

## I.

Egyik tanulmányunkban két növényi hatóanyag a resveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol hatását vizsgáltuk iszkémiás/reperfundált szíveken (I/R). Az állatokat 4 csoportba osztottuk az első resveratrol, a második  $\gamma$ -tokotrienol, a harmadik csoport pedig kombinált kezelésben részesült, a negyedik csoport kontrollként szolgált. A kezelések végén az állatok szívét izoláltuk és 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Eredményeinkből kiderült, hogy mind a két hatóanyag védelmet nyújtott az I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Együttes adagolásuk során szinergikus hatást tapasztaltunk és a szívszövetet jelentősebb mértékben védték meg az I/R-indukálta károsodásokkal szemben. Erre bizonyíték az, hogy a kettős kezelésben részesült állatok posztiszkémiás szívfunkciója szignifikáns mértékben javult a monoterápiában részesültekhez képest. További vizsgálatainkból kiderült, hogy a két vegyület külön-külön is csökkentette az infarktusz terület méretét, valamint az apoptózist, a kontroll csoporthoz képest. A kombinált kezelésben részesült csoportban további csökkenést tapasztaltunk. Western-blot technikával vizsgáltuk a p-Akt és Bcl-2 „túlélési” fehérjék szintjét. Eredményeink szerint az önálló kezelések is jelentős mértékben emelték az említett fehérjék szintjét, azonban a kombinált kezelés további drasztikus növekedést eredményezett. Az apoptózis mellett vizsgáltuk az autofágia előfordulását is. Az autofágia egy nem apoptotikus programozott sejthalál forma, mely bizonyos körülmények között segíti a sejtek túlélését is. Meghatároztuk a Beclin-1 fehérje szintjét valamint a LC3II/LC3I arányát, melyek jelentős emelkedést mutattak a monoterápiás csoportokban a kontroll csoporthoz képest, és további jelentős emelkedést tapasztaltunk a kombinált kezelés során is. Ezt követően immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk az LC3II pozitív sejtek számát a szívszövetben I/R után, a kapott eredmények alátámasztották a Western-blottal kapott eredményeinket. Végül elektron mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk az autofagoszómákat. A kapott eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy a resveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol szinergikus hatást fejtenek ki a szívekben. Ezen hatások részben a túlélési fehérjék, részben pedig az autofágia indukciójával magyarázhatóak. Következtetéseinket alátámasztják a Wortmannin (PI3 kináz inhibitor) kapott eredmények is. A Wortmannin kezelt szívekben elmaradt a kezelések indukálta pozitív hatások, ezzel összhangban csökkent a „túlélési” fehérjék szintje is. A fentebb leírtakból egy angol nyelvű publikáció született. JCM (IF=5,114).

## II.

Következő tanulmányunkban munkacsoportunk 24 héten keresztül 2%-os koleszterin diétát alkalmazott New-Zealand nyulakon, amelyben az egyik csoport tagjai a 4. héttől kezdve 5 mg/ttkg/nap dózisú resveratrol kaptak. A 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24. héten meghatároztuk az össz-cholesterol szintet, majd a 4. 8. 16. 24. hét után a szíveket ún. „izolált-dolgozó” szív modellen vizsgáltuk. A „dolgozó” módban regisztráltuk a preischaemiás szívfunkciókat: szívfrekvencia, koronária átáramlás, aorta kiáramlás, aorta nyomás és az EKG-t. A 30 perc iszkémiát követő reperfúzió során a 30, 60, 90 és 120. percben mértük a postischaemiás szívfunkciókat és folyamatosan rögzítettük az EKG során megjelenő kamrai fibrillációt és tachycardiát. A reperfúzió leteltével mértük az infarktusos terület nagyságát, valamint a szíveken immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk. A szív kanulálásával párhuzamosan az aorta abdominalis-t is eltávolítottuk és 10%-os formalin oldatba helyeztük az atheroslerotikus plakk meghatározásához.

(i) Megállapítottuk, hogy a 2%-os koleszterin kezelés nem azonnal okoz szívfunkciós romlást, hanem kb. a 3.hónaptól kezdődően, de szignifikáns változás csupán a 6. hónaptól vált láthatóvá.

