS káros hatásait, hogy az O_2^- ionokból hidrogén-peroxidot képez, melyet vagy a glutation-peroxidáz, vagy a kataláz vízzé és O_2 -né alakít. Szabad Fe^{2+} ionok jelenlétében azonban a H_2O_2 a Fenton-reakció révén szabad hidroxil gyököket hoz létre. Magas SOD1 szintek nagy mennyiségű Fe^{2+} ion jelenlétében jelentős számú hidroxil gyököt képeznek, mely tovább fokozhatja a reperfúziós károsodás mértékét [291]. Az intracelluláris egyensúly hiánya a prooxidáns H_2O_2 (SOD1) és az antioxidáns glutation-peroxidáz és kataláz között a szabadgyökök fokozott termelődéséhez vezethet, mely a sejt súlyos károsodását okozhatja. Ezt erősíti, hogy a miokardiális infarktuson átesett betegek vérében a SOD szintje jelentősen magasabb az egészséges egyénekhez viszonyítva [292]. Ez a különbség arra utal, hogy a szívizom iszkémia esetén egy adaptív mechanizmus aktiválódik az oxidatív károsodás kivédése céljából.

Western blot vizsgálatunk kimutatta, hogy a COXIII és a VEGF, melyek szerepe feltételezhető a különböző kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában, alacsonyabb expressziót mutatott mind a hiperkoleszterinemiás kontroll, mind a HCT csoportban a normál tápon tartott nyulakhoz viszonyítva. A HC, és a WGLL kezelt állatok között statisztikailag szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk, mely arra utal, hogy a medvehagyma kardioprotektív hatásai a hem/HO rendszeren keresztül fejeződnek ki, és a COXIII és VEGF fehérjét nem befolyásolja. Az aorta hematoxin-Oil Red O festése elhanyagolható mennyiségű plakk felhalmozódást mutatott ki a normál táppal etetett nyulakban, míg az ateroszklerotikus léziók hozzávetőlegesen 35% arányban jelentek meg a HC állatokban. A WGLL kezelés hatására jelentős mértékben lecsökkent, és ezzel együtt védett a koleszterinben gazdag étrend által kiváltott ateroszklerózissal szemben [193].

Az állatok vérmintáiból olyan markerek plazmaszintjét határoztuk meg, melyek a kardiovaszkuláris megbetegedés, illetve egyéb gyulladásos elváltozások diagnosztikai, vagy a terápiás hatékonyság jellemzésére alkalmasak lehetnek. A WGLL-kezelt nyulaknál tapasztalt magas HDL szintek azonban a liofilizátum kardioprotektív hatására is utalhatnak. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a TC és az LDL szintek esetében a HCT csoport szignifikáns csökkenést mutatott a HC kontrollhoz viszonyítva. Az ApoA szintek a HC állatokban jelentősen alacsonyabbak voltak a kontroll nyulakhoz képest. A liofilizátummal kezelt csoport ApoA értékei nem különböztek jelentősen a kontrolltól, ami arra utal, hogy a medvehagyma kivonat hatékonyan normalizálta ezt a paramétert. Ezen eredmény jelentőségét az adja, hogy az ApoA-I deficiencia hipertrigliceridémiát és az ateroszklerózis kockázatának emelkedését okozza állatmodellekben [293], mellyel szemben a WGLL protektív szereppel bír.

Az ApoB plazmaszintek elemzése kimutatta, hogy a HC és HCT csoport értékei szignifikánsan megemelkedtek a normál tápon tartott kontroll nyulakhoz hasonlítva. Ugyanakkor a WGLL-kezelt állatok ApoB értékei a hiperkoleszterinemiás kontrollhoz viszonyítva jelentősen kisebbnek mutatkoztak. Ez az eredmény jól korrelál a két csoport LDL értékeivel, és összhangban áll az ApoB, mint primer apolipoprotein szerepével a kilomikronok, VLDL, IDL és LDL partikulumban.

A hiperkoleszterinemiás kontroll csoportban emelkedő tendencia volt látható a szérumban triglicerid szintekben a normál tápon tartott állatokhoz viszonyítva, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintet. A C-reaktív protein (CRP) plazmaszintje azonban HC nyulakban jelentősen megnőtt a kontroll csoporthoz képest. Mivel a CRP a gyulladásos kórképek jellemző indikátor fehérjéje, eredményünk arra utal, hogy a koleszterindús táplálkozás gyulladásos folyamatokat indított el a szervezetben. A májenzimek elemzése szignifikánsan megemelkedett GOT szintet mutatott ki a HC csoportban a kontroll és HCT nyulakhoz viszonyítva, tehát

elmondható, hogy a túlzott koleszterin bevitel májtoxikus hatásokat váltott ki, amint azt egyéb tanulmányok is megerősítik [294]. A HCT állatokban az LDH és CK plazmaszint szignifikáns csökkenését figyeltük meg a hiperkoleszterinémias kontroll csoporthoz képest, ami jól mutatja a WGLL hepatoprotektív hatását a koleszterindús táplálkozással kiváltott májkárosodással szemben. *In vitro* vizsgálatok igazolták, hogy az alliin kezelés jelentősen csökkentette a TNF- α indukálta ICAM-1 mRNS átírást, mely gátolja a monociták adhézióját sertés artéria szövethez, illetve HUVEC tenyésztet sejtjeihez. Ezen felül az alliin protektív hatásának bizonyult a TNF- α működéséhez köthető mitokondriális membrán depolarizációjával és a szuperoxid anion túltermelődésével szemben, mely folyamat összefügghet a HUVEC sejt kultúrákban megfigyelt NOX4 mRNS transzkripció csökkenésével. Ezek a közölt eredmények bővebb rálátást adnak arra, hogy az alliin milyen módon fejt ki védő hatást az ateroszklerózis patomechanizmusában, és kutatásunk eredményeivel is egybevetethetőek.

VII. Az *Allium ursinum* liofilizátum (WGLL) hatásainak vizsgálata a PAH-ra

A kísérletünk során elvégzett echokardiográfiás vizsgálat eredményei alapján a bal kamrai működés nem károsodott sem a PAH kontroll, sem a WGLL, illetve sildenafil kezelést kapott csoportban. A trikuszipidális anulus elmozdulása (TAPSE) jól korrelál a szívelégtelenségben szenvedő betegek jobb kamrai diszfunkciójának mértékével, és M-mód echokardiográfiával könnyen vizsgálható. A PAH kontroll patkányok TAPSE értékei jelentős mértékben csökkentek, de 8 hetes WGLL kezelést követően javulás volt tapasztalható. Eredményünk egybevág egyéb közlemények adataival, például Rajkumar és munkatársai nagyon hasonló TAPSE értékeket talált MCT-indukált PAH patkánymodellben (kb. 1,6 mm) és egészséges állatokban (több, mint 2 mm) [295]. Munkacsoportunk korábbi és jelenlegi eredményei szerint a medvehagyma liofilizátum jelentősen javítja a jobb kamrai funkciót hiperkoleszterinémias nyulakban [194] és MCT-indukált pulmonális hipertenzió patkánymodellben. Vizsgálatunk korlátját képezi azonban, hogy az echokardiográfiával párhuzamosan nem tudtunk olyan egyéb paramétereket mérni, melyek a PAH diagnózisát egyértelműbben igazolhatták volna (pulmonális artéria nyomása, gyorsulási idő, pulmonális ejekció időtartama) [296]. Ugyanakkor modellünket egyéb vizsgálatok elvégzésével validáltuk, mint a pulmonális artériák falvastagságának meghatározása és a szövettani festés.

Az izolált szívből nyert eredmények alapján a monokrotalin kezelés csökkenti az aorta kiáramlást, amely a bal kamra pumpafunkcióját jellemző paraméter. Ezt az eredményt más szerzők közleményei is alátámasztják, miszerint az MCT kezelés PAH-t idéz elő [297-299], és a következményesen kialakuló jobb kamrai elégtelenség végül bal kamrai diszfunkciót eredményez [300]. Vizsgálatunk eredményei szerint a sildenafil növelte a szív pumpafunkcióját

a PAH kontrollhoz viszonyítva. A tudományos irodalomban számos cikk közöl hasonló eredményeket, miszerint a sildenafil jelentős kardioprotektív hatást vált ki a MCT-indukált PAH-val szemben [301-303]. A WGLL kezelés úgyszintén védő szerepet játszott a monokrotalin okozta változásokkal szemben: A PAH kontrollhoz hasonlítva a medvehagyma javította az aorta kiáramlást és a szív pumpafunkcióját, és bár ezen paraméterek nem értek el szignifikáns szintet a sildenafil esetében, a PAH kontrollhoz viszonyítva a sildenafil-kezelt patkányok is a WGLL-hez hasonló tendenciákat mutattak. A WGLL jótékony hatásait a jobb és bal kamrai funkcióra és az aorta kiáramlásra eddig már két különböző állatmodellben igazoltuk, azonban a hatás mögött rejlő molekuláris mechanizmusok – melyek valószínűleg nem a PDE5 rendszerhez kötődnek – tisztázására további kísérletekre lesz szükség. Bár jelen vizsgálat információval szolgál a WGLL hatásairól a PDE enzimrendszerre, az eNOS aktivitás vagy a cGMP szintek mérése további betekintést tudna nyújtani a medvehagyma protektív hatása mögött álló folyamatokba.

Jelen tanulmányban az aortanyomás értékei nem különböztek az egyes csoportok között. Mivel maga a kísérlet izolált szíven történik, csak a legsúlyosabb fokozatú bal kamrai elégtelenséget lehetne olyan módon detektálni, hogy a statisztikailag szignifikáns különbséget relatív bizonyossággal ki lehessen mondani [304]. Vizsgálatunk kísérleti körülményei, vagy a viszonylag rövid időtartam miatt a bal kamrai elégtelenség nem volt annyira előrehaladott, ezért a változásokat nem tudtuk megfigyelni. A szívfrekvencia értékei az izolált dolgozó szív vizsgálat során mind a három MCT-kezelt csoportban mérsékelt emelkedést mutattak. Hasonló fokú növekedést más szerzők is közöltek monokrotalin kezeléssel kapcsolatban [305].

Az izolált szív kísérletben a medvehagyma liofilizátum a sildenafilhoz mérhető protektív hatást váltott ki: mind a sildenafil, mind a WGLL kezelés javította a perctérfogatot a PAH kontrollhoz képest, továbbá, sem a sildenafil, sem a WGLL csoport nem különbözött az egészséges kontroll patkányoktól a perctérfogat értékét tekintve. Korábban bizonyították, hogy az *Allium ursinum* egyéb kórképekben is kardioprotektív hatású, mint például iszkémia/reperfúziós károsodás [164] vagy magas vérnyomás [160] esetében, ez alapján a medvehagyma értékes kiegészítő szer lehet különböző kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében. Bár több helyen leírták a monokrotalin pulmonális ereket károsító hatását, az MCT által okozott tüdőtoxicitás pontos mechanizmusa nem tisztázott. Emiatt egyes kutatók vitatják az MCT modell validitását, mint a humán PAH modellje [306]. Mindezek ellenére az MCT-indukált PAH még mindig a legkedveltebb és legelfogadottabb pulmonális hipertenzió modell, azonban azt is meg kell jegyeznünk, hogy egyik állatmodell sem tekinthető tökéletes modellnek a humán betegségek utánozására.

Jelen tanulmányban bizonyítottuk, hogy az MCT-indukált pulmonális hipertenzió a jobb kamra megnagyobbodását idézi elő, mely eredményt más kutatócsoportok közleményei is alátámasztják [307, 308]. A sildenafilről továbbá leírták, hogy csökkenti a pulmonális artériás nyomást (PAP), a pulmonális érellenállást és javítja a jobb kamrai működést azáltal, hogy a tüdőben és a szívben specifikus génexpressziós változásokat indít el [309]. Eredményeink alátámasztják ezeket az adatokat, továbbá, mint azt a mikroszkópos vizsgálat igazolta, a WGLL a sildenafilhez mérhető módon mérsékeli a PAH tüneteit.

A PAH patogenezis első és legfontosabb eseménye a pulmonális erek remodeling folyamata, melyben az NO/cGMP rendszer jelentős szerepet játszik. A foszfodiészteráz enzim izoformái felelősek a cGMP hidrolíziséért a tüdő ereiben [310]. Korábban leírták, hogy a sildenafil a PDE5 enzim gátlásán keresztül elősegíti a cGMP felhalmozódását, ezáltal az NO hatástartamát hosszabbítja [311]. Jelen tanulmány igazolja, hogy a sildenafil gátolja PAH nyomán megemelkedő PGE5A expressziót, hasonlóan egyéb beszámolók eredményeihez [312]. A valószínűleg adaptációs mechanizmusként aktiválódó PDE5 upregulációt számos betegségben leírták, mint a kongesztív szívelégtelenség, pulmonális hipertenzió, vagy a jobb kamrai hipertrófia esetében [313]. Western blot eredményeink alátámasztják, hogy a monokrotalin-indukált PAH modellben a PDE5A expresszió jelentősen megemelkedik a jobb kamrában. Ahogy azt korábbi ábránkon bemutattuk, a WGLL nem befolyásolta a PDE5A szinteket a jobb kamrában, így protektív hatásait valószínűleg egyéb útvonalakon keresztül fejt ki. Legjobb tudásunk szerint ez új eredmény, hiszen más kutatócsoport eddig nem vizsgálta a medvehagyma kivonatok hatásait a PDE5 enzim kifejeződésére. Ezen felül PDE5 szintek a tüdő szövetben még magasabbak voltak WGLL kezelés hatására, mint a PAH kontroll csoportban. Bár az egészséges kontroll és a PAH állatok tüdejében mért PDE5A fehérje szintek nem különböztek egymástól, ez nem zárja ki a lehetőségét annak, hogy az enzim aktivitása fokozottabb legyen az expresszió szintjének lényeges változása nélkül. Ez a megfigyelés egybevág egyéb közleményekkel, melyek arról számoltak be, hogy csak a PDE5 foszforilált formájának emelkedése jelzi a PDE aktivitás növekedését [314, 315]. Western blot vizsgálatunk korlátja volt, hogy csak a nem foszforilált PDE5 szinteket mértük, emiatt nem találtunk különbséget a sildenafil-kezelt és az egészséges csoport között, hasonlóan más munkacsoportok eredményeihez [316]. Bár jól ismert felfedezés, hogy a PDE5 enzim emelkedett szintjei összefüggnek a betegség mögött húzódó patológiai folyamatokkal, a WGLL kezelést kapott patkányokban nem találtunk a szív működés hanyatlására utaló jeleket vagy szövettani elváltozásokat a PAH kontrollhoz viszonyítva, melyet részben az magyarázhatja, hogy a számos egyéb jelátviteli útvonal játszik szerepet a pulmonális artériák hipertenziójában [317-319].

Bár a természetett fokhagymáról (*Allium sativum*) a tudományos irodalomban sokkal több adat és tanulmány áll rendelkezésre, jelen munkánk rávilágít arra, hogy a medvehagyma is egy potenciálisan hasznosítható gyógynövény. Ezen felül számos adat van arra vonatkozóan, hogy a medvehagyma több betegség modellben jobb terápiás hatást vált ki, mint a fokhagyma [157, 160, 320, 321]. A medvehagyma további előnyét képezi, hogy széles körben hozzáférhető és megfizethető növény, mely Európa és Ázsia számos területén szerepel a kereskedelmi forgalomban [322].

VIII. A diosgenin és a görögszéna extraktum hatásai

A kutatás ezen pillérének egyik legfontosabb eredménye az volt, hogy a magas zsír- és szénhidrát-tartalmú étrend (high fat high sugar diet, HFHSD) kombinálása 2 g/ttkg/nap görögszéna magőrleménnyel illetve 10 és 50 mg/ttkg/nap diosgeninnel megelőzheti az endotél-diszfunkció kialakulását, s mivel a görögszéna magőrlemény kezelés esetén az endotél-függő vazorelaxáció már kisebb acetil-kolin koncentrációval megvalósul, vélhetően a görögszéna egyéb aktív összetevői is hozzájárulnak jótékony hatásához. A kezeletlen HFHS étrend növelte az oxidált és redukált glutation szintjét, ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan sem a glutation-peroxidázt sem a glutation-reduktázt. Ezzel ellentétben mind a görögszéna, mind a diosgenin drámai csökkenést eredményezett az oxidált és redukált glutation plazmaszintekben és jelentősen csökkenték a glutation-reduktáz (de nem a glutation-peroxidáz) aktivitását. Érdekes, hogy a vér antioxidáns kapacitása kevésbé függött az egyes, kísérletünk során alkalmazott táplálkozási rendektől, kiemelve a redox egyensúlyt fenntartó folyamatok pufferelő sajátosságától. Ez alapján, a görögszében található antioxidánsok (kiváltképp a diosgenin) komplex módon befolyásolhatják a vér redox egyensúlyán alapuló szabályozó útvonalakat, mely magyarázza ezen összetevők endotél-függő artériás vazodilatációra gyakorolt jótékony hatását kedvezőtlen metabolikus állapot esetén. Kutatásunk továbbá megerősítette azt a korábbi megfigyelést, mely szerint az endotél-diszfunkció a felborult szénhidrát és lipidanyagcsere egyik korai jele. Eredményeink azt is mutatják, hogy a HFHSD kiváltotta csökkent endotél-függő artériás relaxáció mérsékelheti a manifeszt hiperglikémiát és hiperinzulinémiát.

A nitrogén-monoxid (NO), a fő vazodilatáló vegyület, az L-arginin L-citrullin átalakulás során keletkezik három NO-szintáz (NOS) felhasználásával: neuronális (nNOS vagy NOS1), indukálható (iNOS vagy NOS2), valamint endoteliális (eNOS vagy NOS3). Az endotéliumban eNOS expresszálódik, míg a vaszkuláris simaizom mind a három izofomát tartalmazza [323]. A vaszkuláris simaizom sejtekben az NO, aktiválva a guanil-ciklázt, emeli a cGMP szintjét, mely következményeként aktiválódik a protein kináz G és ez vazorelaxációhoz vezet [324]. A protein kináz G aktiválásán túl, az NO az endotélsejtekre protektív és regeneratív hatásokat fejt

ki, valamint gátolja a simaizomsejt proliferációt és migrációt [325-327], ezzel mintegy antiateroszklerotikus hatással rendelkezik, amennyiben el tud jutni fiziológiás targetjéhez az artéria falában. Amikor az érfal redox egyensúlya oxidatív irányba változik, reaktív oxigén gyökök (ROS, például szuperoxid anion (O_2^-) az NO átalakulását idézik elő reaktív nitrogén gyökké (RNS, O_2^- esetén peroxinitrit), mely az oxidatív mellett a nitrozatív stressz kialakulásához vezet [328]. Noha ROS még a normál metabolizmus esetén is folyamatosan termelődik, stressz hatására a ROS termelődés drámai növekedése figyelhető meg, kialakítva az oxidatív stressz állapotát. Utóbbi a szövetek károsodásához és gyulladós folyamatokhoz vezet, befolyásolva a metabolikus útvonalakat, beleértve az NO homeosztázist [329]. Egyrészt az iNOS expresszió fokozása az NO (és O_2^-) szint növekedésével jár, másrészt az NOS izoformák (beleértve az eNOS-t) a szétkapcsolásnak nevezett konformáció változáson mennek keresztül, mely eredményeként NO helyett O_2^- -t termelnek [330]. Paradox módon, az oxidatív stressz okozta megnövekedett NO termelődés ellenére, NO deficiencia figyelhető meg, ugyanis az RNS formációk előállításához megnövekedett NO felhasználás szükséges. Ezen folyamatok rámutatnak a redox homeosztázis szerepére a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában [331].

