

A szív és érrendszeri betegségek világszerte vezető halálokat képeznek. Jelenleg Európában, hazánkban is, és az Egyesült Államokban a szív- és érrendszeri betegségek az összhalálozás több mint 51 %-t teszik ki. A világ földrajzi régióit tekintve, a legtöbb fejlett országban a halálozás jelentősen csökkent, ugyanakkor a kelet-európai országokban, köztük hazánkban is, ez idő alatt a mortalitás drámaian emelkedett. Becslések szerint 2020-ra a fejlődő országokban is a lakosság jelentős részét fogja érinteni ez a betegség. A kardiovaszkuláris betegségek kétszer annyi áldozatot szednek, mint a rák. A leggyakoribb betegségek között is az első három helyen szerepelnek az ilyen típusú kórképek, melyeknek számos megjelenési formája létezik: szívinfarktus, angina pectoris, szívelégtelenség, ritmuszavar, érlemezésedés. Hazánkban 2005-ben közel 80000 beteg hunyt el keringési betegségben. Magyarországon jelenleg évente ~400 milliárd Ft-ot költünk a különböző kardiovaszkuláris megbetegedésben szenvedők (~2 millió fő) kezelésére, ezért szükségszerű ezzel a problémával törődnünk. A diabetes szövődményeként kialakuló kardiovaszkuláris betegségek egyre jelentősebb népegészségügyi problémát jelentenek világszerte. Éppen ezért nagyon fontos a cukorbetegség illetve a szív-, és érrendszeri betegségek közti kapcsolat felderítése, a molekuláris genetikai mechanizmusok vizsgálata a jobb és hatékonyabb terápiás lehetőségek felismerése, és kialakítása érdekében. A betegségcsoport népegészségügyi jelentőségére való tekintettel fontos azok molekuláris mechanizmusainak felderítése, a farmakológiai befolyásolási lehetőségek kutatása, amely tudományos jelentőségén túl új terápiás lehetőségeket is teremthet.

Bár a rezveratrol kardioprotektív hatása jól ismert, csak kevés adattal rendelkezünk cukorbetegséggel összefüggő, kardiovaszkuláris kórképekben kifejtett hatásáról. Ezért kísérleteink során halmozott rizikófaktorral rendelkező, elhízott és diabéteszes patkánymodellen kívántuk vizsgálni a rezveratrol hatásait.

#### Megvizsgáltuk a rezveratrol hatását a:

- a vércukor-, és inzulinszintre, valamint a testtömegre
- a postischaemiás szívfunkciók felépülésére (kamrafiibrillációk kialakulásának gyakorisága, szív frekvencia, coronaria átáramlás, aorta kiáramlás, kifejlődő bal kamrai nyomás, infarktusos terület nagysága)
- a GLUT-4 glükóztranszporterek transzlokációjára
- az endothelin expresszióra

Eredményeik alapján elmondhatjuk, hogy a rezveratrol az általunk alkalmazott 5 mg/ttkg-os dózisban még halmozott rizikófaktorok jelenléte esetén is jótékony hatással van a szívre, sőt a diabetes, illetve a metabolikus szindróma tüneteit is enyhíti. A rezveratrol hatására ugyanis az emelkedett vércukor szint értékek csökkentek, amelyben valószínűleg az játszik szerepet, hogy fokozódik a GLUT-4 glükóztranszporterek expressziója, illetve szintézise és ezáltal növekszik a sejtek glükóz felvétele a vérből. Azt tapasztaltuk, hogy csökkent a túlsúlyos állatok testtömege is, amely szintén előnyös, mivel így csökken a szív terhelése. Rezveratrol hatására jelentősen javult a szív postischaeмиás felépülése, csökkent a szívfrekvencia, nőtt a kifejlődő bal kamrai nyomás, fokozódott az aorta kiáramlás, és a coronária átáramlás. Mivel a rezveratrol csökkenti az endothelin-1 expresszióját, javul a szívszövet perfúziója, és csökken az infarktusos terület nagysága. A rezveratrol az arrhythmogén szabadgyököket megköti, így a reperfúzió kezdeti szakaszában kialakuló arrythmiák valószínűsége is csökken.