(ii) Az 5 mg/ttkg/nap dózisú resveratrol kezelés szignifikánsan csökkentette az atheroslerotikus plakk és az infarktusos terület nagyságát, a kamrai arrhythmia előfordulási gyakoriságát, csökkentette a vér össz-cholesterol szintjét, és javította a postischaemiás szívfunkciókat.

A kísérletből 1 már meglévő TDK pályamunka, 1 MÉT poszter, valamint 1 MÉT előadás, 1 publikáció született (Mol. Cell. Biochem 2011, 348:199-205). IF.: 1,896

## III.

Kísérletünk második részében monitoroztuk, hogy a szívfunkciós paraméterek romlása összefüggésben van-e a szív szisztolés vagy diasztolés állapotának fokozatos romlásával.

Munkacsoportunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk a különböző időintervallumokig magas koleszterin tartamú diétán tartott nyulak szívizom szövetét molekuláris biológiai analízissel, valamint echocardiográfia segítségével.

Hím, New Zealand nyulakat három csoportra osztottunk. Az első csoport (i) normál ún. kontroll tápot, másik (ii) csoport három hónapon át 2%-os koleszterin dús tápot, a harmadik csoport (iii) nyolc hónapon át magas zsírtartalmú tápot kapott, ad libitum. A hiperkoleszterinémias állapotot 2,0%-os koleszterinnel dúsított laboratóriumi állateledellel idéztük elő. A nyolcadik hónap végén az állatok ultrahangos vizsgálatát egy VisualSonics Vevo 770 típusú ultrahang készülékkel végeztük. A kezelés leteltével a nyulak a fülvénájukon keresztül a thrombusképződés megelőzése céljából heparint kaptak (1000 IU/kg), majd az anaesthesia intra muszkulárisan, ketamine/xylazine (40/5 mg/kg) injektálásával történt meg. A mellkas feltárását, majd a szívizolálást követően a szíveket hideg perfúziós oldatba tettük. A preparálást követően a szíveket az aortán és a vena pulmonalison keresztül, ún. „dolgozó-perfúziós” készüléken perfundáltuk. A három hónapig kezelt csoportot itt két részre osztottuk, így az egyik csoportot a másik háromtól eltérően 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Az izolálást követően a szívizom minta egy részét azonnal feldolgoztuk, a másik részét -80 °C-on-tároltuk a Western blot analízis elvégzéséig. A „friss” szívizom szövetetből egy speciális MITOISO1 kit segítségével, mitokondriumot izoláltunk, majd ezen izolátumokon Citokróm c oxidáz aktivitás vizsgálatot végeztünk, CYTOCOX1 kit és UV Helios Alpha S2 spektrofotométer használatával. A Western blot analízis során a HO-1, VEGF és COXIII fehérjék expresszióját vizsgáltuk, valamint összevetettük a kapott COX-aktivitás során kapott eredményeket a COXIII fehérje expressziójának mértékével. GAPDH fehérjét használtunk citoszólikus kontrollként, a COXIV fehérje, pedig a mitokondriális háztartási fehérjénk volt.

Ultrahang felvételeink készítésekor megfigyeltük, hogy a 3. hónap elteltekor nem tapasztaltunk jelentős eltérést a kontroll és a HC (hypercholesterolaemiás) szívek EF értékei között. A 8. hónap végére, viszont nem csupán az E/A arány romlott szignifikánsan, hanem bekövetkezett az ejekciós frakció romlása is (EF), amely fémjelezte a szisztolés funkció romlását is a diasztolés funkció zavarokat követően.

A Citokróm c oxidáz aktivitása is jelentősen csökkent a koleszterines kezelés hatására, ezzel a Western blot eredményeink is átfednek.

HO-1 fehérje expressziója az idő előrehaladtával, ill. a kezelés hatására, jelentősen romlott.

A VEGF fehérje expressziójában a kezelt csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget, bár a kontrollhoz képest mindhárom csoport értéke jelentősen leromlott. Az elektronmikroszkópiai mintafeldolgozás folyamatban van.

Az eredményekből 2012 egy MÉT poszter született, a cikk írása folyamatban van.

