

Részletes szakmai beszámoló a 46145 sz. OTKA pályázat támogatásával elvégzett munkáról és a kapott eredményekről

A szív és érrendszeri megbetegedések világszerte a halálozási statisztika élére kerültek. Jelenleg Európában és az Egyesült Államokban a szív- és érrendszeri betegségek az összhalálozás több mint 51 %-t teszik ki. Az elmúlt néhány évben nem változott lényegesen a keringési betegségek halálozási gyakorisága, azaz igen magas szinten stagnáló állapotot jelez, habár a halálozási arány az elmúlt 30 évben földrajzi régióként jelentősen megváltozott. A legtöbb fejlett országban a halálozás jelentősen csökkent, ugyanakkor a kelet-európai országokban, köztük hazánkban is ez idő alatt a mortalitás drámaian emelkedett. A volt szocialista országokban kiemelkedően magas a keringési betegségek miatti halálozás, Magyarország közöttük a középmezőnyben helyezkedik el. Ma a magyarországi halálozásoknak több mint a fele szív- és érrendszeri betegségből ered. Aligha vitatható, hogy ez az új, magyar népbetegség, ezért kiemelten kell kezelni. Az európai népesség kormegoszlására standardizált halálozási arány ebben a betegségcsoportban Magyarországon 3,2-szer magasabb, mint Franciaországban. Ez a riasztó statisztika már önmagában indokolja a témakör részletesebb vizsgálatát.

Az „Iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodás: aritmiák és szívfunkciók farmakológiai befolyásolása, molekuláris mechanizmusok.” című OTKA pályázatunkra 4 év időtartamra (2004. 01. 01-2007. 12. 31.) 13416 ezer Ft támogatást kaptunk. A teljes összeget a pályázatban kitűzött célok elérése érdekében használtuk fel. A továbbiakban évekre lebontva mutatjuk be a pályázat során elvégzett munkát és a kapott eredményeket.

I. év: 2004. 01. 01-2004. 12. 31.

Az elért eredmények rövid ismertetése:

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésünkre, hogy a hemoxygenase-1 (HO-1)-el összefüggő endogén szénmonoxid (CO) fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat, továbbá, hogy képes a guanil-cikláz aktivitás fokozására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására (hasonlóan a nitrogén oxidhoz), így szerepet játszhat egyaránt a fiziológiás és patológiás értónus szabályozásában. A hem degradációval járó endogén CO növekedés az iszkémia/reperfúzió okozta sérülések elleni citoprotekció szabályozásának egyik lehetséges célpontjává vált. A „citoprotektív” CO-ról kimutatták, hogy: (i) a szolubilis guanilat-cikláz aktiválásán keresztül szabályozza a celluláris cGMP szintet, hozzájárulva ezáltal az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, valamint megakadályozza a vérlemezkék aggregációját; (ii) csökkenti a NO képződést a nitrogén oxid szintáz (NOS) gátlása következtében; (iii) gyulladáscsökkentő hatása van; és (iv) gátolja mind az apoptotikus, mind pedig a sejtosztódási mechanizmusokat. A HO által termelt CO hatását kifejezheti a keletkezés helyén, vagy pedig a szomszédos sejtekbe diffundálva. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a kamrafibrilláció és az endogén CO termelés között szoros összefüggés van. Abban az esetben, ha a szív reperfúzió indukálta fibrilláción esett át, a miokardiumban a HO-1 mRNS és protein expressziója, következés képen az endogén CO mennyisége jelentős mértékben csökkent. A HO-1 farmakológiai stimulálásával a miokardiumban emelkedett CO termelést tapasztaltunk, míg ezzel párhuzamosan reperfúzió indukálta fibrilláció kialakulását nem regisztráltunk. Az eredményeket alátámasztják HO-1 „knock out” állatokon végzett kísérleteink, melyekben azt tapasztaltuk, hogy a HO-1 „knock out” egér szívek minden esetben fibrilláltak a reperfúzió indítását követően. Számos növényi