A redukált glutation (GSH) az élő szervezet legjelentősebb antioxidáns kismolekulája, mely a ROS és RNS eliminációjában központi szereppel bír, csökkenti a lipid-peroxidázok aktivitását, védi az SH-csoportot tartalmazó enzimeket az inaktiválástól. Az aktivitás csökkenésekor a GSH oxidált glutationná (glutation-diszulfiddá, GSSG) alakul, az oxidált forma SH hídon keresztül alakul ki. A GSH NADPH-függő reakcióval alakul vissza, melyet a glutation-reduktáz katalizál, biztosítva az egészséges szervezet redox egyensúlyát [332]. A glutation-kapcsolt antioxidánsok hiánya például ateroszklerotikus plakkok kialakulásához vezethet [333].

A korábbi tanulmányokban a diosgenin számos molekuláris célponton keresztül befolyásolta a szénhidrát homeosztázist, hatékonyan csökkentve a hiperglikémiát, gyógyszer indukálta diabéteszes patkánymodellek esetén [334, 335]. A folyamat hátterében húzódo mechanizmusok sokrétűek, ide tartozik a pankreász β -sejtek funkciójának megőrzése, a májban zajló glukoneogenezis és antioxidáns kapacitás szabályozása a májenzimek modulációján keresztül [101], az adipociták differenciálódásának elősegítése, a makrofágok zsírszövetbe történő infiltrációjának, valamint a gyulladós gének expressziójának gátlása [336]. A diosgenin csökkenti a C/EBP homológ protein (CHOP) expresszióját, mely a pankreász β -sejtek endoplazmatikus retikulumában kialakuló stressz csökkenését segíti elő, valamint fokozza a peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor gamma (PPAR γ) expresszióját, elősegítve az adipociták fokozott differenciálódását, a sejtméret és a zsírfelhalmozódás csökkenését [334],

PPAR γ agonistaként a klasszikus inzulin-érzékenyítő tiazolindéndionok hatását utánozhatja a perifériás szövetben [337].

Ex vivo kutatások során derült fény a diosgenin direkt artériás simaizom moduláló hatására, melyet a sejtek viabilitásán, valamint a simaizomsejt migráció gátlásán keresztül figyelhetünk meg [129]. Emellett humán endotélsejt kultúrában, a diosgenin gátolta a szabadzsírsav indukálta endotél-diszfunkciót és inzulin rezisztenciát IKK β és IRS-1 útvonalakon keresztül [338]. Ugyanakkor a görögszénában nem a diosgenin az egyetlen növényi hatóanyag, mely a jótékony hatások hátterében áll. Nagy mennyiségben tartalmaz aminosavakat, köztük 4-hidroxiizoleucint, mely fokozza az inzulinszekrúciót és -érzékenységet [99, 339-341]. A folyamat hátterében a fokozott GLUT4 (glükóz transzporter 4) plazmamembránba történő transzlokációja, így a glükóz felvétel fokozása áll [342]. Továbbá a 4-hidroxiizoleucin a TNF- α mRNS expressziójának csökkentésén keresztül antiinflammatorikus hatással is rendelkezik [343, 344]. A görögszéna másik fontos összetevője a galaktomannán, mely gátol egyes lipid- és szénhidrát-hidrolizáló enzimet (például α -glükozidáz), ezáltal csökkentve abszorpciójukat [102, 345].

A leírt metabolikus hatásokkal összefüggésben, a görögszéna mag és a diosgenin is rendelkezik gyulladásgátló hatással, mely mechanizmusai nem teljesen ismertek. Mindazonáltal a diosgenin gátolja az ateroszklerózis patogenezisében szereplő VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula, vascular cell adhesion molecule) és az ICAM-1 (intracelluláris adhéziós molekula, intracellular adhesion molecule) proteinek expresszióját, a TNF- α -indukálta intracelluláris ROS termelődést, az NF- κ B kináz aktivitást és a későbbi I κ B α degradációt, az NF- κ B nukleáris transzlokációt. Ez alapján a diosgenin potens vegyület az ateroszklerotikus léziók kialakulásának és növekedésének gátlásában egyaránt [346]. A diosgenin okozta csökkent ROS termelődés különösen fontos, mivel szinte minden ROS-hoz kapcsolódó patológiás folyamat magával húzza az NO peroxinitritté történő transzformációját, csökkentve ezáltal az NO biohosszúéletességét, az endotél-diszfunkció kialakulásához vezetve [328].

Eredményeink, melyek szerint az endotél-diszfunkció a metabolikus szindróma egy korai jele lehet, számos korábbi tanulmánnyal összhangban áll. 2-8 hétig magas zsír és szénhidrát diétán (HFHSD) tartott nyulak esetén az endotél-diszfunkció már a második héten kialakult [347]. A szabad zsírsavak meghatározó szerepet játszanak az endotél-diszfunkció kialakulásában, mivel downregulálják az AMPK/PI3K/Akt/eNOS jelátviteli útvonalat [348], aktiválják a NADPH oxidázt ezzel megnövekedett ROS termelődéshez és oxidatív stresszhez vezetnek [349], illetve szintén aktiválják a protein kináz C és NF- κ B útvonalakat, akadályozva ezáltal a vaszkuláris inzulin szignalizációt [350]. Az endotél-diszfunkció fontos szereppel bír a kardiovaszkuláris patológiás folyamatok előrehaladásában [351], sőt független rizikófaktornak tekinthető [352,

353]. Jelen vizsgálat során használt korai metabolikus szindróma modellben (6 hét HFHSD kezelés), az endotél-diszfunkció már normál plazma glükóz és inzulin szint mellett is kialakult. Az artériás nyomás szabályozásában klasszikusan az endotélium egyik legfontosabb szerepe a kémiai stimulációra, például acetil-kolinra történő reagálás. Ez vazodilatív vegyületeken, főként az NO-on keresztül valósul meg, mely a szomszédos simaizomsejten hatva relaxálja az eret, növeli annak átmérőjét [354, 355]. Azonban egy újabban elfogadott elmélet szerint az artériás simaizom több az NO passzív fogadójánál; egy parakrin effektor, mely az acetil-kolinra reagálva fokozza az NO felszabadulását, így járulva hozzá az ér tónusának szabályozásához [356]. Így az endotél réteg szerepe meghatározó az artéria media védelmében az oxidatív stresszorokkal (mint amilyen a szuperoxid anion) és az artériás simaizomsejtek redox egyensúlyának fenntartásában [323, 357]. A vazokonstrikció és vazodilatáció közötti egyensúly fenntartásának hátterében húzódó pontos mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Mindazonáltal feltételezhető kapcsolat van az érrendszer endotél funkciója és redox állapota között: a fiziológias endotél-funkció biztosítja a simaizom mikrokozonyzetének megfelelő oxidoreduktív állapotát (ezáltal a simaizom válaszkészségét), míg a keringésben kialakult oxidatív stressz károsítja az endotél-fukciót (megváltoztatva a médium a redox egyensúlyát csökkenti a simaizom relaxációs válaszkészségét). Jelen kutatás eredményei tovább erősítik a redox egyensúly fontosságát az artériák normál dilatációs készségének fenntartásában, így az artériás nyomásban. Emellett vizsgálatunk jól mutatta a görögszéna mag összetevőinek (főként a diosgeninek) jelentős antioxidáns tulajdonságát. A funkcionális vizsgálatok alapján a görögszéna magörlemény, illetve kellően magas dózis esetén a diosgenin tartalmú étrend szignifikánsan megtartotta, részben javította a HFHSD okozta károsodott artériás acetil-kolin választ. A funkcionális eredmények, valamint a vér redox állapotára irányuló vizsgálatok alapján a görögszéna és diosgenin által kiváltott endotélium-függő vazorelaxáció valószínűleg a diosgenin, illetve más görögszéna összetevők antioxidáns hatásának tulajdonítható. Ugyanakkor a leírt eredmények és összefüggések egy fontos kérdést vetnek fel: miért nem tapasztaltuk az antioxidáns kapacitás csökkenését csak a HFHSD kezelt állatok (pozitív kontroll) esetén, amikor az antioxidáns kapacitás emelkedett a görögszéna és a diosgenin-kezelt állatokban a negatív kontrollhoz képest? Ennek lehetséges magyarázata, hogy a HFHSD okozta zavar a redox egyensúlyban valószínűleg könnyebben kompenzálható volt a véráramban, mint az arteria mediában. Egy lehetséges (de nem egyedüli) magyarázat, hogy a HFHSD-ra adott válasz során egy speciális egyensúly alakult ki a véráramban. Ez a redox állapot, noha az esszék alapján a normál értéken belül maradt, károsította a fiziológias endotél-funkciót / simaizom válaszkészségének intaktságát. Ráadásul a reaktív oxigén gyökök semlegesítői, mint a

diosgenin képesek lényegesen növelni az artéria falában az antioxidáns kapacitást anélkül, hogy a vér redox egyensúlyát befolyásolnák, mely valószínűleg a lipofilitásuknak tulajdonítható.

IX. A BGP-15 hatása különböző állatmodelleken

A diabéteszes kardiomiopátiában előforduló kóros elváltozásokhoz számos tényező hozzájárul, többek között a metabolikus zavarok, autonóm diszfunkció, gyulladás, oxidatív stressz és szubcelluláris jelátviteli zavarok – hogy a folyamat komplexitását szemléltessük [358]. A három fő molekuláris mechanizmus a következő: mitokondrium működésének károsodása, endoplazmatikus retikulumot (ER) ért stressz és a felborult kalcium (Ca) homeosztázis. Ezen három eltérés valószínűleg a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) mennyiségének emelkedése által okozott oxidatív stressz, illetve a „késői fehérje glikációs végtermékek” (AGE) kialakulásának következménye. Az AGE-k olyan károsodott és reaktív fehérjék, amelyek képesek keresztkötéseket kialakítani a sejt szerkezeti elemei között, illetve megzavarják más fehérjék és enzimek működését. Káros hatásait egyrészt biokémiai tulajdonságaik révén fejtik ki, másrészt specifikus receptorokhoz (RAGE-ek) kötődnek, amellyel proinflammatorikus gének átíródásához szükséges transzkripciós faktorokat aktiválnak [358, 359]. A ROS és a glikációs végtermékek emelkedett szintje oxidatív stresszhez vezet és károsítja az endoplazmatikus retikulumot azáltal, hogy rendellenes protein foldingot, poszt-transzlációs módosításokat és a Ca^{2+} -homeosztázis zavarát okozzák. Az ER-stressz következménye a membrán instabilitás, Ca^{2+} -homeosztázis eltérések, továbbá csökken a sarco/endoplazmatikus retikulum ATPáz 2a (SERCA2a) pumpa működése, amely megnyúlt relaxációban, károsodott diasztolés funkcióban, myocyta apoptózisban és sejthalálban nyilvánul meg [360]. Ezentúl, kísérletes eredmények megerősítették, hogy a streptozotocin-indukálta T1DM-es patkányokban a hiperglikémia eredményeként csökkent a SERCA2a pumpa működése [360]. Továbbá, korábbi tanulmányok azt is kimutatták, hogy a szívizomsejtek apoptózisa és a szisztolés károsodás prominensebb T1DM esetén, míg a T2DM-ben a kardiomiociták hipertrófiája, a kamrafal merevsége és a diasztolés diszfunkció a karakterisztikusabb eltérések [361].

Ebben a tanulmányban megkíséreltünk összehasonlítani két standard antidiabetikumot (metformin, pioglitazon) egy ígéretes gyógyszerjelölttel, a hidroximsav-származék BGP-15-tel. Bár a tanulmány fő célja a hatóanyagok kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásainak feltérképezése volt, a teljesség kedvéért tanulmányoztuk a szerek metabolikus paraméterekre kifejtett hatását is. Alátámasztjuk azt a tényt, miszerint a T2DM modellezésére alkalmazott GotoK patkányok enyhén hiperglikémiások és kis mértékben hiperinzulinémiások, túlsúly nélkül [362]. Ami a glükóz homeosztázist illeti, az állatok a 12 hetes kezelés végére

inzulinrezisztencia jeleit mutatták. Az éhomi glükóz szintjük szignifikánsan emelkedett, míg az éhomi inzulin értékek enyhén magasabbak voltak a kontroll csoportban mérthez viszonyítva. Hogy az inzulinrezisztencia kialakulását megerősítsük az alkalmazott modellben, egy széles körben használt inzulin érzékenységi markert [363], a HOMA-IR indexet is meghatároztuk a bazális glükóz és inzulin szintekből. A bazális glükóz érték és a HOMA-IR index szignifikánsan magasabb volt a GotoK patkányokban, de a pioglitazon-kezelés eredményeképpen nemcsak ezen paraméterek értéke csökkent, hanem az NO-függő endoteliális funkció is javult. Saját eredményeinket több újabb tanulmány is igazolja, melyek szerint a tiazolidéndionok képesek a vaszkuláris státuszt pozitív irányban befolyásolni, ám a konkrét hatásmechanizmus még nem tisztázott [364, 365]. Valójában az inzulinrezisztencia endotél diszfunkciót okozó pontos patofiziológiai folyamata sem ismert még, annak ellenére, hogy az elmúlt két évtized kutatásai megállapították az endotélsejtek döntő szerepét a metabolikus szindróma elleni védekezésben [366]. Másfelől, esetünkben a pioglitazonnal kezelt állatokban jelentős testsúlygyarapodást észleltünk, különösen ahhoz a csoporthoz képest, akik metformint kaptak. Ezenkívül nem tapasztaltunk szignifikáns testsúlyváltozást a kezelési csoportok között. Mivel a GotoK egy non-obez T2DM modell, a súlygyarapodás nemkívánatos hatásnak tekinthető [367]. Ez valószínűleg a vízretenció következménye, ám Hallakou és munkatársai korábban leírták, hogy a pioglitazon *in vivo* stimulálja az adipociták differenciálódását és a zsírszövet glükóz felhasználását azáltal, hogy fokozza a GLUT, a zsírsav-szintáz és a foszfoenolpiruvát-karbokináz gének expresszióját [368, 369]. Ráadásul a pioglitazon testsúlynövekedést eredményező hatása hátrányosan hat a diabéteszes betegekre, hiszen az elhízás súlyosbítja a betegséget, illetve elősegíti az ateroszklerózis és szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulását [370]. Legjobb tudomásunk szerint a pioglitazon terápiás értékének fő korlátja az obezitást okozó hatása [371]. Sőt, egy friss metaanalízis szerint, bár a pioglitazon-kezelés csökkenti a nem-halálos kimenetelű CV események előfordulását és csökkent inzulinrezisztenciával jár, emeli a súlygyarapodás mellett az ödéma és a szívelégtelenség kialakulásának kockázatát [372].

A vizsgált echokardiográfiás paraméterek jelentős különbségeket mutattak a kezelési csoportok között. A kezeletlen GotoK csoportban enyhe diasztolés diszfunkciót figyeltünk meg: az e'/a' arány megfordult, E/e' arány nőtt és a transzmitrális A hullám magasabb volt, mint a Wistar állatokban, viszont az E/A arány 1-nél nagyobbának bizonyult, így a GotoK patkányokban létrejövő diasztolés károsodás a humán irányelvek alapján [373] II. grádusúnak (vagy pszeudonormálisnak) felel meg. Habár néhány paraméter (e'/a' , frakcionált rövidülés) javuló tendenciát mutatott, a metformin kezelés mégsem hozott javulást a diasztolés elégtelenségben. A metforminnal kezelt állatokban az endotél-függő vazorelaxáció kis mértékben javult, ez

pedig összhangban van korábbi kutatások eredményeivel, miszerint ez a gold standard antidiabeticum csökkenti az oxidatív stresszt, ily módon pedig javítja az endotélfunkciót diabéteszes patkányokban. A metforminnal kezelt patkányok szérumban glükóz szintje ugyan nem szignifikánsan, de alacsonyabb volt a kezeletlen GotoK csoportéhoz viszonyítva. A metformin GotoK patkányokban vércukorszintet csökkentő hatásáról egymással ellentétes eredmények születtek a nemzetközi irodalomban: a Sena és munkatársai által végzett tanulmányban a MET már 60 mg/kg-os dózisban is csökkentette a vércukorszintet, míg Tae és munkatársai kísérletében az alkalmazott metformin csak a glükóz toleranciában hozott javulást, de sokkal magasabb (300 mg/kg) dózisban [374]. Mivel a GotoK patkányok bizonyos mértékig inzulinrezisztensek, béta-sejt tömegük is kisebb [375], ráadásul a metformin elsődlegesen a glükóz felhasználásának fokozásával csökkenti a vércukorszintet [376], ezért a mi esetünkben a hatóanyag kisebb mértékű hatékonyságának oka valószínűleg az alacsonyabb alkalmazott dózis (100 mg/kg), vagy a relatíve alacsony elemszám (n=6). A pioglitazon, habár jótékony hatással volt a glükóz szintre és az endotél funkcióra, nem hozott létre szignifikáns változást a szívfunkciós paraméterekben, amely valószínűleg a súlygyarapodással van részben összefüggésben.