További kísérleteinkben összehasonlítottuk a Coenzyme Q10 (CoQ10) és Q9 (CoQ9) kardioprotektív hatását iszkémia/reperfúziónek kitett izolált, „dolgozó” tengerimalac szív preparátumokon. Az állatokat 3 csoportba osztottuk: kontrol, CoQ10-el kezelt, CoQ9-el kezelt 30 napon keresztül. A kezelések végén a szíveket kimetszettük és „dolgozó” perfúziós készülékkel perfundáltuk. Vizsgáltuk a kezelések hatásait a posztiszkémiás szívfunkciók felépülésére, a reperfúzió-indukálta arrhythmia előfordulására az infarktusos terület nagyságára, valamint a kardiomiociták apoptózisára. Meghatároztuk továbbá a szívek CoQ9 és CoQ10 tartalmát egyaránt műszeres analitikai technikával (HPLC, MS). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a CoQ9 és CoQ10 azonos kardioprotektív hatással rendelkeznek, ami megmutatkozott a szívfunkciók felépülésében, az arrhythmia előfordulásának, az infarktusos terület nagyságának és az apoptotikus sejtek számának csökkenésében. A szívek Q9 és Q10 tartalmának meghatározása rámutatott, hogy jelentős mennyiségű CoQ9 konvertálódott CoQ10-é. Ezen eredmény alapján elmondható, hogy a CoQ9 önmagában és CoQ10-é történő konvertálódás után is csökkentheti a szívizom iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokat megelőzve így a sejtelhalást.

A közelmúltban a mitokondriális glutaredoxin-2-ről (Glx2) kimutatták, hogy nagyon fontos redox regulátor az emlős szervezetben, így a szívben is. Tudomásunk szerint ez idáig nem végeztek olyan kísérleteket, melyekben a Glx2 potenciális szerepét vizsgálták különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Glx2 overexpressziója képes e megvédeni a szívszövetet az iszkémia/reperfúzió-indukálta apoptózissal és nekrozissal szemben. Glx2 transzgenikus és vad típusú egerekből izolált szíveket 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. A transzgenikus

egerekből izolált szívek posztisztkémiás felépülése jelentős mértékben jobb volt a vad típusúakkal összehasonlítva. A transzgenikus állatokból izolált szívben szignifikáns mértékben csökkent az infarktusos terület nagysága, az apoptotikus sejtek száma, valamint csökkent a citokróm C transzlokáció és a kaszpáz-3 és -9 aktivitás. Glrx2 overexpresszió következtében csökkent a mitokondriális kardiopin vesztés, a ROS-ok aktivitása, valamint egyensúlyban maradt a kardiális GSH/GSSH arány.