#### IV.

Kísérleteink következő részében a HO-1 gének szerepét vizsgáltuk HO-1 transgenic egéren. Kísérleteinkben egyértelműen kimutattuk, hogy a HO-1 gének felerősítése csökkenti az iszkémia során fellépő arrhythmia hajlamot, infarktusz terület nagyságát, valamint javítják a szívfunkciós paramétereket. A paraméterek javulása SnPPIX-al (HO-1-inhibitor) gátolhatóvá vált, jelezve a HO-1 gén kardioprotektív szerepét.

Az eredményekből két publikáció került megjelenésre:

1. Bak I, Czompa A, **Juhász B**, Lekli I, Tosaki A. Reduction of reperfusion-induced ventricular fibrillation and infarct size via heme oxygenase-1 overexpression in isolated mouse hearts\* J Cell Mol Med. 2010 Aug 16. IF.: 5,228
2. **Juhász B**, Varga B, Czompa A, Bak I, Lekli I, Gesztelyi R, Zsuga J, Kemeny-Beke A, Antal M, Szendrei L, Tosaki A. Postischemic cardiac recovery in heme oxygenase-1 transgenic ischemic/reperfused mouse myocardium. J Cell Mol Med. 2010 Aug 16. IF.: 5,228

#### V.

Mivel az előző tanulmányainkban kimutattuk a resveratrol és tokoferol származékok kardioprotektív hatását, így olyan gyógynövény kivonatot kerestünk, amely alkalmas lehet hypercholesterolaemiás státusz javítására. Ehhez elsőként a meggy mag kivonatot kívántunk tesztelni. Mivel azonban a kivonat toxikológiai tulajdonságairól semmit nem tudtunk, így elsőként vizsgálatainkat egy toxikológiai teszttel kezdtük, a kivonat ártalmas hatásainak kizárása érdekében. A meggy mag kivonat több ezer mg-os dózisban is biztonságosnak bizonyult. Az eredményekből két publikáció született:

Bak I, Czompa A, Csepanyi E, **Juhász B**, Kalantari H, Najm K, Aghel N, Varga B, Haines DD, Tosaki A. Evaluation of Systemic and Dermal Toxicity and Dermal Photoprotection by Sour Cherry Kernels. Phytother Res. 2011 Jul 12. IF.: 1,878

Bak I, Lekli I, **Juhász B**, Varga E, Varga B, Gesztelyi R, Szendrei L, Tosaki A. Isolation and Analysis of Bioactive Constituents of Sour Cherry (*Prunus cerasus*) Seed Kernel: An Emerging Functional Food. J Med Food. 2010 Aug;13(4):905-10. IF.: 1,39

A meggymag-kivonat mellett több gyógynövénykivonatot is toxikológiai teszteknek vetettük alá, azonban nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket

Kalantari H, Galehdari H, Zaree Z, Gesztelyi R, Varga B, Haines D, Bombicz M, Tosaki A, **Juhasz B.** Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracunculus* (tarragon) extract. *Food Chem Toxicol.* 2012 Aug 4;51C:26-32. IF.: 2,999

VI. Miután a toxikológiai vizsgálatok pozitívan záródtak, megkezdtük hypercholesterolaemiás nyulak ill. tengerimalacok meggymag-kivonatos kezelését 30mg/ttkg dózisban.

VI/a.

Hím Hartley-típusú tengerimalacokat négy csoportra osztottunk: kontroll (K), meggymag-kivonattal kezelt (M), koleszterines táppal etetett (Ch), továbbá koleszterines táppal etetett és egyben meggymag-kivonattal kezelt (ChM) csoport. A meggymag-kivonattal kezelt tengerimalacokat 33 napig kezeltünk olajmentesített, szárított meggymag-kivonattal *per os*. A meggymag-kivonattal nem kezelt valamennyi tengerimalac a meggymag-kivonat szuszpendálására használt hidroxietil-cellulóz nyákot kapta azonos térfogatban (2 ml) ugyanannyi ideig. A koleszterines táp 2% koleszterint tartalmazott, melyet az állatok *ad libitum* fogyasztottak.

A kezelési időszak végén a tengerimalacok izolált truncus pulmonalis-ából gyűrűpreparátumot készítettünk, melyeket karbogénnel (95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>) átbuborékolva, 36 °C-os Krebs-oldatot tartalmazó szervkádakban függesztettük fel 10 mN nyugalmi feszülés mellett és az érgyűrűk izometriás kontrakciós erejét regisztráltuk.