Mindezek ellenére, echokardiográfiás vizsgálattal megállapítottuk, hogy a BGP-15 kezelés GotoK patkányokban normalizálta a diasztolés paramétereket és javította a szív teljesítményét is, de sem a vaszkuláris státuszra, sem a vércukorszintre nem volt szignifikáns hatással. A transzmitrális Doppler technika normál E/A arányokat mutatott, az E és A hullám sebessége szignifikánsan nőtt a kezeletlen GotoK csoportéhoz képest. Ez a képalkotó eljárás önmagában azonban nem elegendő a diasztolés diszfunkció súlyosságának megfelelő felméréséhez és osztályozásához, ezért ki kell egészíteni egyéb diagnosztikus módszerekkel, mint például a Szöveti Doppler Képalkotás (TDI), amely egy érzékenyebb módszer a kamra relaxációjának értékelésére és a nyomásviszonyok becslésére [377]. Esetünkben a diabéteszes GotoK csoportéhoz viszonyítva az e'/a' arány szignifikánsan nőtt és az E/e' arány szignifikánsan csökkent a BGP-15-tel kezelt állatokban. Az E/e' arány alkalmas a bal kamrai töltőnyomás becslésére, ráadásul a töltőnyomás echokardiográfiás meghatározása révén hasonló információhoz juthatunk, mint invazív szívkatéterezés során, ezért elengedhetetlen a diasztolés károsodás súlyosságának megítéléséhez [378], valamint az E/e' arány meghatározása lehetővé teszi a bal pitvari nyomás (LAP) megbecsülését is. A bal pitvari nyomásértékek BGP-15 kezelés során hasonlóképpen változtak, mint az E/e' arány, illetve szignifikánsan csökkentek (a kontroll szintre), összehasonlítva a GotoK patkányokkal. A diasztolés paraméterek mellett a BGP-15 a bal kamrai ejectios időt (LV ET) is javította és a globális szívizom teljesítményét mutató Tei-index is szignifikánsan javult a kezeletlen csoportéhoz képest.

Az echokardiográfiával detektált diasztolés károsodás javulásának egyik lehetséges oka az a hipotézis, miszerint a BGP-15 kezelés fokozza a kardiomiociták relaxációját, azáltal, hogy a SERCA2a pumpafunkcióját szabályozó fehérjék foszforilációját serkenti. A SERCA2a pumpa – a diasztolés funkció egyik legfontosabb meghatározója – a foszfolambán (PLB) foszforilálása által van szabályozva: a Ser16-os vagy a Thr17-es aminosavon foszforilált [379] foszfolambán (pPLB) „engedi” működni a SERCA2a-t. A cGMP-függő Protein Kináz G (PKG, vagy cGKI) képes a foszfolambánt foszforilálni, amely a szívizom fokozott luzitópiájához, elernyedési képességéhez vezet [379, 380]. A pPLB mennyiségének meghatározásához foszfo-antitesteket használtunk, és a kezelési csoportok között jelentős különbségeket találtunk: a beteg GotoK patkányokban a pPLB/PLB aránya csökkent az egészséges kontroll csoportéhoz képest, és a BGP-15-tel kezelt csoport egyedeiben éppen ellenkezőleg, a pPLB/PLB arány emelkedett. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a BGP-15 hatására nőtt a SERCA2a pumpa aktivitása, amely fokozta a szívizomsejtek relaxációját, így normalizálva a diasztolés paramétereket. A BGP-15 SERCA2a aktivitást fokozó hatása alapján felmerült a lehetőség, hogy a BGP-15 esetlegesen a PDE gátlásán vagy β -receptorokon kifejtett antagonizmus révén képes befolyásolni a szív működést. Humán pitvari trabecula modellen végzett izolált szerves vizsgálataink igazolták, hogy a BGP-15 dózisfüggő módon a pitvari izomzaton negatív inotróp hatást vált ki, melynek maximális mértéke a szerkezetileg hasonló propranolol hatásához mérhető volt [381].

Saját kutatócsoportunk eredményei alapján a BGP-15 egyéb kardioprotektív hatásokkal is rendelkezhet. Legutóbbi tanulmányainkban kimutattuk, hogy mind az egyszeri, mind a krónikus BGP-15 kezelés javítja a diasztolés funkciót kardiomiopátiában szenvedő nyúl modellen [382]. A BGP-15 kezelt állatokban a vaszkuláris státusztól függetlenül javultak az echokardiográfiásan mért diasztolés paraméterek (E/A és E/e' arány) a Tei-index, illetve csökkent a fibrózis mértéke. A kardiomiociták szintjén igazoltuk, hogy a kezelés hatására csökken az izomsejtek passzív feszülése, melyben szerepet játszik a Protein Kináz G aktivitásának növekedése, illetve a következményes titin foszforiláció (Ser4080) emelkedése, a titin N2BA/N2B izoforma arány megváltozása. A folyamatok hátterében a BGP-15 miokardiális cGMP-szintet növelő hatását is kimutattuk, mely részben foszfodiészteráz-gátló tulajdonságának következménye lehet. Egy másik tanulmányunkban egy teljes évig tartó krónikus BGP-15 kezelés hatását vizsgáltuk a szívfunkciós paraméterekre, illetve a sejtek energia-háztartására aging Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányokban. A korábbiakkal összehangban itt is sikerült kimutatnunk az echokardiográfiás paraméterek jelentős javulását a kezelt csoportban (E/e', Tei-index, IVRT, MAPSE, EF), melyet a kardiomiociták

megnövekedett mitokondrium-száma, ATP-szintáz enzim expressziója és aktivitása kísért, az állatok túlélésének szignifikáns növekedése mellett [383].

A legújabb bizonyítékok arra utalnak, hogy a PKG döntő szerepet játszik a szívizomsejt kalcium homeosztázisában SERCA pumpa szabályozásán keresztül. Frantz és munkatársai elegáns kísérletükben olyan egereket használtak fel, amelyekben a PKG deléción csak a szívizomsejtekre korlátozódott. Azt tapasztalták, hogy a PLB Ser16-on történő foszforilációja csökkent, amely kevésbé aktív SERCA aktivitást, így romló szív működést eredményezett; valamint azt is meghatározták, hogy a PKG specifikus célpontja a PLB Ser16 [384, 385]. Ezen eredmények alapján kísérletünkben mi is meg kívántuk határozni a PKG aktivitását, úgy, hogy foszfo(Ser239)-specifikus 16C2 antitesttel vizsgáltuk a VASP fehérje foszforiláltságát. Mivel a PKG által történő VASP foszforiláció egyedüli célpontja a fehérje 239-es szerin aminosava, ezért a pVASP/VASP arány meghatározása széles körben elfogadott módszer a cGMP-függő Protein Kináz G aktivitásának mérésére [386]. Tanulmányunkban bemutattuk, hogy a BGP-15-tel kezelt patkányokban a pPLB szint emelkedésével együtt a pVASP/VASP arány is nőtt, amely a PKG fokozott aktivitására utal, ez pedig magyarázza az enzim két célpontjának (PLB és VASP) emelkedett foszforilációs szintjét. Ami a miokardiális cGMP szintet illeti, kísérletünk másik limitációját az adja, hogy ennek a szintjét nem mértük, hanem ehelyett a cGMP lebontásában résztvevő PDE9A enzim expresszióját vizsgáltuk. A legújabb bizonyítékok arra utalnak, hogy a PDE9A szerepet játszik a natriuretikus-peptidből származó cGMP-szint, és így a PKG aktivitásának szabályozásában, továbbá nemzetközi publikációk mellett saját kutatócsoportunk is tapasztalta szívelégtelen állatmodellekben a PDE9A upregulációját [31, 200]. Ezen eredmények alapján meghatároztuk a miokardium minták PDE9A szintjét, de nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a különböző kezelési csoportok között. A cGMP-út vonal fokozása kardiovaszkuláris betegségekben egyre inkább kutatások középpontjába kerül és számos, a tanulmányunkban is felmerülő kérdéssel foglalkozó kutatás várható a jövőben.

Tanulmányunk limitációit figyelembe véve fontos leszögeznünk, hogy a BGP-15 inzulin érzékenyítő hatását nem tudtuk megkérdőjelezhetetlenül megerősíteni. Habár a BGP-15-tel kezelt csoportban a vércukorszint és a HOMA-IR index is alacsonyabb volt (összehasonlítva a kezeletlen GotoK állatokkal), az eltérés nem érte el a szignifikancia szintjét, valószínűleg a relatíve alacsony elemszám, vagy a statisztikai próba szigorúsága miatt. A fentebb prezentált eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a BGP-15 fokozza a PLB/SERCA út vonalat a Protein Kináz G rendszeren keresztül. A BGP-15 pontos hatásmechanizmusának felderítésére ezen kísérleti módszereket ki kell egészíteni más, egyéb technikákkal is. Ezen felül a hatóanyag egészséges állatokra gyakorolt hatásainak vizsgálata tovább erősítené eredményeinket, és hozzájárulna a gyógyszerjelölt tulajdonságainak hiánytalan leírásához.

X. A miokardiális és vaszkuláris PDE9A enzim és az ateroszklerózis kapcsolata

A diasztolés diszfunkció (DD) a szívelégtelenség (HF) prekurzoraként még annak klinikai tünetei előtt megjelenhet, viszont egyértelmű klinikai jelentősége ellenére sem ismerjük teljesen ezt az entitást. Jelen tanulmányunkban egy olyan nyúl modellt mutatunk be, amelyben a DD jelei hasonlóképpen jelennek meg, mint emberben. Az aterogén diéta echokardiográfiás eredményei csökkent E/A arányt, megnyúlt decelerációs időt (DecT) és emelkedett E/e' arányt (amely emelkedett bal kamrai töltőnyomásra utal) mutattak, ahogy ez a jelenlegi ajánlásokban is jellemzi a diasztolé károsodását [373]. A diasztolés diszfunkció további jelei közé tartozik a bal pitvar (LA) tágulása, megnyúlt izovolumetriás relaxációs idő és emelkedett Tei-index. A bal kamrai kiáramlási traktus (LVOT) sebessége és nyomásgrádiense szintén nőtt a HC csoportban, amely az előzőekhez hasonlóan kóros eltérés. Ugyanakkor a jobb kamrát leíró paraméterek változatlanok voltak: nem tapasztaltunk pangást vagy tüdőoedemát, amely arra enged következtetni, hogy a kialakult diasztolés diszfunkció még preklinikai stádiumban volt. A HC nyulakban nőtt a relatív falvastagság (RWT) és a bal kamra tömege, anélkül, hogy a kamrák kitágultak volna, mely változások arra utalnak, hogy koncentrikus hipertrófia alakult ki, ez pedig bizonyítja a nyomástúlterhelést és a diasztolés károsodást. Ennek megfelelően az aterogén diétán tartott állatok miokardiumában intersticiális fibrózist mutattunk ki Masson's trichrome festéssel. Számos tanulmány beszámolt arról, hogy a bal kamrai hipertrófia részben szerepet játszhat a HFpEF kialakulásában olyan mögöttes mechanizmusok révén, mint a vaszkuláris károsodás, extracelluláris mátrix abnormalitások (fibrózis) és a kardiomiociták megváltozott merevsége [387]. A fibrózis karakterisztikus HFpEF-ben, feltehetőleg a microvaszkuláris endotélkárosodás és a makrofág infiltráció következtében [388]. Továbbá, a normál ejekciós frakció ellenére [389], a beteg csoportban szignifikánsan csökkent GLS értékeket detektáltunk, amely korai jelzője a bal kamrai szisztolés funkcióromlásnak – a humán vizsgálatok eredményeivel összhangban [390]. Eredményeink megerősítik más szerzők megfigyeléseit, miszerint nyulakban a vér magas koleszterinszintje szoros összefüggésben áll a longitudinális és cirkumferenciális strain csökkenésével. Hasonló körülmények között, izolált miocitákon is csökkent szisztolés és diasztolés funkciót írtak le, valamint javasolták a „cholesterol cardiomyopathy” kifejezést, annak ellenére, hogy ezeket az eredményeket echokardiográfiával nem erősítették meg. Habár a Strain Rate Imaging technika még nem tartozik a diagnosztikus kritériumok közé, ígéretes új módszernek látszik a különféle szívbetegségek jövőbeli osztályozásához.

A magas koleszterintartalmú étrenden tartott állatok körében nőtt az aterogén-index, az LDL és az ApoB koncentráció, valamint az ateroszklerotikus plakkok kíséretében emelkedett az

intima/media arány is. Habár a koronáriákat nem vizsgáltuk, valószínűsíthetjük, hogy azok intimája is elmeszesedett, hiszen klinikai bizonyítékok alapján abdominalis aorta plakkok jelenlétekor gyakori a koronária betegség (CAD) egyidejű fennállása is [391]. Mivel az általunk vizsgált acut miokardiális infarktus (AMI) marker, a CK-MB szintje nem volt emelkedett a szérumban, ezért feltételezzük, hogy a kísérleti állatokban nem jött létre trombózis vagy szívinfarktus. A troponin-T szérumszintjében markáns emelkedést tapasztaltunk (kb. a Kontroll érték háromszorosát), azonban az értékek még így is az AMI-t jelző szint (50-100-szoros emelkedés, vagy > 100 ng/l) alatt maradtak. Továbbá, ahogy korábban is megfigyelték [392], a troponin-T emelkedés szorosán összefügg a bal kamra relaxációs károsodásának (főleg az e' hullám csökkent csúcssebességének) mértékével diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegekben. A fentebb említettek eredményeink is alátámasztják, hiszen a HC nyulakban emelkedett troponin-T szintet és az e' hullám csökkent csúcssebességét figyeltük meg. Természetesen egyedül a szérum paraméterek meghatározása alapján nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy korábban trombotikus esemény történt. Ennek ellenére korábbi feltételezésünket – miszerint nem volt vérrögképződés a modellben – megerősíti, hogy a szövettani vizsgálatok során nem láttunk infarktusra utaló jeleket vagy necrosist.

A hiperkoleszterinémia, plakk képződésre hajlamosít, az pedig még korai stádiumában is károsodott endotél-függő vazorelaxációt okoz [393]. A csökkent mértékű vazorelaxáció az endotél diszfunkció legfőbb jelzője, melyben kulcsfontosságú szerepe van az NO-nak, a szervezet elsődleges, az endotéliumban és – legújabb nézetek szerint – az artériás simaizomban termelődő vazodilatátor molekulájának [356]. Egy friss tanulmány szerint a megemelkedett afterload mellett a koronária betegség és a mikrovaszkuláris gyulladás is nagy mértékben hozzájárul a diasztolés szívelégtelenség kialakulásához [394, 395]. Ez a teória rávilágít az érrendszerben fellépő gyulladás szerepére, hiszen az csökkenti az NO bioelérhetőségét, csökkenti a cGMP szintet és a PKG aktivitást a környező szívizomsejtekben. Ezen túlmenően a csökkent NO bioelérhetőség a vaszkuláris eltérések és az érlemeszesedés egyik kulcs faktora, továbbá kardiomiocitákban hozzájárul a PKG-út vonal károsodásához, amely következményeképpen fokozódik a nyugalmi feszülés, a kamrafal merevsége, a fibrózis és a diasztolés elégtelenség. Az általunk végzett kísérletben az endotél funkció értékeléséhez acetylcolint használtunk, majd megfigyeltük, hogy az aterogén diéta drámaian csökkentette az erek Ach-ra adott vazorelaxációs válaszát, míg az Ach-indukált kontrakció megtartott volt. A klasszikus vazodilatátor Ach mellett ATP felhasználásával is elvégeztük a vizsgálatot, és hasonló eredményt kaptunk. Érdekes módon a HC nyulak aorta mintáiban emelkedett volt a PDE9A expressziója, amely tovább fokozhatta a vaszkuláris cGMP csökkenését, így pedig az endotél károsodását.

Az aortagyök-mintákban markáns körkörös plakk képződést figyeltünk meg, amely szignifikánsan szűkítette az ér lumenét (kb 50%), ahogy korábban más szerzők is leírták [38], ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a károsodott relaxáció és az aorta fokozott merevsége együtt mechanikus úton tovább fokozza a diasztolés diszfunkciót, hiszen a csökkent átmérő miatt fokozódik a nyomás az aortában. Ez az afterload megnövekedésében manifesztálódó nyomástúlterheléshez vezet, amely viszont strukturális változásokat indukál a miokardiumban, hasonló módon, mint a szívelégtelenség tanulmányozására szolgáló TAC modellben (amelyet az aorta részleges lekötésével hozunk létre) [396-398]. Az emelkedett nyomást echokardiográfiával is alátámasztottuk, hiszen szignifikánsan emelkedett LVOT (átlag és maximális) nyomásgrádiens és sebesség értékeket mértünk.

A betegség biomarkerei közül szinte csak az NT-pro-BNP-t (a BNP inaktív formáját) használják a rutin diagnosztikában, habár számos egyéb marker (interleukin-6 (IL-6), tumor nekrozis faktor α (TNF- α), pentraxin-e, vaszkuláris sejt adhéziós molekula 1 (VCAM-1), szolubilis ST2, E-selectin) létezik a gyulladás, az oxidatív stressz és az endotél diszfunkció monitorozására. Tanulmányunk limitációjaként fontos megemlíteni, hogy a mért pro-BNP szintek a detektálható határ alatt voltak, ezért nem tudtuk megállapítani, hogy a kísérleti állatokban kialakult DD szívelégtelenségbe alakultak-e.

Tanulmányunk legfontosabb eredménye, hogy – tudomásunk szerint először – mutattuk ki a PDE9A upregulációját hipercholesterinaemiás állatok bal kamrai mintájából, ateroszklerotikus körülmények között. Nagy érdeklődés övezi a PDE9A upregulációjával járó kardiális (és kognitív) betegségeket, mióta kimutatták, hogy a PDE9 szabályozza a nátriuretikus útvonalon képződő cGMP poolt, és így még potensebb hatással van a szívelégtelenség kialakulására, mint a PDE5 [31]. A PDE-k a ciklikus nukleotidokat (cAMP és cGMP) 5'-monofoszfáttá hidrolizálják, valamint a szívben expresszálandó PDE5 és PDE9 nagy mértékben szelektív a cGMP-re. Az eredeti feltételezést, miszerint a PDE5 gátlók hatékonyak a szívelégtelenség kezelésében, nem sikerült teljes mértékben bebizonyítani, továbbá a humán betegekben végzett próbálkozások is kudarcot vallottak az állatkísérletekből származó biztató adatok ellenére [399]. Ráadásul a PDE5 emelkedése HFpEF-ben nem bizonyított, valamint a PDE5 gátlókkal HFpEF betegekben végzett klinikai tanulmányok semleges eredménnyel zárultak [400-402]. Ezek az eredmények vezettek ahhoz a kérdéshez, hogy létezik-e másik útvonal a cGMP szint szabályozásában? Kutatások végül felfedezték a PDE9-et és a szívelégtelenségben betöltött szerepét. A PDE9 a legszelektivebb a cGMP-re, az agyban, a vesékben és a szívizomban expresszálandó. Különböző tanulmányok leírták, hogy a PDE9A kifejeződése nő egér és humán miokardiumban egyaránt, HFpEF és HFrfEF esetén is [31]. Továbbá, az enzim gátlásával vagy genetikai deléciójával ígéretes eredményeket értek el experimentális körülmények között,

mielvelhogy a tünetek mérséklődtek, a szisztolés funkció normalizálódott és a fibrózis mértéke is csökkent [31]. Míg a PDE5 a Z-lemezen található, addig a PDE9A a T-tubulus membránjának környezetében helyezkedik el. Az eltérő lokalizáció felelős lehet a különböző hatásokért, mert bár a két izoformának van közös útvonala, különálló effektorokkal is rendelkeznek, így ez a jelenség tisztázhatja, hogy a PDE9A hogyan felelős csak az NP-ből származó cGMP lebontásáért [31, 399].