kivonat tartalmaz különféle hatóanyagokat, melyek előnyös hatásokat fejthetnek ki a kardiovaszkuláris keringésre. Hazánkban nagy mennyiségben képződő meggyből, mint természetes eredetű hulladék feldolgozásából, számos flavonoid, proanthocianidin és egyéb növényi hatóanyagokból gyógyszerek fejleszthetők melyek alkalmasak lehetnek a kardiovaszkuláris megbetegedések farmakológiai és terápiás kezelésére, hiszen összefüggést találtunk a HO-1 expresszióval összefüggő endogén CO termelés és a mennymagból származó növényi hatóanyagok között melyek előnyösen befolyásolták a keringést. Célkitűzéseink alapján az alábbi kérdésekre felmerülő összefüggéseket vizsgáltuk:

- 1). A heme oxygenase-1 (HO-1) gén, protein, és enzim aktivitásának jelentősége és vizsgálata a szívizom iszkémia/reperfúzió okozta károsodásában.
- 2). A HO-1 gén expressziójához kapcsolódó endogén szénmonoxid (CO) termelés vizsgálata összefüggésben az iszkémia/reperfúzió okozta kamrafibrilláció megjelenésével HO-1 knock out (homo és heterozigóta) egerekben.
- 3). Actinomycin D és dexamethason hatása (de novo protein szintézisen keresztül) a szívizomkárosodások tanulmányozására, azok megelőzésére.
- 4). A meggyből izolált flavonoidok és antociánok hatása az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások megelőzésére a HO-1 génnel összekapcsolt endogén CO produkción keresztül, s azok (előnyös hatás esetén) gyógyszerre történő fejlesztésének lehetősége.
- 5). A HO-1 jelentőségének és előnyös hatásának kimutatása más iszkémiás-reperfundált szöveten (retina iszkémia/reperfúzió) a Prunus cerasus (meggy) magjából nyert extractum alkalmazásával.

Az előbbi kérdésekre és összefüggésekre felmerülő válaszainkat és eredményeinket négy különböző folyóiratban publikáltuk, melyeket a publikációk fejezetben tüntettünk fel.

II. év: 2005. 01. 01-2005. 12. 31.

Az elért eredmények rövid ismertetése:

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a hemoxigenáz (HO) iszkémiás/reperfundált szövetekben fontos szerepet játszik. Így a HO-val összefüggő endogén szénmonoxid (CO) produkció is fontos szerepet játszhat az iszkémiás szövetfunkciók helyreállításában. Tehát, olyan molekulák, amelyek alkalmasak az endogén szénmonoxid (CO) termelésre, alkalmasak lehetnek a posztiszkémiás funkciók kezelésére is. Vizsgáltuk az exogén CO hatásait is, amely alátámasztja eredményeinket, mely szerint a CO alkalmas lehet károsodások kivédésére amennyiben a vér és alakos elemeit ki tudjuk iktatni a keringésből. Továbbá, a szívizom iszkémia okozta károsodások kivédésére különböző antioxidáns molekulákat is alkalmaztunk. Vizsgáltuk, mint antioxidánsok, a rezveratrol és tocotrienolok hatásait az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokra, különböző gének expressziójára, valamint az iszkémia/reperfúzió során aktiválódó jelátviteli útvonalakra izolált szívpreparátumon. Eredményeink rámutattak arra, hogy a tocotrienolok szívre gyakorolt direkt hatásaira, így az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodások megelőzésében a tocotrienolok c-SRC aktiváció gátló, valamint proteaszóma stabilizáló hatása fontos szerepet játszhat. A rezveratrol kardioprotektív hatása háttérben több mechanizmus is áll. Eredményeink alapján elmondható, hogy a kardioprotektív hatáshoz jelentős mértékben hozzájárul a rezveratrol hatása az CREB aktivációra, s mind ez történhet AKT-tól függő és független jelátviteli útvonalon egyaránt. Eredményeink azt mutatják, hogy a meggy flavonoid és proanthocianidin tartalma hasonló hatásokkal rendelkezik, mint az előbb említett biológiailag aktív anyagok. Vizsgáltuk továbbá két pozitív inotrop szer (levosimendane és enoximone) hatásmechanizmusát a szívizom kontraktilitásra. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a levosimendane pozitív inotrop

hatását calcium érzékenyítő aktivitásán keresztül fejt ki, az enoximone pedig PDE enzim gátlása révén rendelkezik kardioprotektív hatással.