További kísérletekben megvizsgáltuk a szulfhidril (SH) csoportok peroxinitrit függő oxidációjának hozzájárulását a szívizomsejtek kontraktilitásának diszfunkciójához összehasonlítva a szintén SH-oxidáló tulajdonságú 2,2-dithiodipiridinnel (DTDP) permeabilizált bal kamrai humán kardiomiocitákon. A reverzibilitás vizsgálatára különböző antioxidánsokat használtunk: dithiothreitol (DTT), redukált glutathion (GSH), valamint N-acetyl-L-cysteint (NAC). Mértük a maximális izometrikus aktív erő ( $F_0$ ) kifejlődését és a „cross-bridge” ciklus maximális „turnover”-t ( $k_{tr,max}$ ). Az SH-csoportok oxidációját egy szemi-kvantitatív Ellman's assay-vel és SH-specifikus protein biotinilálással mértük. Mind a peroxinitrit, mind pedig a DTDP koncentrációfüggő módon, csökkentette az  $F_0$  értékét. Az  $F_0$  DTDP által okozott nullára csökkenésével párhuzamosan az SH csoportok teljes eliminációja történt, míg a peroxinitrit esetében a szabad SH-csoportok maximális csökkenése csak  $56 \pm 6\%$  volt a kontrolhoz (100%) viszonyítva. A 2,5 mM DTDP által kiváltott  $F_0$  és szabad SH-csoport csökkenés teljes mértékben visszafordítható volt DTT alkalmazásával. Ezzel ellentétben DTT csak részben állította vissza az  $F_0$  értékét a teljes protein SH tartalom visszaállítása ellenére, peroxinitrit kezelés után. Bár a DTT és a NAC egyformán hatásosnak bizonyult az  $F_0$  értékének helyreállításában peroxinitrit kezelés után, a NAC és a GSH nem volt képes helyreállítani sem a  $F_0$  sem a  $k_{tr,max}$  értékét DTDP kezelést követően.

Kísérleteink további részében két növényi hatóanyag a rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol hatását vizsgáltuk iszkémiás/reperfundált szíveken. Az állatokat 4 csoportba osztottuk az első rezveratrol, 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 posztisztkémiás szívfunkciója szignifikáns mértékben javult a monoterápiában részesültekhez képest. További vizsgálatainkból kiderült, hogy a két vegyület külön-külön is csökkentette az infarktusos terület méretét, valamint az

apoptózist, a kontroll csoporthoz képest. A kombinált kezelésben részesült csoportban további csökkenést tapasztaltunk. Ezek mellett Western-blot segítségével 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. Vizsgáltuk 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 rezveratrol és a  $\gamma$ -tokotrienol szinergikus hatást fejtenek ki a szívizomban. Ezen hatások részben a túlélési fehérjék, részben pedig az autofágia indukciójával magyarázhatóak. Következtetéseinket alátámasztják a Wortmannin (PI3 kináz inhibitor) kapott eredményeink is. Ugyanis Wortmannin kezelés hatására elmaradtak az észlelt pozitív hatások, ezzel összhangban csökkent a „túlélési” fehérjék valamint az autofágiás fehérjék szintje is.

Korábban kísérleteket végeztünk a meggybogyó „zsírtalanított”, szilárd frakciójával iszkémia/reperfúzióknak kitett izolált patkányszíveken (Bak I. et al., Am. J. Physiol., 2006.). A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a meggybogyó extrakt, az alkalmazott dózisokban, jelentős mértékben javította a posztisztkémias szívfunkciókat, valamint szignifikáns mértékben csökkentette a kamrai aritmiák kialakulását és az infarktusz terület nagyságát. Az észlelt kardioprotektív hatások molekuláris mechanizmusainak pontos felderítése érdekében elvégeztük a meggybogyó egyes hatóanyag frakcióinak izolálását, az ezekben található vegyületek azonosítását különböző műszeres analitikai technikák segítségével, és meghatároztuk az izolált frakciók gyökfogó kapacitását is. Azért, hogy megtudjuk érdemes-e tovább vizsgálni a meggybogyóval, toxicitási vizsgálatokat is végeztünk. Az állatok (n=6 csoportonként) 8 napon keresztül 0-3000 mg/kg közötti dózisban kapták a meggybogyó szilárd fázisát. Terminálás után megmértük a máj és vese tömegeket, illetve hisztológiai vizsgálatokat is végeztünk az említett szervek metszetein. A vesefunkciót a vér urea nitrogén és kreatinin mérésével, míg a májfunckiókat szérumban GOT, GPT és AlkPhos aktivitással határoztuk meg. Eredményeink alapján elmondható, hogy a meggybogyó az alkalmazott dózisokban nem mutatott toxikus hatásokat, így érdemes tovább foglalkozni vele, mivel korábban pozitív kardiovaszkuláris hatásokat tapasztaltunk. A továbbiakban megvizsgáltuk 3 további

természetes hatóanyag (Gingko biloba extrakt, astaxantin és c vitamin) együttadásának hatásait asztmával összefüggő gyulladás kezelésében, tengerimalacban indukált asztma modellben és az eredményeket összehasonlítottuk az ibuprofénnel, mint az egyik leggyakrabban alkalmazott nem szteroid gyulladáscsökkentővel. Az eredmények azt mutatják, hogy a 3 természetes hatóanyag alkalmazásával az ibuprofén kezelés kiváltható.