Kísérletünkben a VASP és a pVASP²³⁹ expressziót is meghatároztuk. Az ateroszklerotikus állatok miokardiális szövetében szignifikánsan emelkedett (nem foszforilált formájú) VASP kifejeződést észleltünk, amely talán megerősítheti más kutatók eredményeit, de tudomásunk szerint a mi tanulmányunk az első, amely ateroszklerózis talaján kialakult szívbeteg állatmodellben megnövekedett miokardiális VASP expresszióról számol be. Sartoretto és munkatársai az aorta részleges leköttése (TAC) után, hipertrófiás körülmények között írtak le fokozott VASP kifejeződést, amely tovább erősítheti azt a hipotézist, miszerint az ateroszklerózis, az endotél diszfunkció és az érfal fokozódó merevsége a TAC modellhez hasonló nyomástúlerhelést okoz, összhangban a mi echokardiográfiás eredményeinkkel (emelkedett LVOT nyomásgrádiens, falvastagság, E/e' arány) [403]. Azt is kimutatták, hogy a VASP fehérje család valószínűleg részt vesz celluláris válaszok szabályozásában, úgymint sejt migráció és sejt-sejt kapcsolatok kialakítása, mivel a TAC eljárás növeli a VASP szintet és hipertrophiás átalakulást okoz, e a kardiális fibrózis és hipertrófia markerei emelkedettek VASP^{-/-} knockout egerekben. Úgy tűnik, hogy a VASP szabályozása komplex folyamat, valamint mind a hipo-, mind a hiperaktivációja a miokardium patológiás elváltozásait idézi elő [404].

Ami ennél is fontosabb, a PKG1 enzim aktivitását indirekt módon tudjuk mérni a pVASP^{Ser239} / VASP aránnyal, hiszen egyedül a PKG foszforilálja a VASP fehérjét a 239-es szerin aminosavon [386]. Számos különböző tanulmány, különböző kísérletes körülmény között mutatta be, hogy az emelkedett cGMP szint és a PKG fokozott aktivitása kardioprotektív szignalizációs útvonalat indít el. Először is, a PKG a nátriuretikus peptidek egyik effektora, mely fehérjék a szívizomsejtekből szabadulnak fel megnövekedett nyomásterhelés hatására. A nátriuretikus és a vazodilatátor tulajdonságokon túl a NP-ek antifibrotikus és antihipertrófiás hatást fejtenek ki a cGMP/PKG rendszeren keresztül [405]. A cGMP/PKG útvonal kardioprotektív szerepét I/R károsodás során is kimutatták. A PKG aktiválódása elengedhetetlen az iszkémiás postkondicionálás protektív hatásához [406]. Továbbá, kutatócsoportunk egyik korábbi kísérletében leírta, hogy a prekondicionálás véd az I/R károsodással szemben, és ez a kedvező hatás az emelkedett miokardiális cGMP szinttől függ [407]. Azt azonban fontos megemlíteni, hogy a prekondicionálás csak intakt szövetekben

működik, és előzőekben sérült vagy társbetegségekkel színezett kórképekben (pl. hiperkoleszterinémia) már elveszíti protektív mechanizmusát [210]. Egy másik indirekt bizonyíték a cGMP/PKG rendszer védő mechanizmusaira, hogy bizonyos klinikai esetekben a PDE5 gátlása jótékony hatással van a szívelégtelenségre. A PDE5 gátlók kardioprotektív hatása vita tárgya, mivel az állatkísérletek biztató eredményeit a klinikai kutatásokkal nem sikerült alátámasztani [408]. Összefoglalásképpen: az általunk végzett tanulmányban valószínű, hogy a PDE9A upregulációja korlátozza a cGMP/PKG kardioprotektív útvonal bekapcsolását, amit a miokardium cGMP szintjének direkt mérésével és a PKG kináz aktivitásának (foszforilált VASP fehérjén keresztüli) meghatározásával bizonyítottunk.

Eredményeink alapján ateroszklerotikus körülmények között a kardiális PDE9A upregulálódik, valószínűleg a DD következményeként. Ami az intracelluláris cGMP-t illeti, megerősíti a PDE-ok szerepét a ciklikus-nukleotidok szignalizációs hálózatának szabályozásában. A változatlan cGMP szintet azzal magyarázzuk, hogy a PDE9A upregulációjához adaptálódik a PDE5A, így amikor az egyik PDE upregulált, akkor egy másiknak az aktivitása kompenzálja azt [31]. Mivel mind a PDE enzimek kompartmentalizációja, mind a cGMP rendszer működése egyre inkább kutatók érdeklődésének középpontjává válik, ezért a későbbiek folyamán számos jelenleg megválaszolatlan kérdésre kaphatunk választ.

juhasz.bela.1_180_24

Következtetések

(i) A resveratrol kezelésben részesült diabéteszes patkányokban szignifikánsan emelkedett a Trx-1 és HO-1, mely folyamat gátolható volt nitrogén-monoxid szintáz inhibitorral. A resveratrol kezelést követően csökkent vércukorszintet tapasztaltunk, mely szignifikánsan megemelkedett Mn-SOD aktivitással párosult. A vércukor értékek szignifikánsan megemelkedtek a diabéteszes állatokban (>500mg/dl) a nem diabéteszesekkel összehasonlítva (90mg/dl). A resveratrol kezelés a beteg csoportban jelentősen csökkentette a vércukorszintet (370mg/dl) a diabéteszes csoportokhoz képest (>500mg/dl). Az L-NAME kezelt csoport megszüntette a resveratrol-mediált vércukorszint csökkentést. A resveratrol javította a miokardiális funkciók paramétereit, azonban az L-NAME kezelés csökkentett funkcionális visszatérést eredményezett.

(ii) A koleszterindús táplálkozás okozta miokardiális komplikációk, mint a megnövekedett infarktusos terület, az apoptózis mértéke, a károsodott angiogenezis mind javíthatók resveratrol kezeléssel. Emellett prezentáltuk, hogy a statin és resveratrol kombinált terápia mennyivel eredményesebbnek bizonyul HC-miokardium kezelésében, mint az statinok önmagukban. Eredményeink szerint a resveratrol és Trx-1 *in vitro* és *in vivo* modellekben, a VEGF-indukálta angiogenetikus aktivitás jelentősen lecsökkent SnPP adjuváns kezelés mellett, mely a HO-1 enzim aktivitását gátolta.

(iii) Az intraperitoneális Br kezelés kardioprotektív hatást biztosít globális I/R modellben. Br hatására javult a kamra posztisztkémiai felépülése, és csökkent az elhalt terület mérete, valamint az apoptózis mértéke a kezeletlen állatokhoz viszonyítva. A Br-mediált kardioprotektív hatás az Akt-FOXO jelátviteli kaszkád aktiválódásán keresztül jöhetett létre.

(iv) A niacin-kötött-bróm posztisztkémiai kardioprotektív hatását is igazolni tudtuk. Az Energia formula (Ef) kezelés képes volt I/R károsodást követően javítani a szívfunkciót, illetve csökkentette az infarcterálódott terület kiterjedését nőstény és hím egyedekben egyaránt. Hatásának hátterében a fokozott HSP-25, -32, és -70 expresszió állhat, valamint az AMPK fokozott foszforilációja szintén elősegítette a sejtek I/R okozta károsodással szembeni ellenállását.

(v) A meggy-mag-kivonat szívre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk *in vivo* hiperkoleszterinémiai nyúlmodellben. A magas lipid szintektől elsősorban diasztolés szívelégtelenség kialakulását vártuk, amelyet szívultrahanggal vizualizáltunk. A vizsgálat során rögzített E'/A' arányok alapján a meggy-mag-kivonat adása diasztolés funkció javulását eredményezte. A kezelés az izolált szív I/R károsodásában látható csökkent aorta kiáramlási értékeket képes volt javítani, illetve csökkentette az infarktusos terület nagyságát is. AZ MKK

hatására az I/R károsodást szenvedett szívizomsejtekben fokozódott a COX enzim aktivitása, és megemelkedett COX III és HO-1 szintje. Ily módon az MKK a mitokondriális diszfunkciót javította, valamint elmondható, hogy szívizomsejtekben antiapoptotikus hatással is bír.

(vi) A medvehagyma liofilizátum (WGLL) kezelés számottevő mértékű javulást eredményezett a végdiasztolés átmérő, az FS és az EF paraméterekben, és a jobb kamrai funkció is szignifikánsan javult WGLL hatására. A WGLL emellett még az egészséges kontroll állatokhoz képest is jelentősen emelte a HO-1 expresszióját, a hiperkoleszterinémiában megnövekedett SOD-1 szintet ugyanakkor az egészséges szintre csökkentette le, ezzel nagymértékben hozzájárulva a szívizom védelméhez az oxidatív stresszel szemben. Azonfelül WGLL hatására mérséklődött a magas összkoleszterin és az LDL szintje, és a hiperkoleszterinémiában lecsökkent ApoA és megemelkedett ApoB szintjét is szignifikánsan javította. A medvehagyma liofilizátum továbbá csökkentette mind az LDH, mint a kreatin-kináz szintjét, ami májvédő hatására is utal.

(vii) A monokrotalin-indukálta PAH modellben megfigyelhető jobb kamrai szívfunkció károsodását a TAPSE érték csökkenése tükrözte, viszont a WGLL, valamint a pozitív kontrollként alkalmazott sildenafil javította ezt a paramétert. A medvehagyma liofilizátum növelte a PAH csoportban megfigyelhető csökkent aorta kiáramlást és lökettérfogatot, emellett a szívfrekvenciát is fokozta, így a perctérfogat az egészséges kontroll állatok paramétereirehöz vált hasonlónvá. A WGLL és sildenafil mind a jobb kamrai hipertrófiát, mind az érfal megvastagodást meg tudta előzni. WGLL hatására a sildenafill szemben nem változott a jobb kamrában a PDE5 expressziója, ami arra utal, hogy a medvehagyma kardioprotektív hatását nem a PDE5 útvonal gátlásán keresztül fejt ki.

(viii) A diosgeninnel kezelt csoportok esetében a 10, illetve 50 mg/kg dózissal kezelt állatoknál láttunk a negatív kontrollhoz mérhető relaxációt, és az 50 mg/kg-os csoportban ez a hatás sokkal kifejezettebb volt, de nem akkora, mint a görögszéna esetében, ami azt sugallja, hogy a görögszéna vazodilatátor hatásának háttérében egyéb vegyületek is szerepet játszanak. A HFHS kontroll csoportban mind az oxidált, mind a redukált glutation szintje megemelkedett, míg mindegyik kezelt csoportban ezen vegyületek szintje lecsökkent, ezen felül a diosgeninnel és görögszénával kezelt állatokban a kontroll csoportokhoz képest szignifikánsan csökkent a glutation-reduktáz szintje, ami a diosgenin antioxidáns hatására utal.

(ix) 12 hetes kezelési periódus végén a Goto-Kakizaki patkányok éhomi vércukorszintje szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontrollként alkalmazott Wistar állatokhoz képest. A kezelt csoportok mindegyike csökkentette az éhomi glükózsintet, de csak a pioglitazon ért el statisztikailag igazolható hatást. A Goto-Kakizaki kontroll patkányoknál gyengébb aortareaxációt figyelhettünk meg a Wistar csoporthoz viszonyítva, de a különbség nem volt

szignifikáns. A pioglitazon kezelés azonban jelentős mértékben javította a vazorelaxációt a Goto-Kakizaki kontrollhoz képest. A Wistar kontrollokhoz viszonyítva a Goto-Kakizaki patkányokban a diasztolés szívfunkciók romlását figyeltük meg. Az MV E, E/e' arány, az LVOT Vmax megemelkedett, az e'/a' arány és a LV ET csökkent. A BGP-15 kezelés statisztikailag szignifikáns módon javította ezeket a paramétereket. Goto-Kakizaki állatokban csökkent a foszforilált foszfolambán és a VASP aránya, de BGP-15 hatására jelentős mértékben nőtt mindkét enzim foszforilációja. Eredményeinket összefoglalva, a BGP-15 hatékonyan javította a diasztolés szív működést a Goto-Kakizaki diabétesz modellben, és valószínűsíthető, hogy kardioprotektív hatását a SERCA/foszfolambán útvonalon keresztül képes kifejteni.

(x) Kísérletünkben hiperkoleszterinémias nyulak kardiovaszkuláris elváltozásait vizsgáltuk. Echokardiográfiás mérésekkel kimutattunk, hogy a koleszterindús diéta számos ponton károsította a szív működést, főként a diasztolés funkció terén. A hiperkoleszterinémias csoportban nőtt a bal pitvar mérete, a bal kamra tömege és relatív falvastagsága, a kiáramlási traktus sebessége és nyomásgrádiense, a decelerációs idő, az E/e' arány, izovolumetriás relaxációs idő, valamint a Tei index. Csökkent az E/A és az e'/a' arány, az ejekciós frakció és a frakcionális rövidülés értéke. Morfológiailag hiperkoleszterinémia hatására megnőtt a szív és a bal kamra tömege. A szérum paraméterek terén az össz koleszterin, LDL és HDL jelentősen megemelkedett a koleszterindús diéta hatására, és az ApoB/ApoA arány, valamint az aterogén index is szignifikánsan nőtt. A bal kamrából elvégzett Western blot analízis a PDE9A és PKG1 emelkedését mutatta ki hiperkoleszterinémias nyulakban. A VASP, és a foszforilált VASP mennyisége is nőtt, a foszforilált és nem foszforilált VASP aránya viszont nem, amelynek a háttérében az állhat, hogy az upregulált PDE9A korlátozza a cGMP/Protein Kináz G kardioprotektív útvonal bekapcsolását. Humán pitvari trabecula modellen végzett izolált szerves vizsgálataink igazolták, hogy a BGP-15 dózisfüggő módon a pitvari izomzaton negatív inotróp hatást vált ki, melynek maximális mértéke a szerkezetileg hasonló propranolol hatásához mérhető volt.

juhasz .bela .1_180_24 Transzlációs szempontok és jövőbeli irányok

A transzlációs medicina tükrében fontos tudni, hogy bár az egy jól megalapozott tény, miszerint a hiperlipidémia a kardiovaszkuláris betegségek rizikófaktora, természetesen az étkezés során bevitt koleszterin nem okoz ugyanolyan gyors és súlyos patofiziológiai változásokat emberekben, mint nyulakban. Feltételezhető azonban, hogy a magas zsírtartalmú étrend, az elhízás és a CAD hozzájárul a diasztolés diszfunkció kialakulásához humán betegeknél is. Ennek megfelelően az itt bemutatott nyúl modell számos körülmény leképezésére ad lehetőséget. Amennyiben a nyulakat hosszú ideig (pl. 40 héten keresztül) magas koleszterintartalmú táppal etetjük, vagy az eledel koleszterinnel való dúsítását fokozzuk (2%), súlyos CAD, AMI és szisztolés HF alakul ki bennük [409], azonban ha rövidebb ideig alkalmazzuk az aterogén diétát és alacsonyabb a táp koleszterin tartalma, akkor endoteliális károsodással, diasztolés diszfunkcióval és csökkent szisztolés strain paraméterekkel rendelkező állatmodellt tudunk létrehozni.

A kardiovaszkuláris betegségek tanulmányozásában gyakran használnak nyúl modellt, hiszen a koleszterin homeosztázisuk és a szív működésük hasonlít a humánhoz. Kétségtől, bizonyos területeken kutya vagy juh modellek alkalmasabbak lehetnek, mert a nyulak sokkal alacsonyabb tartalék pulzusa befolyásolja a testedzés hatásainak vizsgálatára irányuló kísérleteket [35]. A kistestű rágcsálók (egerek és patkányok) – főleg a transzgénikusak – nagyon hasznosak a kardiovaszkuláris kutatások számos területén, de nem az ateroszklerózis modellezésében. A patkányok és az egerek rezisztensek az aterogén étrendre, továbbá magas a HDL szintjük és hiányzik a CETP (koleszterin-észter transzfer protein) fehérjéjük, ami ellentétesek a humán paraméterekkel [35]. Ezen tényezők miatt még mindig a nyúl modellek a legnépszerűbbek azokban a kutatásokban, amelyek tárgya az ateroszklerózis, a CAD és társbetegségeik.

Kísérletünkben bemutattuk, hogy a miokardiumban a PDE9A expressziója fokozódik már az ateroszklerózis-indukálta kardiális diszfunkció korai stádiumában. Mivel ez az útvonal létfontosságú az emberi szervezetben, a nátriuretikus peptid – cGMP szignalizációs útvonal hiányzó hírvivőinek meghatározása, a PDE-ok közötti kommunikáció vizsgálata vagy az effektorok (PKG, titin) szerepének tisztázása lehetséges terápiás stratégiák kidolgozásához vezethet (pl. PDE9 gátlók, Ca-érzékenyítők, szolubilis guanilat-cikláz (sGC) aktivátorok, neprilizin inhibitorok). Ezenkívül az NO-cGMP útvonal pontosabb megismerése újabb kutatási irányokhoz vezethet (amelyeket nemrégiben kiemelték az Európai Kardiológiai társaság irányelvében) például az angiotenzin receptor-neprilysin inhibitor (ARNI) (valsartan/sacubitril) és a sinoatrialis csomó modulátorok (ivabradin) megismerésével [410]. Egyéb ígéretes

juhasz.bela.1_180_24

szignalizációs célpontok felfedezésére nagyon sok kutatás irányul, így idővel közelebb kerülhetünk a betegség patológiájának teljesebb megismeréséhez, valamint az újabb terápiás lehetőségek tárháza is bővülni fog.

juhasz.bela.1_180_24

Köszönetnyilvánítás

A köszönetem kinyilvánításának megkezdése előtt le kell szögezmem, hogy a sorrend nem fontosság alapján történik, hiszen lehetetlen lenne rangsort felállítani abban, hogy ez az értekezés kiknek a segítségével valósulhatott meg. A kutatói munkám során mindenkitől egy kisebb vagy nagyobb darab „puzzle”-t kaptam a majdnem teljes kép kirakásához, ezen fejezetrészt éppen ezért kronológiai sorrendben igyekeztem megírni.