III. év: 2006. 01. 01-2006. 12. 31.

Az elért eredmények rövid ismertetése:

A kardiovaszkuláris megbetegedések, a daganatos megbetegedések mellett, az első helyet foglalják el a lehetséges halálozási okok között a fejlett ipari országokban és hazánkban egyaránt. Számos lehetséges patológiai mechanizmus magyarázza az iszkémiás szívkárosodások következményeit és azok farmakológiai módon történő befolyásolhatóságát (pl. katekolaminok, beta blokkolók, Ca-antagonisták, szabadgyök fogók). A számos, az irodalomban széleskörűen tanulmányozott és lehetséges mechanizmusok mellett a pályázatunkban szereplő célkitűzéseinket a génexpressziós változásokra és az apoptózis szerepének tisztázására fordítottuk az iszkémiás/reperfundált szívizomban. Vizsgáltuk az apoptózis jelentőségét összefüggésben a szívizom energetikai állapotával és a transzglutamináz szerepével. Tanulmányoztuk továbbá a caspase-3 jelentőségét (aktivitását) valamint a hozzá kapcsolható hemoxigenáz-1 (HO-1) szerepét, a rezveratrol hatását (mint természetes növényi hatóanyag) a p38 mitogén-aktiválta protein kináz és a stress-aktiválta protein kináz 1/cAMP rendszer patofiziológiáján keresztül. Az említett és általunk tanulmányozott mechanizmusok vélhetően fontos szerepet játszanak az iszkémiás/reperfundált szívizomban (i) a reperfüzió indukálta arrhythmia kifejlődésében, (ii) az infarktusz terület nagyságában, (iii) valamint a szívfunkciók iszkémiát követő felépülésében.

Célkitűzéseinkben vizsgáltuk:

- 1). A kaszpáz aktivitást és az apoptotikus sejtek számát összefüggésben a szívizom iszkémia/reperfúzió okozta károsodásában kezeletlen és kezelt szívizomban. Tanulmányoztuk továbbá a transzglutamináz fontosságát az apoptózisban és annak következményét.
- 2). A rezveratrol, mint természetes növényi hatóanyag, hatását a szignáltranszdukció (mitogén-aktiválta protein kináz szignál, a p38, jelentőségére az iszkémiás/reperfundált szívizomban.
- 3). A *Prunus cerasus* (meggy) magjából, amely nagy mennyiségben található Észak-Kelet Magyarországon, előállított kivonat a rezveratrol mellett, számos flavonoidot és telítetlen növényi zsírsavszármazékokat tartalmaz. Vizsgáltuk a *Prunus cerasus*-ból előállított kivonat hatékonyságát izolált szívmmodellünkön a posztisztkémiás szívizom felépülésére, az arrhythmia előfordulásának mértékére, és az apoptotikus sejtek megjelenésére.

Eredményeink azt mutatják, hogy a már klasszikus iszkémiás mechanizmusok (kalcium, katekolaminok, szabadgyökök) ismerete mellett, a génexpressziós változások, pl. a hemoxigenáz, a mitogén-aktiválta protein kináz (p38) szignál mechanizmusok (hasonlóan a mitokondriális géneszpressziós változásokhoz), valamint az apoptózis egy új utat nyithatnak meg az iszkémiás szívbetegek kezelésében és terápiás gyógyszerek kifejlesztésében. Mindez visszatükröződik az iszkémiát követő szívfunkciók felépülésében (bal kamrafunkció javulásában, infarktusz terület nagyságának és az arrhythmia csökkenésében).