Valamennyi éren először noradrenalin koncentráció-hatás görbét vettünk fel (10 nmol/l - 10 μmol/l). 45 perc mosás és pihentetés után az 1 μmol/l noradrenalinnal prekontrahált ereken 1 μmol/l Ach hatását regisztráltuk, majd újabb 45 perc mosás és pihentetés után az 1 μmol/l noradrenalinnal prekontrahált ereken 10 μmol/l ATP hatását vizsgáltuk.

Eredményeink arra utalnak, hogy truncus pulmonalis-on sem a meggymag-kivonattal, sem a koleszterinnel végzett kezelés nem befolyásolta érdemben a noradrenalinnal szembeni vascularis válaszkészséget és az endothelialis muszkarin receptor-funkciót. Ehhez hasonlóan a koleszterin-kezelés nem befolyásolta lényegesen az ATP-re adott választ sem.

Az előzőekkel szemben a meggymag-kivonattal végzett kezelés azonban szignifikánsan fokozta az endothelialis P<sub>2</sub> purinoceptorok által mediált vazorelaxációt, amit a koleszterinnel végzett kezelés sem befolyásolt.

Az eredményekből 1 MÉT poszter született 2010-ben. A publikáció írása folyamatban van.

VI/b.

Hím New Zealand nyulakat 16 héten keresztül 2%-os koleszterindús táppal (HC) ill. 2%-os koleszterindús táp + 30mg/ttkg meggymag-kivonattal (Kezelt) kezeltünk. A szívek státuszát echocardiográfiával is követtük. A 16. héten a fent említett módszert alkalmazva a szíveket 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A reperfúzió leteltével a szíveket TTC oldattal megfestettük az infarktusos terület mérése miatt, egy másik csoportját folyékony nitrogénnel fagyasztottuk a molekuláris biológiai módszerekhez (Western blot, COX aktivitás). Az arteria thoracicat Sudan III al festettük az atherosclerotikus plakkok kvantifikálásához.

Eredményeink során a szív diasztolés funkciójának romlása következett be a 16. héten, amelyet a meggymag-kivonat szignifikánsan javított. Az izolált szív funkciók paramétereinek javulása korrelációt mutatott az ultrahangos felvételekkel. A meggymag-kivonat csökkentette az össz-koleszterin szintet ill. az atherosclerotikus léziók mértékét. A mitokondriális COX aktivitást és a COX III protein expresszióját javította. A HO-1 protein expresszióját szintén növelte. Meglepően tapasztaltuk, hogy a VEGF szignál-transzdukciós útvonalba, nem avatkozott bele.

A publikációból egy nemzetközi **poszter** (7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes Edinburgh), ill. 1 MÉT (Debrecen) poszter született. A kézirat a Current Pharmaceutical. Design folyóiratnál (IF.: 4,774) elbírálás alatt áll. A cikk egy Ph.D dolgozathoz is fel lesz használva.

VII. Hím New Zealand nyulakat 16 héten keresztül 2%-os koleszterindús táppal (HC) ill. 2%-os koleszterindús táp + medvehagyma-kivonattal (Kezelt) kezeltünk. A medvehagyma liofilizátumot a szegedi egyetem fitofarmakológiai tanszékétől kaptuk. A protokoll teljes mértékben megegyezik a meggymag-kivonattal kezelttekkel. A szív diasztolés funkciói és szívfunkciós paraméterei javulást mutattak a kezelt csoportban. A hematológiai paraméterek: total-koleszterol, triglicerid, LDL, HDL, ApoA, ApoB, glükóz, kreatinin, CK, GOT, GPT, LDH, AP, Natrium, Kalium, Klorid, CRP mérése folyamatban van. A Western blot,

immunhistokémia, mitokondriális fehérjék aktivitása, és expressziója, elektormikroszkópiás metszetek előkészítése a feldolgozási stádiumban van.

A támogatott OTKA száma, 9 MÉT poszterben, 9 Debreceni Klinikai Farmakológiai Napok konferencia poszterben, 1 külföldi konferencia absztraktban, 1 könyvfejezet, 1 MÉT előadásban, 4 hazai továbbképző előadásban, és 16 nemzetközi folyóiratban (kumulatív impakt faktor: 36.741) került feltüntetésre. 1 cikk revízió alatt (IF.: 4,774), 1 cikk írása folyamatban van.