Hallgatóként, amikor a Debreceni Orvostudományi Egyetem Gyógyszerhatástan-Biofarmácia Tanszékén egy gyógyszerhatástan előadás után Fenyvesi Ferenc csoporttársamat elkísértem a diplomadolgozatához szükséges munkájához az izolált szív laboratóriumba, csodálkozva próbáltam megérteni a dobogó szív mögöttes létét, amelyet Tósaki Árpád Professor Úr és Szilvássy Zoltán Professor Úr torakotómiát követően helyeztek fel az aorta majd vena pulmonalis kanülre, és bírták működésre. Az izolálás előtt és után a hallgatókat is bevonták a diszkurzusba, és a kísérletes munkába egyaránt. Két szív felhelyezése közben olyan intellektuális témákat boncolgattak, amely graduális hallgatóként még teljes zűrzavart jelentett számomra, és nem gondoltam, hogy a két professzor a legfontosabb fejezetet fogja megnyitni életemben és olyan dolgokra fognak megtanítani, amelyek nélkül most egyrészt ez a mű nem készülhetett volna el, másrészt még kutatónak sem nevezhetném magam. Nem tudom szavakba önteni azt a köszönetet, amivel tartozom nekik azért, amivé váltam.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tóth László (Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Gyógynövény és Drogismeret Tanszék) és Dr. Dinya Zoltán (Debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Analitikai Tanszék) Tanár Uraknak, hogy 1999-ben TDK hallgatójukká fogadtak és önálló munkavégzésre tanítottak. Nem tudok elég hálásnak lenni a gyógyszerész, illetve az orvosi karokon tanító valamennyi tanáromnak, akik nélkül a bázis tudást nem szerezhettem volna meg.

Az egyetemi karrierem véget is ért volna, hogyha Prof. Dr. Vecsernyés Miklós (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, dékán) nem szorgalmazza felvételemet a Gyógyszerhatástan-Biofarmácia Tanszékre. Köszönöm neki, hogy annak ellenére, hogy mára már másik karon tevékenykedem, a kezemet nem engedte el és barátként, mai napig figyelemmel kíséri a sorsomat.

Köszönöm Dr. Bak István akkori kollégámnak, hogy rangidős PhD hallgatóként mindig segített azokban a szituációkban, amikor az izolált szív szövetvényes részleteiben elvesztem.

Nagyon hálás vagyok Prof. Dr. Antal Miklós Professor Úrnak, hogy PhD hallgatóként bejárást biztosított a kutatólaboratóriumába és bevezetett az immunhisztokémia és elektronmikroszkópia rejtelseibe.

Hálával tartozom Nilanjana Maulik Professzor asszonynak, hogy a Farmingtoni Egyetemen töltött időszakom alatt, mint témavezető a bizalmába fogadott és olyan projekteket bízott rám, amelyek később citációk százait vonzották. Az Egyesült Államokban töltött kutatási időszak egy új fejezetet nyitott az életemben, ahol olyan metódokat tanulhattam, amelyekre itthon nem lett volna esélyem. Ebben kifejezetten mentoromnak tekintetem Dr. Shigeaki Kaga akkori szívsebész kollégámat, akitől „japános” precizitást, kitartást, strapabírást és alázatot tanulhattam. Itt szeretnék szintén köszönetet mondani az amerikai kutatólaborban eltöltött idő alatt az ott dolgozó Mahesh Thirunavukkarasu, Suresh Varma Penumathsa, Srikanth Koneru, Lijun Zhannak, akik egyaránt segítettek munkámat. Hálás vagyok Dr. Dér Péter barátomnak és hartfordi lakótársamnak, hogy a nehéz helyzetekben is jókedvre derített és csillapította az itthon maradt barátaim és rokonaim miatt érzett honvágyamat. Életem ezen korszakának lelki nehézségeiben szintén rengeteget segített Dr. Gesztelyi Rudolf kollégám és barátom, aki leveleivel és beszélgetéseivel olyan irányba terelt, hogy a külföldi kutatómunkából szakmailag a lehető legjobbat hozzam ki. Tudásával és tapasztalatával a mai napig gazdagítja a tudástáramat, és nagyon köszönöm neki, hogy bármikor bármiben számíthatok rá.

Hálával tartozom Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna akadémikus asszonynak, hogy kutatási imádatával és alázatával irányt mutatott abban, hogy hogyan is kellene egy kutatócsoportot irányítani és vezetni.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, hogy PhD illetve habilitációm során is építő kritikával segítette munkámat, és a konferenciákon történő beszélgetések során egy-egy apró ötlettel illetve kritikával mutatott irányt tudományos pályám előrehaladásában.

Nagyon hálás vagyok néhai barátomnak Dr. Kemény-Beke Ádámnak, hogy útmutatásával, tanácsaival, intézetünk metodikája az experimentális ophthalmologia irányába is kibővült, illetve nagyra értékelem „A szemészeti készítmények farmakológiája” című habilitációs előadások elkészítésében nyújtott hatalmas szakmai segítségét.

Nagyon köszönöm Papp Zoltán és Tóth Attila Professzor Uraknak, hogy egyetemünk akkori legjobb szívultrahang laborjához szabad bejárást biztosítottak, és mindemellett kutatómunkámat mindig önzetlenül segítették briliáns elméjükkel. Az MTA épületében történő védésükön csodálva szembesültem az akadémiai légkör varázsával, ahol abban a pillanatban fogadtam meg, hogy valaha én is ugyanott akarok állni. Köszönöm, hogy a mű megírásának utolsó pillanatában is tanácsukkal jobba tehettem az értekezést.

Nagyon hálás vagyok Dr. Majoros László professzor barátom szakmai segítségéért, baráti jókedvű beszélgetéseinkért és útmutatásaiért.

Hálámat szeretném kifejezni Prof. Dr. Pórszász Róbertnek, hogy a Farmakológia Intézetben sokat tanulhattam tőle az oktatási metodikák fejlesztése tekintetében.

Köszönöm Prof. Dr. Bhattoa Harjit Palnak, hogy a vérminták analízise tekintetében a leg lehetlenebb pillanatokban is a rendelkezésünkre állt, így egyetlen minta sem ment kárba.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Varga Balázsnak, hogy kutatócsoportomban egy olyan személyként van jelen, aki a legapróbb részletekben képes több napig elmerengeni és olyan megoldással visszatérni, amelyről álmodni sem merek.

Szintén nagyon köszönöm Dr. Szabó Adrienn belgyógyász barátom szakmai iránymutatásait, amelyeket a betegség mellett tanulhattam meg tőle.

Hálás vagyok Dr. Kertész Attila kardiológus szakorvos egykori PhD hallgatónak, hogy kitartásával, precizitásával, ultrahangos tapasztalatával bővítette metodikai lehetőségeinket, és mai napig számíthatok rá bármilyen echokardiográfiás vagy egyéb kardiológiai problémákban.

Nagyon köszönöm Dr. Bombicz Mariann szakgyógyszerész, egykori PhD hallgatónak és barátomnak, hogy kreativitásával, dinamikájával, vidámságával, életkedvével, sportok iránti nyitottságával egy új szint hozott az életembe, és nemcsak kollégaként, hanem barátként is bármikor számíthatok rá.

Hálával tartozom Dr. Priksz Dániel szakgyógyszerész már védett PhD hallgatónak, egyúttal barátomnak, hogy precizitásával, aprólékos, részletekbe menő tudásszomjával, kitartásával, lojalitásával, kiváló fogalmazó készségével szinte minden szakmai nehézségünkben gyógyírt talált a problémára.

Nagyon hálás vagyok a Szegedi Tudományegyetemről kollaborátorunknak Dr. Pósa Anikó docens asszonynak, akivel több pályázatot sikerrel tudunk a hátunk mögött. Ötleteivel, dinamikájával, strapabírásával példaértékű női kutatónak tartom, akire, mint nagyon stabil szakmai kollaborációs partnerre bármikor számíthattam.

Külön köszönöm Prof. Dr. Hohmann Juditnak, Prof. Dr. Csupor Dezsőnek, és Dr. Takács Istvánnak a medvehagyma vizsgálatában nyújtott farmakognóziái és analitikai segítségüket.

Hatalmas köszönet illeti Balla József és Balla György Akadémikus Urakat, hogy szakmai tudásukat, ötleteiket mindig önzetlenül bocsátották a rendelkezésemre, és abban az esetben, ha a kísérleteim megakadtak vagy alkotói válságba kerültem, mindig szakítottak rám időt és hatalmas tapasztalatuknak köszönhetően rengeteget tanulhattam tőlük.

Nagyon köszönöm Dr. Kiszil Okszánának, hogy amikor átkerültünk a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetbe, testvéri szeretettel gondoskodott rólunk.

Köszönettel tartozom Dr. Kurucz Andrea kardiológus szakorvos jelölt, egykori PhD hallgatóm szorgalmas és töretlen munkájáért.

Nagyon köszönöm Dr. Kiss Rita adjunktus asszony segítségét, amit mind a közös munkában, mind az életben tanúsított irányomban. Nagyon hálás vagyok azért, hogy megismerhettem, mert

nélküle biztosra mondhatom, hogy az életem nem így alakult volna, és az orvosi szemléletem nem bontakozhatott volna ki.

Nem tudok elég hálásnak lenni a Debreceni ODT tagjainak (Prof. Dr. Ádány Róza, Dr. Csoma Eszter, Prof. Dr. Harangi Mariann, Prof. Dr. Szűcs Gabriella, Prof. Dr. Balla György, Prof. Dr. Balla József, Prof. Dr. Csernoch László, Prof. Dr. Fülesdi Béla, Prof. Dr. Illés Árpád, Prof. Dr. Muszbek László, Prof. Dr. Nánási Péter, Prof. Dr. Tósaki Árpád), hogy üléseinken történő rutinos, tapasztalt, konstruktív, bölcs hozzászólásaikkal nagyon sokat adtak hozzá a saját kutatási attitűdömhöz.

Hálás vagyok A TEDI titkárának Szalai Andreának, hogy a doktori iskolával, illetve oktatással kapcsolatos adminisztrációs terhet leveszi a vállamról. Dr. Csoma Eszter és Oláh Zsuzsi nélkül a PhD hallgatóim elvesztek volna a szabályzatok útvesztőiben, de mindketten olyan háttértámogatással láttak el minket, hogy a védések gördülékenyebben, mondhatni ünnepi eseményként mehettek végbe.

Külön köszönöm Prof. Dr. Csont Tamás Bálint és Dr. Csonka Csaba önzetlen segítségét, hogy PhD vagy habilitációs pályamunkák alapos bírálatában vagy szakértelmében mindig számíthattam rájuk.

Hálás vagyok a sorsnak, hogy Dr. Szűcs Miklós urológus szakorvos PhD hallgatómat szintén a barátaim sorában tudhatom. Szakmai- és élettapasztalata, szakorvosi szemlélete egy új látásmódot nyitott meg előttem.

Köszönöm Dr. Szokol Miklós kardiológus szakorvos PhD hallgatónak, hogy kiváló intervenciós tudására alapozva a metodikai repertoárunkat ki tudtuk bővíteni.

Nagyon hálás vagyok Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, Kovács Péter Professzor Úrnak, Szabó Zoltán KK Elnök Úrnak, Dr. Somodi Sándor Tanár Úrnak, hogy tanítványuknak fogadtak, bevezettek a klinikumba, a klinikai farmakológiába, és megtanulhattam a humán vizsgálatok terén pl. a hiperinzulinémiás-euglikémiás clamp (HEGC) módszerét.

Külön köszönöm Dr. Lampé Nórának, egykori PhD hallgatóm töretlen, kitartó hozzáállását, illetve azt, hogy a továbbképzésekre történő felkészülésnél is naprakész kutatómunkával segíti előadásaim színvonalasabbá tételét.

Nagyon köszönöm jelenlegi PhD hallgatóimnak: Dr. Karácsonyi Zoltánnak, Dr. Kozma Máténak, Dr. Szekeres Rékának, Pelles-Taskó Beának, és Dr. Blága Zsanettnak, hogy munkájukkal, ötleteikkel, szorgalmukkal, emberségükkel megkönnyítik a mindennapjaimat.

Nagyon hálás vagyok Dr. Szilágyi Annának, Dr. Takács Barbarának és Dr. Tarjányi Verának, hogy a kutatócsoportom részét képezik, és segítenek a mindennapi kutatási feladatok megalapozottabbá és cizelláltabbá tételében.

juhasz.bela.1_180_24

Hálával tartozom Dr. Szentmiklósi József tanár Úrnak, és Prof. Dr. Szántó Sándornak, hogy a humán etikai engedélyek beadásánál megkönnyítik életemet. Hasonlóképpen köszönöm Dr. Deák Ádám DEMÁB Elnök Úr állatetikai engedélyek benyújtásakor nyújtott segítségét.

Köszönöm Kerekes Juditnak és Kozma Krisztinának, hogy megkönnyítik a munkámat, kedvességükkel és gondoskodásukkal otthonos légkört teremtenek, és feledtetik az intézet minden dolgozójával, hogy valójában egy munkahelyen vagyunk.

Köszönöm Dr. Hegedűs Csabának és Luczi Péternek, hogy bármikor számíthattam rájuk minden szoftveres analízis és egyéb technikai problémák esetében.

Nagyon hálás vagyok Prof. Dr. Balogh Péternek, Dr. Czine Péternek, és Dr. Lengyel Péternek, hogy a matematikai és statisztikai problémák útvesztőiben mindig számíthattam rájuk.

Köszönöm Prof. Dr. Bácskay Ildikó dékán asszonynak, Dr. Fehér Pálma adjunktus asszonynak, Dr. Lekli Istvánnak, hogy a kollaborációs munkánk során mindig pozitívan és segítőkészséggel álltak kutatócsoportunkhoz, és bármikor számíthattunk rájuk a nehéz pillanatokban.

Köszönöm minden diplomamunkásomnak és TDK hallgatómnak, hogy részese volt az életemnek, mert ők is a puzzle egy kis darabját beillesztették a kirakósba.

Hálás vagyok Vatler Gabriellának és Dr. Takács Evelinnek, hogy miattuk nem létezik a szótárban az, hogy adminisztrációs probléma, mert mindent villámütésszerűen megoldanak.

Köszönet illeti a Farmingtoni Egyetem Kísérletes Sebészeti Tanszék, a Gyógyszerhatástani Tanszék és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi munkatársát.

Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Németh József tudományos főmunkatársnak, Dr. Lelesz Beátának, Oláh Krisztinának, és Szegváriné Erdős Andreának a labormunkákban nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti Prof. Dr. Mátyus László Dékán Urat, hogy az értekezés befejezésénél minden találkozásunk alkalmával azt sugallta, hogy életem jelen szakaszában, ígéretemnek megfelelően, mi is valójában a legsürgetőbb teendőm.

Köszönöm barátaimnak (megismerés sorrendjében) Nagy Attilának, és anyukájának, Erikának, Dr. Abbas Javadi Dafsarinak, Dr. Mojgan Goulipour Saliminek, Dr. Péter Zoltánnak, Bálega Jánosnak, Puskás Bélának, Anton Pálnak, Békési Tibornak (pótkeresztapámnak), Dr. Bányai Sándornak, hogy a szabadidőmben olyan emberekkel lehetek, mint ők, és segítenek mind a boldog, mind a nehéz idők eltöltésében, illetve átvészelésében.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak; édesanyámnak Petrás Máriának, aki önzetlenségével magát mindig háttérbe sorolva támogatta az életutam minden állomását, enyhítve a rám nehezedő anyagi és erkölcsi nehézségeket. Köszönöm feleségemnek Zitának, lányaimnak Zizócának, Jacskának és Hannusnak, hogy az életem részévé váltak, mert nélkülük ez a munka ekkora szívvel és odaadással nem születhetett volna meg.

juhasz.bela.1_180_24
Irodalomjegyzék

1. Moss, J.W. and D.P. Ramji, *Nutraceutical therapies for atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(9): p. 513-32.
2. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 535-46.
3. *The top 10 causes of death*. 2020; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
4. Slijkhuis, W., W. Mali, and Y. Appelman, *A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis*. Neth Heart J, 2009. **17**(4): p. 140-4.
5. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
6. Zhu, Y., et al., *Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation*. Biomolecules, 2018. **8**(3).
7. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
8. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
9. Ritter, J.F., Rod; Henderson, Graeme; Loke, Yoon Kong; MacEwan, David; Rang, Humphrey, *Rang & Dale's Pharmacology 9th Edition*. 2018.
10. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
11. *Obesity and overweight*. 2021; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
12. Pignone, M., *Management of elevated low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) in primary prevention of cardiovascular disease*. 2021.
13. Stefanutti, C., *Lomitapide-a Microsomal Triglyceride Transfer Protein Inhibitor for Homozygous Familial Hypercholesterolemia*. Curr Atheroscler Rep, 2020. **22**(8): p. 38.
14. Lambert, G., et al., *The PCSK9 decade*. J Lipid Res, 2012. **53**(12): p. 2515-24.
15. Jonsson, A.L. and F. Backhed, *Role of gut microbiota in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(2): p. 79-87.
16. Taskinen, M.R. and J. Boren, *New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes*. Atherosclerosis, 2015. **239**(2): p. 483-95.
17. Chait, A. and I. Goldberg, *Treatment of Dyslipidemia in Diabetes: Recent Advances and Remaining Questions*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(11): p. 112.
18. Oparil, S., et al., *Hypertension*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**: p. 18014.
19. Hunter, P.M. and R.A. Hegele, *Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(5): p. 278-288.
20. Johnston, T.P., et al., *Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management*. Pharmacol Res, 2017. **120**: p. 219-225.
21. Fuller, S. and J.M. Stephens, *Diosgenin, 4-hydroxyisoleucine, and fiber from fenugreek: mechanisms of actions and potential effects on metabolic syndrome*. Adv Nutr, 2015. **6**(2): p. 189-97.
22. van Heerebeek, L. and W.J. Paulus, *Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today?* Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 227-36.
23. Nishida, M., et al., *Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 13244-53.
24. Fiedler, B., et al., *Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11363-8.