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésünkre, hogy a hemoxigenase-1 (HO-1)-el összefüggő endogén szénmonoxid (CO) fiziológiai jelátvivő molekulaként funkcionálhat, továbbá, hogy képes a guanil-cikláz aktiválásfokozására, ezáltal a celluláris cGMP szint szabályozására, s hasonlóan az adenosin receptorokhoz, jelentősége van a fiziológias és patológias értónus szabályozásában. Tanulmányoztuk az adenosin és az adenosin receptorok szerepét is a pitvarizom sejtjein is. A hem oxigenázzal összefüggő védőmechanizmust magyarázza: (i) a

szolubilis guanilát-cikláz aktiválásán keresztül a celluláris cGMP emelkedése, hozzájárulva ez által az endotheliumtól-függő vasodilatációhoz, (ii) a gyulladáscsökkentő hatás; amely gátolja az apoptózis kifejlődését. Meg kell említeni, hogy a HO-mediálta endogén CO termelés nem csak a cGMP szint emelkedését idézi elő, hanem a szívizom cAMP koncentrációját is növeli, amely adott kondíció alatt proarrhythmogén hatásokat is eredményezhet.

Mint ismeretes, számos növényi kivonat tartalmaz biológiailag aktív hatóanyagokat, melyek előnyös hatásokat fejthetnek ki a kardiovaszkuláris keringésre. Hazánkban, nagy mennyiségben termelt meggyből melléktermékként keletkező meggyag, mint természetes eredetű hulladék, feldolgozásából számos flavonoid, proanthocianidin és egyéb növényi hatóanyagokból gyógyszerek fejleszthetők, melyek alkalmasak lehetnek a kardiovaszkuláris megbetegedések terápiás kezelésére, hiszen összefüggést találtunk az apoptózis, kaszpáz aktivitás és HO-1 expresszióval összefüggő endogén CO termelés és a mennymagból származó növényi hatóanyagok hatásai között, amelyek előnyösen segítik a szívizom felépülését egy iszkémiás periódus után.

Eredményeinket hat folyóiratban publikáltuk 2006-ban, amelyeket a publikációk fejezetben teljes részletességgel feltüntettünk. A kutatásainkból 1 Ph.D. munka (Samarjit Das) és kettő szabadalmi bejelentés született. Feltétlenül megjegyzendő, hogy a publikációs és szabadalmi költségeknek (a feladatoknak), mint végeredményeknek a jelenlegi OTKA támogatás kb. 30%-át fedezte. A feladatok elvégzése valamint az OTKA jelentésben megkövetelt beszámoló szempontjai (mint végeredmény) egyéb forrásokból támogatásra kerülő 70% finanszírozásának előteremtése nélkül nem jöhetett volna létre a beszámoló, hiszen a vállalat feladatok elvégzése, publikációs költségek és szabadalmi bejelentések (mint konkrét végeredmény), az OTKA pályázatunk kb. 30% forrást biztosított.

Végezetül feltétlenül megemlítendő, hogy az OTKA pályázatunkban szereplő víztisztító készülék beszerzése más forrásból történt meg, ezért az eredeti pályázatban szereplő összeget, amelyet a víztisztító berendezés beszerzésére szántunk a 2004-es évben történő pályázatunk beadásának tervezésekor, más forrásból biztosítottunk. Az OTKA-ból így felszabadult összeget (összesen 3,000 eFt, a 2006-os és 2007-es évre vonatkoztatva és megosztva) további dologi beszerzésekre fordítottuk. Ehhez utólagos engedélyezést kértünk. A dologi kiadásokra fordított összegeket részleteiben ismertettük az éves pénzügyi beszámolóinkban.