Korábbi eredményeink és az irodalom alapján bizonyított, hogy a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim központi szerepet játszik az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodások kivédésében. Ezért kísérleteinkben megvizsgáltuk HO-1 transzgenikus (Tg) és nem-transzgenikus (NTg) egerekből izolált szívek iszkémia/reperfúziós-károsodásokkal szembeni tolerabilitását. Azt tapasztaltuk, hogy a Tg állatokból izolált szívek posztisztkémias szívfunkciói (koronária kiáramlás (CF), aorta átáramlás (AF), aortanyomás (AOP) és az AOP első deriváltja) szignifikáns mértékben jobb volt a NTg csoporthoz viszonyítva. A Tg szíveknél tapasztalt pozitív hatásokat SnPPIX HO-1 inhibitor adása megszüntette. Mindhárom csoportban megfigyeltük a HO-1-hez kapcsolódó szénmonoxid (CO) termelést, amely jelentős mértékben emelkedett Tg iszkémia/reperfúzió (ISA/REP) kitett szívekben. Továbbá az ISA/REP következtében emelkedett  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  szintek csökkentek, míg a  $\text{K}^+$  veszteség jelentős mértékben csökkent a Tg csoportban, összehasonlítva a NTg és az SnPPIX-al kezelt csoporttal. A mért pozitív szívfunkciós eredmények hűen tükröződtek az infarktusz terület nagyságának, valamint a reperfúzió-indukálta aritmiák (VF, VT) csökkenésében egyaránt.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk a glutaredoxin-1 génterápia hatását diabeteses egerekből izolált szívekben. A diabetest egy intarperitoneális streptozotocin injekcióval váltottuk ki, a diabetes megerősítését követően a hím C57B1/J6 egereket három csoportba osztottuk és mellkas műtétet végeztünk. A műtét során glutaredoxin-1-et, LacZ-t kódoló, illetve üres vírust injektáltunk közvetlen a szívizomba. A műtét után négy nappal az állatok szívét izoláltuk és 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfúzióknak vetettük alá. Vizsgáltuk a balkamra funkciókat, az infarktusz területet és az apoptózis mértékét. A kísérletekben Western-blot és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk a génterápia sikerességét. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a glutaredoxin-1 génterápiát követően a szívek ellenállóbbak az iszkémia/reperfúzió-indukálta károsodásokkal szemben, erre bizonyíték az iszkémiá/reperfúziót követően jobb bal kamra funkció, kisebb infarktusz terület, és csökkent apoptózis. Az apoptózis eredményekkel egyetértésben magasabb prokaspáz-3 szintet detektáltuk a glutaredoxin-1-el kezelt csoportban. Western-blot eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a glutaredoxin-1 génterápia megakadályozza az Ask-1, Jnk, p38 MAPK

útvonal aktiválódását és a c-Src foszforilálódását, ezzel gátolja az iszkémia/reperfúzió indukálta „halál” útvonal beindulását még diabeteses körülmények között is. Ezek mellett a glutaredoxin-1 génterápia növelte az Akt/FoxO-1 „túlélési” útvonal aktivitását, valamint fokozta a hemoxygenáz-1 és az endoteliális nitrogén monoxid szintáz expresszióját. Összegzésként elmondhatjuk, hogy a glutaredoxin-1 génterápiában részesült szívek ellenállóbbak, mint a kontrollként szolgált szívek iszkémia/reperfúzió indukálta károsodásokkal szemben diabeteses körülmények között is.