25. van Heerebeek, L., et al., *Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction*. *Circulation*, 2012. **126**(7): p. 830-9.
26. Valero-Munoz, M., W. Backman, and F. Sam, *Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a "Fishing Expedition"*. *JACC Basic Transl Sci*, 2017. **2**(6): p. 770-789.
27. Pandey, K.N., *Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca(2+) release, and activation of protein kinase C*. *Front Mol Neurosci*, 2014. **7**: p. 75.
28. Madamanchi, C., et al., *Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure*. *Int J Cardiol*, 2014. **176**(3): p. 611-7.
29. Kuhn, M., *Cardiac actions of atrial natriuretic peptide: new visions of an old friend*. *Circ Res*, 2015. **116**(8): p. 1278-80.
30. Chirinos, J.A., et al., *Time-varying myocardial stress and systolic pressure-stress relationship: role in myocardial-arterial coupling in hypertension*. *Circulation*, 2009. **119**(21): p. 2798-807.
31. Lee, D.I., et al., *Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease*. *Nature*, 2015. **519**(7544): p. 472-6.
32. Solomon, S.D., et al., *Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Rationale and Design of the PARAGON-HF Trial*. *JACC Heart Fail*, 2017. **5**(7): p. 471-482.
33. Hasenfuss, G., *Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy*. *Cardiovasc Res*, 1998. **39**(1): p. 60-76.
34. Conceicao, G., et al., *Animal models of heart failure with preserved ejection fraction*. *Neth Heart J*, 2016. **24**(4): p. 275-86.
35. Milani-Nejad, N. and P.M. Janssen, *Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages*. *Pharmacol Ther*, 2014. **141**(3): p. 235-49.
36. Bers, D.M., *Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?* *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(4): p. 369-73.
37. Sanbe, A., et al., *Transgenic rabbit model for human troponin I-based hypertrophic cardiomyopathy*. *Circulation*, 2005. **111**(18): p. 2330-8.
38. Fan, J., et al., *Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine*. *Pharmacol Ther*, 2015. **146**: p. 104-19.
39. Gylling, H., *Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia*. *Int J Clin Pract*, 2004. **58**(9): p. 859-66.
40. Futterman, L.G. and L. Lemberg, *Statin pleiotropy: fact or fiction?* *Am J Crit Care*, 2004. **13**(3): p. 244-9.
41. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **41**(3): p. 508-15.
42. Ferrero, M.E., et al., *Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(6): p. 1208-14.
43. Kopp, P., *Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?* *Eur J Endocrinol*, 1998. **138**(6): p. 619-20.
44. Fukuda, S., et al., *Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1*. *Cell Biochem Biophys*, 2006. **44**(1): p. 43-9.
45. Jager, U. and H. Nguyen-Duong, *Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries*. *Arzneimittelforschung*, 1999. **49**(3): p. 207-11.
46. Giovannini, L., et al., *Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. **37**(3): p. 262-70.

47. Hattori, R., et al., *Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H1988-95.
48. Naderali, E.K., P.J. Doyle, and G. Williams, *Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs*. Clin Sci (Lond), 2000. **98**(5): p. 537-43.
49. D'Amico, M., et al., *High glucose induces ventricular instability and increases vasomotor tone in rats*. Diabetologia, 2001. **44**(4): p. 464-70.
50. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
51. Kietzmann, T., A. Samoylenko, and S. Immenschuh, *Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17927-36.
52. Terry, C.M., et al., *Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(3): p. H883-91.
53. Andre, M. and E. Felley-Bosco, *Heme oxygenase-1 induction by endogenous nitric oxide: influence of intracellular glutathione*. FEBS Lett, 2003. **546**(2-3): p. 223-7.
54. Maines, M.D., *Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications*. FASEB J, 1988. **2**(10): p. 2557-68.
55. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 422-8.
56. Siow, R.C., H. Sato, and G.E. Mann, *Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide?* Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 385-94.
57. Melo, L.G., et al., *Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene*. Circulation, 2002. **105**(5): p. 602-7.
58. Ota, S., et al., *Fractionation and some properties of the proteolytically active components of bromelains in the stem and the fruit of the pineapple plant*. J Biochem, 1972. **71**(5): p. 817-30.
59. Yamada, F., N. Takahashi, and T. Murachi, *Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2*. J Biochem, 1976. **79**(6): p. 1223-34.
60. Maurer, H.R., *Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(9): p. 1234-45.
61. Neumayer, C., et al., *Combined enzymatic and antioxidative treatment reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle*. J Surg Res, 2006. **133**(2): p. 150-8.
62. Sebekova, K., et al., *Effect of chronic therapy with proteolytic enzymes on hypertension-induced renal injury in the rat model of Goldblatt hypertension*. Am J Nephrol, 1998. **18**(6): p. 570-6.
63. Nieper, H., *Decrease of the incidence of coronary heart infarct by Mg-and K-orotate and bromelain*. Acta Med Empirica, 1977. **12**: p. 614-618.
64. Webster, K.A., *Aktion in the nucleus*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 856-9.
65. Shiraishi, I., et al., *Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 884-91.
66. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
67. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
68. Preuss, H.G., et al., *Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study*. J Med, 2000. **31**(5-6): p. 227-46.

69. Gupta, S.K., et al., *Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by Withania somnifera: a hemodynamic, biochemical and histopathological assessment*. Mol Cell Biochem, 2004. **260**(1-2): p. 39-47.
70. Zimmer, H.G., *The oxidative pentose phosphate pathway in the heart: regulation, physiological significance, and clinical implications*. Basic Res Cardiol, 1992. **87**(4): p. 303-16.
71. Scarabelli, T.M., et al., *Nutritional supplementation with mixed essential amino acids enhances myocyte survival, preserving mitochondrial functional capacity during ischemia-reperfusion injury*. Am J Cardiol, 2004. **93**(8A): p. 35A-40A.
72. Jensen, R., *Fenugreek, Overlooked but not Forgotten*. 1992: UCLA Lactation Alumni Newsletter.
73. Chopra, R.N., Nayar, S.L. and Chopra, I.C., *Glossary of Indian Medicinal Plants*. 1986: Council of Scientific and Industrial Research.
74. Basch, E., et al., *Therapeutic applications of fenugreek*. Altern Med Rev, 2003. **8**(1): p. 20-7.
75. Antal, J., *Növénytermesztők zsebkönyve*. 2000.
76. Pécsi S., K.G., Kajdi F., Makai S., *Új Óvári-4-es görögszéna fajtajelölt*. Acta Óváriensis, 1989. **31**(5): p. 14-20.
77. Taylor, W.G., et al., *Analysis of Steroidal Sapogenins from Amber Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) by Capillary Gas Chromatography and Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(3): p. 753-759.
78. Rayyan, S., T. Fossen, and O.M. Andersen, *Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, Trigonella foenum-graecum L.* J Agric Food Chem, 2010. **58**(12): p. 7211-7.
79. Krol-Kogus, B., et al., *Application of one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography methodologies for the analysis of C-glycosylflavones from fenugreek seeds*. J Chromatogr A, 2014. **1367**: p. 48-56.
80. Mandegary, A., et al., *Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (Trigonella foenum-graecum L.) with antinociceptive and anti-inflammatory effects*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(7): p. 2503-7.
81. Pereira, A.S.P., et al., *Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Some Common Herbs and Spices: Providing New Insights with Inverse Virtual Screening*. Molecules, 2019. **24**(22).
82. Nagulapalli Venkata, K.C., et al., *A small plant with big benefits: Fenugreek (Trigonella foenum-graecum Linn.) for disease prevention and health promotion*. Mol Nutr Food Res, 2017. **61**(6).
83. Mohammad-Sadeghipour, M., et al., *The Effects of Hydro-Alcoholic Extract of Fenugreek Seeds on the Lipid Profile and Oxidative Stress in Fructose-Fed Rats*. J Obes Metab Syndr, 2020. **29**(3): p. 198-207.
84. Kumar, P., U. Bhandari, and S. Jamadagni, *Fenugreek seed extract inhibit fat accumulation and ameliorates dyslipidemia in high fat diet-induced obese rats*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 606021.
85. Handa, T., et al., *Effects of fenugreek seed extract in obese mice fed a high-fat diet*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005. **69**(6): p. 1186-8.
86. Chevassus, H., et al., *A fenugreek seed extract selectively reduces spontaneous fat intake in overweight subjects*. Eur J Clin Pharmacol, 2010. **66**(5): p. 449-55.
87. Bordia, A., S.K. Verma, and K.C. Srivastava, *Effect of ginger (Zingiber officinale Rosc.) and fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **56**(5): p. 379-84.
88. Gong, J., et al., *Effect of fenugreek on hyperglycaemia and hyperlipidemia in diabetes and prediabetes: A meta-analysis*. J Ethnopharmacol, 2016. **194**: p. 260-268.

89. Heshmat-Ghahdarjani, K., et al., *Effect of fenugreek consumption on serum lipid profile: A systematic review and meta-analysis*. *Phytother Res*, 2020. **34**(9): p. 2230-2245.
90. Roberts, K.T., *The potential of fenugreek (Trigonella foenum-graecum) as a functional food and nutraceutical and its effects on glycemia and lipidemia*. *J Med Food*, 2011. **14**(12): p. 1485-9.
91. Uemura, T., et al., *Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXRalpha activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice*. *J Nutr*, 2011. **141**(1): p. 17-23.
92. Vijayakumar, M.V., et al., *The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(1): p. 41-8.
93. Jin, Y., et al., *Fenugreek Prevents the Development of STZ-Induced Diabetic Nephropathy in a Rat Model of Diabetes*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014. **2014**: p. 259368.
94. Ghallas, L., et al., *Some complementary hypoglycemic supplements from grains and legumes for the management of type 2 diabetes mellitus*. *J. Med. Sci*, 2008. **8**: p. 102-110.
95. Rafraf, M., et al., *Effect of Fenugreek Seeds on Serum Metabolic Factors and Adiponectin Levels in Type 2 Diabetic Patients*. *Int J Vitam Nutr Res*, 2014. **84**(3-4): p. 196-205.
96. Khodamoradi, K., et al., *The Effects of Fenugreek on Cardiometabolic Risk Factors in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Complement Ther Med*, 2020. **52**: p. 102416.
97. Neelakantan, N., et al., *Effect of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) intake on glycemia: a meta-analysis of clinical trials*. *Nutr J*, 2014. **13**: p. 7.
98. Ravikumar, P. and C.V. Anuradha, *Effect of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats*. *Phytother Res*, 1999. **13**(3): p. 197-201.
99. Sauvaire, Y., et al., *4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion*. *Diabetes*, 1998. **47**(2): p. 206-10.
100. Gupta, A., R. Gupta, and B. Lal, *Effect of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study*. *J Assoc Physicians India*, 2001. **49**: p. 1057-61.
101. Kalailingam, P., et al., *Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats*. *Phytomedicine*, 2014. **21**(10): p. 1154-61.
102. Hannan, J.M., et al., *Soluble dietary fibre fraction of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action*. *Br J Nutr*, 2007. **97**(3): p. 514-21.
103. Srichamroen, A., et al., *In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (Trigonella foenum graecum L) in genetically lean and obese rats*. *Nutr Res*, 2009. **29**(1): p. 49-54.
104. Baquer, N.Z., et al., *Metabolic and molecular action of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) and trace metals in experimental diabetic tissues*. *J Biosci*, 2011. **36**(2): p. 383-96.
105. Annida, B. and P. Stanely Mainzen Prince, *Supplementation of fenugreek leaves reduces oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Med Food*, 2005. **8**(3): p. 382-5.
106. Kaviarasan, S., K. Vijayalakshmi, and C.V. Anuradha, *Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage*. *Plant Foods Hum Nutr*, 2004. **59**(4): p. 143-7.

107. Dixit, P., et al., *Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds*. *Phytother Res*, 2005. **19**(11): p. 977-83.
108. Madhava Naidu, M., et al., *Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds*. *LWT - Food Science and Technology*, 2011. **44**(2): p. 451-456.
109. Suresh, P., et al., *Effect of ethanol extract of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) seeds on Freund's adjuvant-induced arthritis in albino rats*. *Inflammation*, 2012. **35**(4): p. 1314-21.
110. Maurya, C.K., et al., *4-Hydroxyisoleucine ameliorates fatty acid-induced insulin resistance and inflammatory response in skeletal muscle cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **395**(1-2): p. 51-60.
111. Vyas, S., et al., *Analgesic and anti-inflammatory activities of Trigonella foenum-graecum (seed) extract*. *Acta Pol Pharm*, 2008. **65**(4): p. 473-6.
112. Shabbeer, S., et al., *Fenugreek: a naturally occurring edible spice as an anticancer agent*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(3): p. 272-8.
113. Al-Daghri, N.M., et al., *Fenugreek extract as an inducer of cellular death via autophagy in human T lymphoma Jurkat cells*. *BMC Complement Altern Med*, 2012. **12**: p. 202.
114. Alsemari, A., et al., *The selective cytotoxic anti-cancer properties and proteomic analysis of Trigonella Foenum-Graecum*. *BMC Complement Altern Med*, 2014. **14**: p. 114.
115. Khalil, M.I., et al., *Trigonella foenum (Fenugreek) Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Line, HepG2, Mediated by Upregulation of p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 914645.
116. Chen, P.S., et al., *Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20164.
117. Devasena, T. and V.P. Menon, *Fenugreek affects the activity of beta-glucuronidase and mucinase in the colon*. *Phytother Res*, 2003. **17**(9): p. 1088-91.
118. Raju, J., et al., *Diosgenin, a steroid saponin of Trigonella foenum graecum (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(8): p. 1392-8.
119. Chatterjee, S., M. Kumar, and A. Kumar, *Chemomodulatory Effect of Trigonella foenum graecum (L.) Seed Extract on Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis*. *Toxicol Int*, 2012. **19**(3): p. 287-94.
120. Ali, F., et al., *Assessment of Augmented Immune Surveillance and Tumor Cell Death by Cytoplasmic Stabilization of p53 as a Chemopreventive Strategy of 3 Promising Medicinal Herbs in Murine 2-Stage Skin Carcinogenesis*. *Integr Cancer Ther*, 2014. **13**(4): p. 351-67.
121. Srinivasan, S., et al., *Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(4): p. 961-7.
122. Das, S., et al., *Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46641.
123. Wu, F.C. and J.G. Jiang, *Effects of diosgenin and its derivatives on atherosclerosis*. *Food Funct*, 2019. **10**(11): p. 7022-7036.
124. Chen, Y., et al., *Diosgenin regulates adipokine expression in perivascular adipose tissue and ameliorates endothelial dysfunction via regulation of AMPK*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016. **155**(Pt A): p. 155-65.
125. Ahmed, L.A., et al., *Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **740**: p. 379-87.

126. Roghani-Dehkordi, F., M. Roghani, and T. Baluchnejadmojarad, *Diosgenin Mitigates Streptozotocin Diabetes-induced Vascular Dysfunction of the Rat Aorta: The Involved Mechanisms*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **66**(6): p. 584-92.
127. Manivannan, J., et al., *Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats*. Mol Cell Biochem, 2013. **378**(1-2): p. 9-18.
128. Binesh, A., S.N. Devaraj, and H. Devaraj, *Inhibition of nuclear translocation of notch intracellular domain (NICD) by diosgenin prevented atherosclerotic disease progression*. Biochimie, 2018. **148**: p. 63-71.
129. Esfandiarei, M., et al., *Diosgenin modulates vascular smooth muscle cell function by regulating cell viability, migration, and calcium homeostasis*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **336**(3): p. 925-39.
130. Manivannan, J., et al., *Diosgenin interferes coronary vasoconstriction and inhibits osteochondrogenic transdifferentiation of aortic VSMC in CRF rats*. Biochimie, 2014. **102**: p. 183-7.
131. Gong, G., Y. Qin, and W. Huang, *Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from Dioscorea zingiberensis C.H. Wright in vitro and in vivo*. Phytomedicine, 2011. **18**(6): p. 458-63.
132. Taj Eldin, I.M., M.M. Abdalmutalab, and H.E. Bikir, *An in vitro anticoagulant effect of Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) in blood samples of normal Sudanese individuals*. Sudan J Paediatr, 2013. **13**(2): p. 52-6.
133. Pandian, R.S., C.V. Anuradha, and P. Viswanathan, *Gastroprotective effect of fenugreek seeds (Trigonella foenum graecum) on experimental gastric ulcer in rats*. J Ethnopharmacol, 2002. **81**(3): p. 393-7.
134. Reddy, R.L. and K. Srinivasan, *Fenugreek seeds reduce atherogenic diet-induced cholesterol gallstone formation in experimental mice*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(11): p. 933-43.
135. Reddy, R.R. and K. Srinivasan, *Effect of dietary fenugreek seeds on biliary proteins that influence nucleation of cholesterol crystals in bile*. Steroids, 2011. **76**(5): p. 455-63.
136. Kaviarasan, S. and C.V. Anuradha, *Fenugreek (Trigonella foenum graecum) seed polyphenols protect liver from alcohol toxicity: a role on hepatic detoxification system and apoptosis*. Pharmazie, 2007. **62**(4): p. 299-304.
137. Szabo, M.E., et al., *Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3727-32.
138. Bak, I., et al., *Evaluation of systemic and dermal toxicity and dermal photoprotection by sour cherry kernels*. Phytother Res, 2011. **25**(11): p. 1714-20.
139. Bartekova, M., et al., *Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia*. Can J Physiol Pharmacol, 2010. **88**(4): p. 465-71.
140. Raafat, K., N. El-Darra, and F.A. Saleh, *Gastroprotective and anti-inflammatory effects of Prunus cerasus phytochemicals and their possible mechanisms of action*. J Tradit Complement Med, 2020. **10**(4): p. 345-353.
141. Mahmoud, F., et al., *Sour cherry (Prunus cerasus) seed extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases proinflammatory signaling in peripheral blood human leukocytes from rheumatoid arthritis patients*. Int Immunopharmacol, 2014. **20**(1): p. 188-96.
142. Mahmoud, F.F., et al., *Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3+ TNF-alpha+ and CD3+IL-8+ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients*. Phytother Res, 2013. **27**(5): p. 767-74.
143. Saleh, F.A., N. El-Darra, and K. Raafat, *Hypoglycemic effects of Prunus cerasus L. pulp and seed extracts on Alloxan-Induced Diabetic Mice with histopathological evaluation*. Biomed Pharmacother, 2017. **88**: p. 870-877.