IV. év: 2007. 01. 01-2007. 12. 31.

Az elért eredmények rövid ismertetése:

Egyre több bizonyíték van arra nézve, hogy a szénmonoxszid (CO), mint jelátvivő molekula, fontos szerepet játszhat az iszkémia/reperfúzió-indukálta szívizom-károsodások megelőzésében. Az már évtizedek óta ismert volt, hogy a szervezet CO-ot termel a hemoglobin lebontása során, majd ezt követte az a felfedezés, hogy a CO enzimatis forrása a hem-oxigenáz (HO). Azóta a CO számos biológiai aktivitását felfedték. Egészen mostanáig azonban CO-ot felszabadító vegyületek nem álltak rendelkezésre. Az utóbbi években az átmenetifém karbonilokat potenciális CO felszabadító molekulákként (CO-RM) azonosították, melyek elősegíthetik a CO gyógyszerészeti alkalmazását azáltal, hogy CO-ot adnak le a szöveteknek és szerveknek. Ezek a komplexek karbonil csoportokkal – mint koordinációs ligandokkal – körülvevett olyan nehézfémeket tartalmaznak, mint a nikkel, kobalt, vas vagy a ruthenium. In vitro tanulmányok kimutatták, hogy az ilyen komplexek a CO mérhető és kontrollálható mennyiségét szabadítják fel megfelelő ligandok jelenlétében vagy fényexpozíció hatására. Biológiai kísérletekben a CO felszabadulás révén ezek a CO-RM-ok hosszantartó vasodilatációt okoztak patkány aorta gyűrűkben, amit előzetesen fenilefrinnel

kontraháltak. Motterlini és munkatársai a közelmúltban kifejlesztették a trikarbonil-kloro-(glicinátó)-ruthenium(II)-ot ($[\text{Ru}_3\text{CO}_3\text{Cl}(\text{glicinát})]$), mint vízoldékony CO-RM-ot. Kísérleteinkben a CORM-3-nak az iszkémia/reperfúzió-indukálta kamrai arrhythmia előfordulására gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Meghatároztuk az infarktusz terület nagyságát, valamint a celluláris ionkoncentrációkban bekövetkező változásokat, továbbá regisztráltuk a szívfunkciókat. Eredményeink azt mutatják, hogy a CORM-3 alkalmazása csökkenti az infarktusz terület nagyságát és a reperfúzió-indukálta arrhythmia előfordulási valószínűségét, valamint elősegíti a posztisztkémiás szívfunkciók felépülését és a zavart szenvedett ionháztartás helyreállítását.

Kardiovaszkuláris kórképek számos patológiás elváltozás szövődményeként is kialakulhatnak. A legismertebb hajlamosító tényezők közé tartoznak a dohányzás, az elhízás a tartósan fennálló magas vérnyomás és a cukorbetegség. Bár a rezveratrol kardioprotektív hatása jól ismert, csak kevés adattal rendelkezünk cukorbetegséggel összefüggő, kardiovaszkuláris kórképekben kifejtett hatásáról. Ezért munkánk során halmozott rizikófaktorkkal rendelkező, elhízott és cukorbeteg patkányokban kívántuk vizsgálni a rezveratrol hatását iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált patkányszívokban.

Kísérleteink során vizsgáltuk a rezveratrol hatását a:

1. a vércukor-, és inzulinszintre
2. a testtömegre
3. a posztisztkémiás szívfunkciókra (kamrafibrillációk kialakulásának gyakorisága, szívfrekvencia, coronaria átáramlás, aorta kiáramlás, kifejlődő bal kamrai nyomás, infarktusz terület nagysága)
4. a GLUT-4 glükóztranszporterek transzlokációjára
5. az endothelin expresszióra
6. az apoptotikus sejtek számára

Eredményeink alapján elmondható:

A rezveratrol az általunk alkalmazott 5 mg/ttkg-os dózisban még halmozott rizikófaktorok jelenléte esetén is jótékony hatással van a szívre, sőt a diabetes tüneteit is enyhíti. (i) A rezveratrol hatására ugyanis az emelkedett vércukor szint értékek csökkentek, amelyben valószínűleg az játszik szerepet, hogy (ii) fokozódik a GLUT-4 glükóztranszporter expressziója, és ezáltal növekszik a sejtek glükózfelvétele a vérből. Azt tapasztaltuk, hogy (iii) csökkent a túlsúlyos állatok testtömege is, amely szintén előnyös, mivel így csökken a szív terhelése. A cukorbetegség fő tünete, hogy az erek endotheliuma károsodik, illetve felborul a zsírsanyagcsere. Ezek következményeként a coronáriák is károsodást szenvednek, amely a szíven oxigén hiányos állapotot idéz elő. Ez nem csak azért veszélyes, mert fájdalmas, és zavart szenved a szív kontrakciós-relaxációs mechanizmusa, hanem azért is, mert ilyenkor káros anaerob metabolitok halmozódnak fel. Ezek a myocardiumot károsítják, illetve reperfúzió során arrhythmia indukálhatnak. (iv) Rezveratrol hatására jelentősen javult a szív posztisztkémiás felépülése, nőtt a kifejlődő bal kamrai nyomás, fokozódott az aorta kiáramlás, és a coronaria átáramlás. Mivel a rezveratrol (v) csökkentette az endothelin-1 expresszióját, javult a perfúzió, és csökkent az (vi) infarktusz terület nagysága, ezzel párhuzamosan pedig (vii) csökkent az apoptotikus sejtek száma. A rezveratrol az arrhythmogén szabadgyököket megköti, így a reperfúzió kezdeti szakaszában kialakuló (viii) arrhythmia (VF, VT) valószínűsége is csökkent.

További kísérleteinkben vizsgáltuk tocotrienol izomerek kardioprotektív hatását iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált szívokban. Megvizsgáltuk a szívfunkciók felépülését az infarktusz terület nagyságának, valamint az apoptotikus sejtek számának változását. Megvizsgáltuk a tocotrienolok hatását a proteaszóma aktivitásra, valamint az Akt és c-Src

expresszióra és foszforilációra. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a különböző izomereknek eltérő kardioprotektív hatása van, ami feltételezhetőleg a különböző mértékű c-Src gátlásra és/vagy proteaszóma stabilizációra vezethető vissza.

Kísérleteink során vizsgáltuk az adenocorticotrope hormon fragmens (ACTH 4-10) hatását a posztisztkémiás szívfunkciók felépülésére, a kaszpáz-3 aktivitásra, a kardiomiciták apoptózisára, valamint a HO-1 expresszióra. Azt tapasztaltuk, hogy 200 µg/kg ACTH (4-10) előkezelés jelentős mértékben javította a posztisztkémiás szívfunkciókat, csökkentette az infarktusz terület nagyságát, a kaszpáz aktivitást ezzel párhuzamosan pedig az apoptózist szenvedett sejtek számát a miokardiumban. Kísérleteink során a HO-1 enzim expressziójának fokozódását is tapasztaltuk, mely emelkedett CO termelésen keresztül szintén magyarázatot adhat az ACTH (4-10) kezelés hatására bekövetkező kardioprotektív hatásra. Feltétlenül meg kell azonban itt jegyezni, hogy az ACTH (4-10) hatása nem jelentkezett abban az esetben, ha közvetlenül a reperfúzió indításakor adtuk a szívhez.

A fentebb ismertetett, de teljes részletességgel nem ismertetett eredményeinkből 2007-2008-ban 5 db közlemény jelent meg, amelyeket a publikációk fejezetben feltüntettünk.

A pályázattal elnyert teljes összeget a pályázatban kitűzött célok elérése érdekében használtuk fel. A futamidő alatt két munkatárs, Túróczi Tibor és Dér Péter, elhagyta a tanszéket, feladataikat Váradi Judit, Lekli István és Samarjit Das Ph. D. hallgatók vették át, és végezték el. A kutatás teljes futamideje alatt megjelent publikációk száma 19, mely közlemények 2 db Ph.D. disszertáció alapjául szolgáltak a 2006-os és 2007-es esztendőben (Samarjit Das 2006, Váradi Judit 2007). A kutatás futamideje alatt két hazai és két nemzetközi szabadalmi bejelentést tettünk.

Debrecen, 2008. február 27.