Bár a rezveratrol kardioprotektív hatása jól ismert, az alkalmazandó dózis, illetve biológiai hasznosíthatóság szempontjából nincs közös álláspont. Ezért további kísérletekben megvizsgáltuk egy rezveratrol tartalmú készítmény hatásait iszkémia/reperfúzióknak kitett szívekben, mely a rezveratrolon kívül tartalmazott még 5% kvercetin és 5% rizskorpát (Longevinex<sup>®</sup>) is, melyek növelik a rezveratrol biológiai hozzáférhetőségét. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelésen átesett állatokból izolált szívek sokkal ellenállóbbak voltak az iszkémia/reperfúziós károsodásokkal szemben, ami a jobb szívfunkciókban, illetve csökkent infarktusos területben jelentkezett, melynek háttérében túlélési jelátviteli útvonalak indukálódása áll. Ezt támasztja alá, hogy a Bcl2/Bax arány emelkedését és fokozott AKT foszforilációt mértünk.

Újabb eredmények arra engednek következtetni, hogy a vaszkuláris kalcifikáció kapcsolatba hozható az atherosclerosis, diabetes, illetve krónikus vesebetegség kialakulásával. A humán vaszkuláris simaizomsejtek az emelkedett szervetlen foszfát koncentrációra válaszul mineralizáción mennek keresztül egy jól szabályozott folyamat során, ami emelkedett alkalikus foszfát aktivitást és a „core binding factor”  $\alpha$ -1 (CBF- $\alpha$ 1) transzkripciós faktor emelkedett expresszióját és következésképpen az osteokalcin indukcióját foglalja magába. Már bizonyított, hogy a nagymértékű alkohol bevitel kapcsolatban van a koronária artériák nagyobb mértékű kalcifikációjával. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az etanol megváltoztatja-e a vaszkuláris simaizomsejtek magas szervetlen foszfát koncentráció által kiváltott mineralizációját. A sejtek etanollal történő kezelése dózis-függő módon növelte az extracelluláris mátrix kalcifikációját jelentős mértékű kalcium lerakódást eredményezve. A sejtek kalcifikációja emelkedett alkalikus foszfát aktivitással párosult. Az etanol kezelés jelentős mértékben fokozta az osteokalcin szintézisét is. Elmondható továbbá, hogy az etanolnak kitett sejtekben emelkedett a CBF- $\alpha$ 1 expressziója.

A leptinről közismert, hogy kardidepresszív hatása van, valamint, hogy balkamrai remodellinget indukál. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az infarktust követő miokardiális leptin expresszió változását. Érzéstelenítést követően az állatokban ideiglenes koronária okklúziót

idéztünk elő, majd 5 nappal a műtétet követően, az infarktusos terület határára intramiokardiálisan leptin mRNS elleni antisense oligodezoxinukleotidot (AS ODN) injektáltunk. Az állatok szívét 11 héten keresztül echokardiográffal monitoroztuk. A miokardiális leptin valamint különböző citokinek (IL-1 $\beta$  és IL-6) mennyiségét ELISA-val határoztuk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy a szív leptin koncentrációja az infarktust követő 7. napon a legmagasabb, valamint hogy az intramiokardiális leptin-AS ODN injekció csökkenti az IL-1 $\beta$  és IL-6 expressziót, valamint jelentős mértékben hozzájárul a szív kontraktilis funkciójának megőrzéséhez. Ezek az eredmények egy új terápiás lehetőség alapját képezhetik a továbbiakban.

Eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be, valamint számos nemzetközi folyóiratban publikáltuk. Az eredmények alapján 1 db szabadalmi bejelentés jelenleg folyamatban van. Ennek tárgyát egy új funkcionális élelmiszerként piacra vezethető termék képezi, melynek kifejlesztése és OÉTI általi engedélyeztetése folyamatban van.