144. Piccolella, S., et al., *Antioxidant properties of sour cherries (Prunus cerasus L.): role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(6): p. 1928-35.
145. Blando, F., C. Gerardi, and I. Nicoletti, *Sour Cherry (Prunus cerasus L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(5): p. 253-258.
146. Mahmoud, F.F., et al., *Sour cherry seed kernel extract increases heme oxygenase-1 expression and decreases representation of CD3+ TNF-alpha+ and CD3+IL-8+ subpopulations in peripheral blood leukocyte cultures from type 2 diabetes patients*. Phytother Res. **27**(5): p. 767-74.
147. 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.
148. Hanelt, P., R. Buttner, and R. Mansfeld, *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops (except Ornamentals)*. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops (except Ornamentals). 2001.
149. *Risk of mix-up with bear's garlic*. 2005, Bundesinstitut für Risikobewertung.
150. Galland-Decker, C., et al., *Progressive Organ Failure After Ingestion of Wild Garlic Juice*. J Emerg Med, 2016. **50**(1): p. 55-60.
151. Oszmianski, J., J. Kolniak-Ostek, and A. Wojdylo, *Characterization and content of flavonol derivatives of Allium ursinum L. plant*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(1): p. 176-84.
152. Sabha, D., et al., *Allium ursinum L.: bioassay-guided isolation and identification of a galactolipid and a phytosterol exerting antiaggregatory effects*. Pharmacology, 2012. **89**(5-6): p. 260-9.
153. Yoo, K.S. and L.M. Pike, *Determination of flavor precursor compound S-alk (en) yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in Allium species*. Scientia Horticulturae, 1998. **75**(1-2): p. 1-10.
154. Djurdjevic, L., et al., *Allelopathic potential of Allium ursinum L*. Biochemical Systematics and Ecology, 2004. **32**(6): p. 533-544.
155. Gitin, L., R. Dinica, and R. Parnavel, *The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in Romanian Allium spp. leaves*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2012. **40**(1): p. 93-97.
156. Gođevac, D., et al., *Evaluation of antioxidant capacity of Allium ursinum L. volatile oil and its effect on membrane fluidity*. Food chemistry, 2008. **107**(4): p. 1692-1700.
157. Sendl, A., et al., *Comparative pharmacological investigations of Allium ursinum and Allium sativum*. Planta Med, 1992. **58**(1): p. 1-7.
158. Lekli, I., et al., *Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: the role of GLUT-4 and endothelin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H859-66.
159. Hiyasat, B., et al., *Antiplatelet activity of Allium ursinum and Allium sativum*. Pharmacology, 2009. **83**(4): p. 197-204.
160. Preuss, H.G., et al., *Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats*. Int Urol Nephrol, 2001. **32**(4): p. 525-30.
161. Stajner, D., et al., *Antioxidant and scavenger activities of Allium ursinum*. Fitoterapia, 2008. **79**(4): p. 303-5.
162. Reuter, H.D., *Allium sativum and Allium ursinum: Part 2 pharmacology and medicinal application*. Phytomedicine, 1995. **2**(1): p. 73-91.
163. Mohamadi, A., et al., *Effects of wild versus cultivated garlic on blood pressure and other parameters in hypertensive rats*. Heart Dis, 2000. **2**(1): p. 3-9.
164. Rietz, B., et al., *Cardioprotective actions of wild garlic (allium ursinum) in ischemia and reperfusion*. Mol Cell Biochem, 1993. **119**(1-2): p. 143-50.
165. Halpern, G.M., *Anti-inflammatory effects of a stabilized lipid extract of Perna canaliculus (Lyprinol)*. Allerg Immunol (Paris), 2000. **32**(7): p. 272-8.

166. Rubin, L.J., *Primary pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1997. **336**(2): p. 111-7.
167. Mocerri, P., et al., *Imaging in pulmonary hypertension: Focus on the role of echocardiography*. Arch Cardiovasc Dis, 2014. **107**(4): p. 261-71.
168. Vonk Noordegraaf, A. and N. Galie, *The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(122): p. 243-53.
169. Pristera, N., et al., *The Role of Echocardiography in the Evaluation of Pulmonary Arterial Hypertension*. Echocardiography, 2016. **33**(1): p. 105-16.
170. Montani, D., et al., *Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Eur Heart J, 2010. **31**(15): p. 1898-907.
171. Pepke-Zaba, J. and N.W. Morrell, *The endothelin system and its role in pulmonary arterial hypertension (PAH)*. Thorax, 2005. **60**(6): p. 443-4.
172. Klinger, J.R., *The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension*. Clin Chest Med, 2007. **28**(1): p. 143-67, ix.
173. Mitchell, J.A., et al., *Role of prostacyclin in pulmonary hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(4): p. 382-93.
174. Giaid, A. and D. Saleh, *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1995. **333**(4): p. 214-21.
175. Morris, C.R., et al., *Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease*. JAMA, 2005. **294**(1): p. 81-90.
176. Chester, A.H. and M.H. Yacoub, *The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(2): p. 62-78.
177. Tuder, R.M., et al., *Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(6): p. 1925-32.
178. Swaminathan, A.C., A.C. Dusek, and T.J. McMahon, *Treatment-related biomarkers in pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **52**(6): p. 663-73.
179. Rubens, C., et al., *Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension*. Chest, 2001. **120**(5): p. 1562-9.
180. Vandeput, F., et al., *cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **330**(3): p. 884-91.
181. Galie, N., et al., *Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2148-57.
182. Kukreja, R.C., *Sildenafil and cardioprotection*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(39): p. 6842-7.
183. Vorhies, E.E. and D.D. Ivy, *Drug treatment of pulmonary hypertension in children*. Paediatr Drugs, 2014. **16**(1): p. 43-65.
184. Gehrig, S.M., et al., *Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 394-8.
185. Sapra, G., et al., *The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5705.
186. Nascimento, T.L., M.T. Silva, and E.H. Miyabara, *BGP-15 improves contractile function of regenerating soleus muscle*. J Muscle Res Cell Motil, 2018. **39**(1-2): p. 25-34.
187. Literati-Nagy, B., et al., *Improvement of insulin sensitivity by a novel drug candidate, BGP-15, in different animal studies*. Metab Syndr Relat Disord, 2014. **12**(2): p. 125-31.
188. Salah, H., et al., *The chaperone co-inducer BGP-15 alleviates ventilation-induced diaphragm dysfunction*. Sci Transl Med, 2016. **8**(350): p. 350ra103.
189. Thirunavukkarasu, M., et al., *Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 720-9.

190. Penumathsa, S.V., et al., *Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(3): p. 508-16.
191. Juhasz, B., et al., *Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1365-70.
192. Thirunavukkarasu, M., et al., *Niacin-bound chromium enhances myocardial protection from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H820-6.
193. Juhasz, B., et al., *Cardioprotective effects of sour cherry seed extract (SCSE) on the hypercholesterolemic rabbit heart*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(39): p. 6896-905.
194. Bombicz, M., et al., *Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophyllisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
195. Karasu-Minareci, E., et al., *Acute effects of vardenafil on pulmonary artery responsiveness in pulmonary hypertension*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 718279.
196. Bombicz, M., et al., *A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Allium ursinum Liophyllisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
197. Szabo, K., et al., *Fenugreek (Trigonella Foenum-Graecum) Seed Flour and Diosgenin Preserve Endothelium-Dependent Arterial Relaxation in a Rat Model of Early-Stage Metabolic Syndrome*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
198. Bombicz, M., et al., *The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy*. Molecules, 2019. **24**(3).
199. Maj, D., et al., *The effect of crossing New Zealand White with Californian rabbits on growth and slaughter traits*. Archives Animal Breeding, 2009. **52**(2): p. 205-211.
200. Priksz, D., et al., *Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
201. Varga, B., et al., *Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model*. J Mol Neurosci, 2013. **50**(3): p. 558-70.
202. Kovacs, A., et al., *Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **310**(11): p. H1671-82.
203. Kovacs, D., et al., *Identification of PPARgamma ligands with One-dimensional Drug Profile Matching*. Drug Des Devel Ther, 2013. **7**: p. 917-28.
204. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
205. Penumathsa, S.V., et al., *Secoisolariciresinol diglucoside: relevance to angiogenesis and cardioprotection against ischemia-reperfusion injury*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(2): p. 951-9.
206. Sasaki, H., N. Galang, and N. Maulik, *Redox regulation of NF-kappaB and AP-1 in ischemic reperfused heart*. Antioxid Redox Signal, 1999. **1**(3): p. 317-24.
207. Engelman, D.T., et al., *Hypoxic preconditioning preserves antioxidant reserve in the working rat heart*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(1): p. 133-40.
208. Das, S., et al., *Tocotrienols confer resistance to ischemia in hypercholesterolemic hearts: insight with genomics*. Mol Cell Biochem, 2012. **360**(1-2): p. 35-45.
209. Neely, J.R., et al., *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart*. Am J Physiol, 1967. **212**(4): p. 804-14.

210. Juhasz, B., et al., *Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma?* Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(2): p. 325-33.
211. Gesztelyi, R., et al., *The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology.* Archive for history of exact sciences, 2012. **66**(4): p. 427-438.
212. Schultz, J.E., et al., *Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart.* Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2607-15.
213. Hochhauser, E., et al., *Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2351-9.
214. Dickson, E.W., et al., *Naloxone blocks transferred preconditioning in isolated rabbit hearts.* J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1751-6.
215. Csonka, C., et al., *Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2010. **61**(2): p. 163-70.
216. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits.* J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(2): p. 453-8.
217. Tang, J., et al., *Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion.* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(2): p. 353-61.
218. Porvasnik, S.L., et al., *PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats.* J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(2): p. 364-72.
219. Kaga, S., et al., *Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor.* J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 813-22.
220. van Gilst, W.H., et al., *Reduction of reperfusion arrhythmias in the ischemic isolated rat heart by angiotensin converting enzyme inhibitors: a comparison of captopril, enalapril, and HOE 498.* J Cardiovasc Pharmacol, 1986. **8**(4): p. 722-8.
221. Baron, A.D. and M.G. Clark, *Role of blood flow in the regulation of muscle glucose uptake.* Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 487-99.
222. Evans, J.L., B.A. Maddux, and I.D. Goldfine, *The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 1040-52.
223. Kim, J.A., et al., *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms.* Circulation, 2006. **113**(15): p. 1888-904.
224. Abraham, N.G., et al., *Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2468-77.
225. Holmgren, A., *Thioredoxin.* Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 237-71.
226. Luthman, M. and A. Holmgren, *Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization.* Biochemistry, 1982. **21**(26): p. 6628-33.
227. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi, *Redox regulation of cellular activation.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 351-69.
228. Bertini, R., et al., *Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1783-9.
229. Hotta, M., et al., *Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes.* J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1445-51.
230. Quan, S., et al., *Heme oxygenase-1 prevents superoxide anion-associated endothelial cell sloughing in diabetic rats.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 509-16.
231. Liu, X., et al., *Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice.* Diabetes, 2005. **54**(3): p. 778-84.

232. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
233. Akamatsu, Y., et al., *Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 771-2.
234. Shen, X., et al., *Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 798-805.
235. Ziche, M., et al., *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 2036-44.
236. Jozkowicz, A., et al., *Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(4): p. 773-83.
237. Nor, J.E., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 375-84.
238. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
239. Nunnari, J.J., et al., *Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats*. Exp Mol Pathol, 1989. **51**(1): p. 1-8.
240. Schuschke, D.A., I.G. Joshua, and F.N. Miller, *Comparison of early microcirculatory and aortic changes in hypercholesterolemic rats*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(1): p. 154-60.
241. Rodriguez-Porcel, M., et al., *Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 608-15.
242. Skaletz-Rorowski, A. and K. Walsh, *Statin therapy and angiogenesis*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(6): p. 599-603.
243. Urbich, C., et al., *Double-edged role of statins in angiogenesis signaling*. Circ Res, 2002. **90**(6): p. 737-44.
244. Di Napoli, P., et al., *Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(2): p. 283-93.
245. Poussier, B., et al., *Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis*. J Vasc Surg, 2005. **42**(6): p. 1190-7.
246. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
247. Juhaszova, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1535-49.
248. Costa, A.D., et al., *Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria*. Circ Res, 2005. **97**(4): p. 329-36.
249. Klinge, C.M., et al., *Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7460-8.
250. Pozo-Guisado, E., M.J. Lorenzo-Benayas, and P.M. Fernandez-Salguero, *Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation*. Int J Cancer, 2004. **109**(2): p. 167-73.
251. Bertelli, A.A., et al., *Antiplatelet activity of cis-resveratrol*. Drugs Exp Clin Res, 1996. **22**(2): p. 61-3.
252. Bianchini, F. and H. Vainio, *Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?* Eur J Cancer Prev, 2003. **12**(5): p. 417-25.

253. Lin, M.T., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(5): p. 1029-36.
254. Khanna, S., et al., *Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(1): p. 38-42.
255. Anversa, P., et al., *Apoptosis and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 3**: p. 8-12.
256. Cittadini, A., et al., *Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling*. Gene Ther, 2006. **13**(1): p. 8-19.
257. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
258. Anderson, M.J., et al., *Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily*. Genomics, 1998. **47**(2): p. 187-99.
259. Accili, D. and K.C. Arden, *FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation*. Cell, 2004. **117**(4): p. 421-6.
260. Skurk, C., et al., *The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1513-25.
261. Van Der Heide, L.P., M.F. Hoekman, and M.P. Smidt, *The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 297-309.
262. Mertz, W., *Chromium research from a distance: from 1959 to 1980*. J Am Coll Nutr, 1998. **17**(6): p. 544-7.
263. Mohanty, I., et al., *Mechanisms of cardioprotective effect of Withania somnifera in experimentally induced myocardial infarction*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004. **94**(4): p. 184-90.
264. Hutter, J.J., et al., *Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1408-11.
265. Radford, N.B., et al., *Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2339-42.
266. Llesuy, S.F. and M.L. Tomaro, *Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1223**(1): p. 9-14.
267. Balla, G., et al., *Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18148-53.
268. 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.
269. Pasini, E., et al., *Effect of amino acid mixture on the isolated ischemic heart*. Am J Cardiol, 2004. **93**(8A): p. 30A-34A.
270. Szabo, G., et al., *L-arginine: effect on reperfusion injury after heart transplantation*. World J Surg, 1998. **22**(8): p. 791-7; discussion 797-8.
271. Ong, W.Y., et al., *Increased iron staining in the cerebral cortex of cholesterol fed rabbits*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(4): p. 305-13.
272. Ravingerova, T., et al., *Changes in PPAR gene expression and myocardial tolerance to ischaemia: relevance to pleiotropic effects of statins*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(12): p. 1028-36.
273. Benn, M., et al., *Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(11): p. 3956-64.
274. Le Grand, B., et al., *Increased resistance to ischaemic injury in the isolated perfused atherosclerotic heart of the cholesterol-fed rabbit*. Cardiovasc Res, 1995. **30**(5): p. 689-96.

275. Rubinstein, J., et al., *Hypercholesterolemia and myocardial function evaluated via tissue doppler imaging*. Cardiovasc Ultrasound, 2009. **7**: p. 56.
276. Li, T., et al., *Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 996-1006.
277. Amo, Y., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS)*. Arch Dermatol Res, 2001. **293**(6): p. 296-301.
278. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
279. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors*. Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1672-6.
280. Rybak, M.E., E.M. Calvey, and J.M. Harnly, *Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 682-7.
281. Ariga, T. and T. Seki, *Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review*. Biofactors, 2006. **26**(2): p. 93-103.
282. Salman, H., et al., *Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses*. Int J Immunopharmacol, 1999. **21**(9): p. 589-97.
283. Tribouilloy, C., et al., *Survival implication of left ventricular end-systolic diameter in mitral regurgitation due to flail leaflets a long-term follow-up multicenter study*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(21): p. 1961-8.
284. Carluccio, E., et al., *Fibrosis assessment by integrated backscatter and its relationship with longitudinal deformation and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction*. Int J Cardiovasc Imaging, 2016. **32**(7): p. 1071-80.
285. Csepanyi, E., et al., *Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model*. Pharmacol Res, 2015. **100**: p. 148-56.
286. 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.
287. Haines, D.D., et al., *Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(1): p. 37-44.
288. Isoyama, S., et al., *Effects of afterload reduction on global left ventricular and regional myocardial functions in the isolated canine heart with stenosis of a coronary arterial branch*. Circulation, 1983. **67**(1): p. 139-47.
289. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
290. Maslov, L.N., et al., *[Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion]*. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova, 2015. **101**(1): p. 3-24.
291. Mao, G.D., et al., *Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 416-20.
292. Bagatini, M.D., et al., *Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction*. Heart Vessels, 2011. **26**(1): p. 55-63.
293. Cohen, E., et al., *Human carotid atherosclerotic plaque protein(s) change HDL protein(s) composition and impair HDL anti-oxidant activity*. Biofactors, 2016. **42**(1): p. 115-28.
294. Kim, E.J., et al., *Cholesterol-induced non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis aggravated by systemic inflammation*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e97841.
295. Savai, R., et al., *Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1289-300.

296. Thibault, H.B., et al., *Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010. **3**(2): p. 157-63.
297. Nogueira-Ferreira, R., et al., *Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015. **35**: p. 8-16.
298. Ryan, J.J., G. Marsboom, and S.L. Archer, *Rodent models of group 1 pulmonary hypertension*. *Handb Exp Pharmacol*, 2013. **218**: p. 105-49.
299. Gomez-Arroyo, J.G., et al., *The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **302**(4): p. L363-9.
300. Gan, C., et al., *Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(4): p. H1528-33.
301. Bae, H.K., et al., *The effect of sildenafil on right ventricular remodeling in a rat model of monocrotaline-induced right ventricular failure*. *Korean J Pediatr*, 2016. **59**(6): p. 262-70.
302. Yoshiyuki, R., et al., *Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. *Exp Anim*, 2016. **65**(3): p. 215-22.
303. Jasinska-Stroschein, M., et al., *The beneficial impact of fasudil and sildenafil on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: a hemodynamic and biochemical study*. *Pharmacology*, 2013. **91**(3-4): p. 178-84.
304. Itter, G., et al., *The isolated working heart model in infarcted rat hearts*. *Lab Anim*, 2005. **39**(2): p. 178-93.
305. Buyukakilli, B., et al., *Determination of the effects of pulmonary arterial hypertension and therapy on the cardiovascular system of rats by impedance cardiography*. *Croat Med J*, 2014. **55**(5): p. 498-506.
306. Shah, S.J., et al., *Association of serum creatinine with abnormal hemodynamics and mortality in pulmonary arterial hypertension*. *Circulation*, 2008. **117**(19): p. 2475-83.
307. Lee, M.Y., et al., *Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 31788.
308. Huang, T.H., et al., *Effect of early administration of lower dose versus high dose of fresh mitochondria on reducing monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rat*. *Am J Transl Res*, 2016. **8**(12): p. 5151-5168.
309. Lewis, G.D., et al., *Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension*. *Circulation*, 2007. **116**(14): p. 1555-62.
310. Elias-Al-Mamun, M., et al., *Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats*. *Circ J*, 2014. **78**(4): p. 967-76.
311. Kuang, T., et al., *Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010. **23**(5): p. 456-64.
312. Nagendran, J., et al., *Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility*. *Circulation*, 2007. **116**(3): p. 238-48.
313. Kass, D.A., H.C. Champion, and J.A. Beavo, *Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation*. *Circ Res*, 2007. **101**(11): p. 1084-95.
314. Hanson, K.A., et al., *Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5): p. L931-41.
315. Lochhead, A., et al., *The regulation of the cGMP-binding cGMP phosphodiesterase by proteins that are immunologically related to gamma subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(29): p. 18397-403.

316. Corbin, J.D., et al., *High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(3): p. 930-8.
317. Vaidya, B., et al., *Advances in treatment of pulmonary arterial hypertension: patent review*. *Expert Opin Ther Pat*, 2017. **27**(8): p. 907-918.
318. Ahmed, M., et al., *Effects of novel muscarinic M3 receptor ligand C1213 in pulmonary arterial hypertension models*. *Physiol Rep*, 2016. **4**(24).
319. Leopold, J.A. and B.A. Maron, *Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(5).
320. Ankri, S. and D. Mirelman, *Antimicrobial properties of allicin from garlic*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(2): p. 125-9.
321. Sendl, A., et al., *Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic*. *Atherosclerosis*, 1992. **94**(1): p. 79-85.
322. Farkas, A., et al., *Variation in nectar volume and sugar concentration of *Allium ursinum* L. ssp. *ucrainicum* in three habitats*. *ScientificWorldJournal*, 2012. **2012**: p. 138579.
323. Buchwalow, I.B., et al., *An in situ evidence for autocrine function of NO in the vasculature*. *Nitric Oxide*, 2004. **10**(4): p. 203-12.
324. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1411**(2-3): p. 334-50.
325. Fukumura, D., et al., *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2604-9.
326. Lei, J., et al., *Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system*. *Nitric Oxide*, 2013. **35**: p. 175-85.
327. Guber, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpressing human early outgrowth cells inhibit coronary artery smooth muscle cell migration through paracrine functions*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 877.
328. Lubos, E., D.E. Handy, and J. Loscalzo, *Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 5323-44.
329. Roe, N.D. and J. Ren, *Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases*. *Vascul Pharmacol*, 2012. **57**(5-6): p. 168-72.
330. Luo, S., et al., *Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(22): p. 3548-53.
331. Karbach, S., et al., *eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(22): p. 3579-94.
332. Dalle-Donne, I., et al., *Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans*. *Trends Biochem Sci*, 2009. **34**(2): p. 85-96.
333. Lapenna, D., et al., *Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques*. *Circulation*, 1998. **97**(19): p. 1930-4.
334. Tharahaswari, M., et al., *Trigonelline and diosgenin attenuate ER stress, oxidative stress-mediated damage in pancreas and enhance adipose tissue PPARgamma activity in type 2 diabetic rats*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **396**(1-2): p. 161-74.
335. Saravanan, G., et al., *Modulatory effects of diosgenin on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism and glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Can J Diabetes*, 2014. **38**(6): p. 409-14.
336. Uemura, T., et al., *Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues*. *Mol Nutr Food Res*, 2010. **54**(11): p. 1596-608.
337. Sangeetha, M.K., et al., *PPAR's and Diosgenin a chemico biological insight in NIDDM*. *Chem Biol Interact*, 2013. **206**(2): p. 403-10.
338. Liu, K., et al., *Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKKbeta and IRS-1 pathways*. *Atherosclerosis*, 2012. **223**(2): p. 350-8.

339. Broca, C., et al., *4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties*. Am J Physiol, 1999. **277**(4): p. E617-23.
340. Broca, C., et al., *4-Hydroxyisoleucine: effects of synthetic and natural analogues on insulin secretion*. Eur J Pharmacol, 2000. **390**(3): p. 339-45.
341. Broca, C., et al., *Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(3): p. E463-71.
342. Jaiswal, N., et al., *4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway*. Eur J Nutr, 2012. **51**(7): p. 893-8.
343. Yu, H., et al., *[Effect of Trigonella foenum-graecum 4-hydroxyisoleucine on high-glucose induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes of mice]*. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2013. **33**(10): p. 1394-9.
344. Gao, F., et al., *4-Hydroxyisoleucine ameliorates an insulin resistant-like state in 3T3-L1 adipocytes by regulating TACE/TIMP3 expression*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5727-36.
345. Eastwood, M. and D. Kritchevsky, *Dietary fiber: how did we get where we are?* Annu Rev Nutr, 2005. **25**: p. 1-8.
346. Choi, K.W., et al., *Inhibition of TNF-alpha-induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF-kappaB signaling pathways*. Vascul Pharmacol, 2010. **53**(5-6): p. 273-80.
347. Drolet, M.C., et al., *Early endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits: a non-invasive in vivo ultrasound study*. Cardiovasc Ultrasound, 2004. **2**: p. 10.
348. Garcia-Prieto, C.F., et al., *High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(3): p. 520-32.
349. Chinen, I., et al., *Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 160-5.
350. Li, H., et al., *Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor-kappaB pathway in rat aorta*. Int J Cardiol, 2011. **152**(2): p. 218-24.
351. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
352. Bertolucci, M.C., et al., *Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type I diabetes*. World J Diabetes, 2015. **6**(5): p. 679-92.
353. Vazquez-Rey, E. and J.C. Kaski, *[Cardiovascular syndrome X and endothelial dysfunction]*. Rev Esp Cardiol, 2003. **56**(2): p. 181-92.
354. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
355. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
356. Buchwalow, I.B., et al., *The role of arterial smooth muscle in vasorelaxation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 504-507.
357. Azevedo, L.C., et al., *Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 436-45.
358. Bugger, H. and E.D. Abel, *Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy*. Diabetologia, 2014. **57**(4): p. 660-71.
359. Gkogkolou, P. and M. Bohm, *Advanced glycation end products: Key players in skin aging?* Dermatoendocrinol, 2012. **4**(3): p. 259-70.

360. Bidasee, K.R., et al., *Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. *Diabetes*, 2004. **53**(2): p. 463-73.
361. Radovits, T., et al., *An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction*. *J Diabetes Res*, 2015. **2015**: p. 728741.
362. El-Omar, M.M., et al., *Cardiac dysfunction in the Goto-Kakizaki rat. A model of type II diabetes mellitus*. *Basic Res Cardiol*, 2004. **99**(2): p. 133-41.
363. Kuwabara, W.M.T., et al., *Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus?* *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0189622.
364. Sourij, H., R. Zweiker, and T.C. Wascher, *Effects of pioglitazone on endothelial function, insulin sensitivity, and glucose control in subjects with coronary artery disease and new-onset type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(5): p. 1039-45.
365. Hadi, H.A. and J.A. Suwaidi, *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. **3**(6): p. 853-76.
366. Wen, Y., et al., *Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 2002. **4**(5): p. 305-8.
367. Akash, M.S., K. Rehman, and S. Chen, *Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus*. *Curr Diabetes Rev*, 2013. **9**(5): p. 387-96.
368. Derosa, G., *Efficacy and tolerability of pioglitazone in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison with other oral antihyperglycaemic agents*. *Drugs*, 2010. **70**(15): p. 1945-61.
369. Hallakou, S., et al., *Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat*. *Diabetes*, 1997. **46**(9): p. 1393-9.
370. Fontaine, K.R., et al., *Years of life lost due to obesity*. *JAMA*, 2003. **289**(2): p. 187-93.
371. Chawla, S., et al., *Effect of addition of either sitagliptin or pioglitazone in patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus on metformin: A randomized controlled trial*. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013. **4**(1): p. 27-32.
372. Liao, H.W., et al., *Pioglitazone and cardiovascular outcomes in patients with insulin resistance, pre-diabetes and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. *BMJ Open*, 2017. **7**(1): p. e013927.
373. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2016. **29**(4): p. 277-314.
374. Oh, T.J., et al., *Effect of the combination of metformin and fenofibrate on glucose homeostasis in diabetic Goto-Kakizaki rats*. *Exp Mol Med*, 2013. **45**: p. e30.
375. Portha, B., et al., *The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes?* *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **297**(1-2): p. 73-85.
376. Yoshida, T., et al., *Metformin primarily decreases plasma glucose not by gluconeogenesis suppression but by activating glucose utilization in a non-obese type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **623**(1-3): p. 141-7.
377. Miki, T., et al., *Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features*. *Heart Fail Rev*, 2013. **18**(2): p. 149-66.
378. Park, J.H. and T.H. Marwick, *Use and Limitations of E/e' to Assess Left Ventricular Filling Pressure by Echocardiography*. *J Cardiovasc Ultrasound*, 2011. **19**(4): p. 169-73.
379. Colyer, J., *Phosphorylation states of phospholamban*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **853**: p. 79-91.
380. Ramirez-Correa, G.A. and A.M. Murphy, *Is phospholamban or troponin I the "prima donna" in beta-adrenergic induced lusitropy?* *Circ Res*, 2007. **101**(4): p. 326-7.

381. Lampe, N., et al., *Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
382. Priksz, D., et al., *Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy*. Br J Pharmacol, 2022. **179**(10): p. 2240-2258.
383. Kozma, M., et al., *Cardioprotective Role of BGP-15 in Ageing Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) Model: Extended Mitochondrial Longevity*. Pharmaceutics, 2022. **14**(2).
384. Frantz, S., et al., *Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I*. Eur Heart J, 2013. **34**(16): p. 1233-44.
385. Gorbe, A., et al., *Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(5): p. 643-50.
386. Smolenski, A., et al., *Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20029-35.
387. Heinzl, F.R., et al., *Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction*. J Appl Physiol (1985), 2015. **119**(10): p. 1233-42.
388. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 44-52.
389. Pelosi, A., et al., *Cardiac tissue Doppler and tissue velocity imaging in anesthetized New Zealand white rabbits*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011. **50**(3): p. 317-21.
390. Liu, Y.W., et al., *Evidence of left ventricular systolic dysfunction detected by automated function imaging in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction*. J Card Fail, 2009. **15**(9): p. 782-9.
391. Li, W., et al., *Association between abdominal aortic plaque and coronary artery disease*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 683-8.
392. Shah, R.V., et al., *Association between troponin T and impaired left ventricular relaxation in patients with acute decompensated heart failure with preserved systolic function*. Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(6): p. 765-8.
393. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
394. Paulus, W.J. and C. Tschope, *A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(4): p. 263-71.
395. Altara, R., et al., *Targeting Obesity and Diabetes to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 160.
396. Eren, M., et al., *Relation between aortic stiffness and left ventricular diastolic function in patients with hypertension, diabetes, or both*. Heart, 2004. **90**(1): p. 37-43.
397. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
398. Hirt, M.N., et al., *Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model*. Basic Res Cardiol, 2012. **107**(6): p. 307.
399. Rainer, P.P. and D.A. Kass, *Old dog, new tricks: novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G*. Cardiovasc Res, 2016. **111**(2): p. 154-62.
400. Hoendermis, E.S., et al., *Effects of sildenafil on invasive haemodynamics and exercise capacity in heart failure patients with preserved ejection fraction and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial*. Eur Heart J, 2015. **36**(38): p. 2565-73.
401. Redfield, M.M., et al., *Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial*. JAMA, 2013. **309**(12): p. 1268-77.

402. Shah, S.J., et al., *Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap*. *Circulation*, 2016. **134**(1): p. 73-90.
403. Sartoretto, J.L., et al., *Regulation of VASP phosphorylation in cardiac myocytes: differential regulation by cyclic nucleotides and modulation of protein expression in diabetic and hypertrophic heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(5): p. H1697-710.
404. Benz, P.M., et al., *Mena/VASP and alphaII-Spectrin complexes regulate cytoplasmic actin networks in cardiomyocytes and protect from conduction abnormalities and dilated cardiomyopathy*. *Cell Commun Signal*, 2013. **11**: p. 56.
405. Boerrigter, G., H. Lapp, and J.C. Burnett, *Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 485-506.
406. Insete, J. and D. Garcia-Dorado, *The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(8): p. 1996-2009.
407. Szilvassy, Z., et al., *Loss of preconditioning in rabbits with vascular tolerance to nitroglycerin*. *Br J Pharmacol*, 1994. **112**(4): p. 999-1001.
408. Komajda, M. and C.S. Lam, *Heart failure with preserved ejection fraction: a clinical dilemma*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(16): p. 1022-32.
409. Kertesz, A., et al., *Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(9): p. 19086-108.
410. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.

juhasz.bela.1_180_24
A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. Juhász, B ; Der, P ; Turoczi, T ; Bacskay, I ; Varga, E ; Tósaki, A. Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma? *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* 6 : 2pp. 325-333. , 9 p. (2004).
2. Thirunavukkarasu, M ; Penumathsa, SV ; Juhász, B ; Zhan, LJ ; Cordis, G ; Altaf, E ; Bagchi, M ; Bagchi, D ; Maulik, N. Niacin-bound chromium enhances myocardial protection from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 291 : 2pp. H820-H826. (2006).
3. Penumathsa, SV ; Thirunavukkarasu, M ; Koneru, S ; Juhász, B ; Zhan, LJ ; Pant, R ; Menon, VP ; Otani, H ; Maulik, N. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology* 42 : 3pp. 508-516. , 9 p. (2007).
4. Thirunavukkarasu, M ; Penumathsa, SV ; Koneru, S ; Juhász, B ; Zhan, L ; Otani, H ; Bagchi, D ; Das, DK ; Maulik, N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radical Biology And Medicine* 43 : 5pp. 720-729. , 10 p. (2007).
5. Juhász, B ; Thirunavukkarasu, M ; Pant, R ; Zhan, L ; Penumathsa, SV ; Secor, ER ; Srivastava, S ; Raychaudhuri, U ; Menon, VP ; Otani, H, Thrall, RS ; Maulik, N. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium. *American Journal Of Physiology: Heart And Circulatory Physiology* 294 : 3pp. H1365-H1370. (2008).
6. Juhász, B, Varga, B, Gesztelyi, R, Kemeny-Beke, A, Zsuga, J, Tósaki, A. Resveratrol: A Multifunctional Cytoprotective Molecule. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11: (8) pp. 810-818. , 9 p.(2010). (Review)
7. Juhász, B ; Kertész, A ; Balla, J ; Balla, G ; Szabo, Z ; Bombicz, M ; Priksz, D ; Gesztelyi, R ; Varga, B ; Haines, DD ; Tósaki, A. Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart. *Current Pharmaceutical Design* 19 : 39pp. 6896-6905. , 10 p. (2013).
8. Kertész, A ; Bombicz, M ; Priksz, D ; Balla, J ; Balla, G ; Gesztelyi, R ; Varga, B ; Haines, DD ; Tósaki, A ; Juhász, B. Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters. *International Journal Of Molecular Sciences* 14 : 9pp. 19086-19108. , 23 p. (2013).
9. Bombicz, M ; Priksz, D ; Varga, B ; Gesztelyi, R ; Kertész, A ; Lengyel, P ; Balogh, P ; Csupor, D ; Hohmann, J ; Bhattoa, HP ; Haines, DD ; Juhász, B. Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits. *International Journal Of Molecular Sciences* 17 : 8Paper: 1284 , 18 p. (2016).
10. Bombicz, M ; Priksz, D ; Varga, B ; Kurucz, A ; Kertész, A ; Takács, Á ; Pósa, A ; Kiss, R ; Szilvássy, Z ; Juhász, B. A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. Allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil. *International Journal Of Molecular Sciences* 18 : 7Paper: 1436 , 19 p. (2017).
11. Priksz, D ; Bombicz, M ; Varga, B ; Kurucz, A ; Gesztelyi, R ; Balla, ; Toth, A ; Papp, Z ; Szilvássy, Z ; Juhász, B. Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *International Journal Of Molecular Sciences* 19 : 10Paper: E2882 , 18 p. (2018).
12. Szabó, K ; Gesztelyi, R ; Lampé, N ; Kiss, R ; Remenyik, J ; Pesti-Asbóth, G ; Priksz, D ; Szilvássy, Z ; Juhász, B. Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) Seed Flour and Diosgenin Preserve Endothelium-Dependent Arterial Relaxation in a Rat Model of

Early-Stage Metabolic Syndrome. International Journal Of Molecular Sciences 19 : 3Paper: E798 , 21 p. (2018)

13. Lampé, N ; Priksz, D ; Erdei, T ; Bombicz, M ; Kiss, R ; Varga, B ; Zsuga, J ; Szerafin, T ; Csanádi, Z ; Balla, Gy ; Balla, J ; Szilvássy, Z ; Gesztelyi, R ; Juhász, B. Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium. Journal Of Clinical Medicine 9 : 5Paper: 1434 , 17 p. (2020).
14. Kozma, M ; Bombicz, M ; Varga, B ; Priksz, D ; Gesztelyi, R ; Tarjányi, V ; Kiss, R ; Szekeres, R ; Takács, B ; Menes, A ; Balla, J ; Balla, Gy ; Szilvássy, J ; Szilvássy, Z ; Juhász, B. Cardioprotective Role of BGP-15 in Ageing Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) Model: Extended Mitochondrial Longevity. Pharmaceutics 14 : 2Paper: 226 , 16 p. (2022).
15. Priksz, D ; Lampé, N ; Kovács, Á ; Herwig, M ; Bombicz, M ; Varga, B ; Wilisicz, T ; Szilvássy, J ; Pósa, A ; Kiss, R ; Gesztelyi, ; Raduly, A ; Szekeres, R ; Sieme, M ; Papp, Z ; Toth, ; Hamdani, N ; Szilvassy, Z ; Juhasz, B. Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy. British Journal Of Pharmacology 179 : 10pp. 2240-2258. , 19 p. (2022).

A teljes közlemény lista MTMT szerint külön csatolva

juhasz.bela.1_180_24

Tudománymetriai adatok

Juhász Béla tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása MTA
V. Orvostudományi Osztálya (2024.04.04)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	114			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		105	1809	2341
szakcikk hazai idegen nyelvű		1	1	1
szakcikk magyar nyelvű		0	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		0	0	0
összefoglaló közlemény		6	343	374
rövid közlemény		2	8	14
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	3			
idegen nyelvű		3	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)		117	2161	2730
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	117		2161	2730

V. További tudományos művek	22			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkekét és a nem ismert lektoráltsági folyóiratokban		16	6	7
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		2	0	0
Oltalmak (szabadalmak)		4	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	1		1	1
Összes hivatkozás ¹			2168	2738
Hirsch index ⁶	27			
g index ⁶	48			

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	8	303
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	19	191
A tudományos fokozat (PhD 2004) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	109	2533
Az utolsó 10 év (2014-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	65	580
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	267	9,75%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		176
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0