

A szívizom iszkémiás megbetegedéseiben az iszkémia/reperfúzió jelenségének központi szerepe van. A reperfúzió folyamán keletkezett szabad gyökök által okozott fokozott oxidatív stresszt tartják a reperfúzió indukálta károsodások egyik fő összetevőjének. Az egyik leggyakrabban alkalmazott antioxidáns, a béta-karotin melynek kardiovaszkuláris hatásival kapcsolatban több klinikai vizsgálatot is végeztek, azonban ezek meglehetősen ellentmondásosak. Egyes tanulmányok azt mutatják, hogy a dohányzók körében, akik esetében a plazma karotin szintje emelkedett volt, a halálozás nőtt az alacsonyabb plazma karotin szintű csoporthoz képest. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a béta-karotin oxidációját *in vitro*. Különböző koncentrációban alkalmazott oxidálószer (NaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), valamint Fenton-reakció segítségével oxidáltuk a béta-karotint. Megvizsgáltuk az oxidációs reakciók idő és koncentráció függését is. Eredményeink alapján elmondható, hogy 3 féle termék fokozott képződését tapasztaltuk. Megfigyeltük továbbá, hogy más termékek képződése fokozott a különböző oxidálószer esetében, valamint, hogy az oxidálószer koncentrációjának emelése egy idő után nem eredményezi a képződött termékek koncentrációjának emelkedését. Ugyanez elmondható a reakcióidő növelésével kapcsolatban is. Megvizsgáltuk a béta-karotin, meggy-mag extrakt (MME) és ezek kombinált kezelésének hatását különböző szövetek totál antioxidáns kapacitására (TAC). Azt tapasztaltuk, hogy a MME kezelés jelentős mértékben emelte a vizsgált szövetek TAC értékét, míg a béta-karotin kezelés kisebb mértékű növekedést eredményezett. Érdekes, hogy a béta-karotin kezelés hatására a tüdő TAC értéke szignifikáns módon csökkent a kontrolhoz viszonyítva. A kombinált kezelés nem mutatott szinergista hatást, sőt alacsonyabb TAC értékeket kaptunk a különálló kezelésekhöz képest. Vizsgáltuk továbbá a béta-karotin citotoxikus hatását A549 és H9C2 sejteken. Húsz µM béta-karotin kezelés jelentős mértékű sejtpusztulást eredményezett A549 tüdő epithel sejteken, ami kisebb mértékben jelentkezett a kardiomiociták esetében. A549 sejtek esetén 5 µM béta-karotin kezelés szignifikáns mértékű védő hatást mutatott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta sejtpusztulás ellen, míg a H9c2 sejteken 10 µM bizonyult hatásosnak. Magasabb koncentrációjú béta-karotin kezelés nem mutatott jelentős védőhatást. Ezen eredményeinkből egy kézirat előkészületben van, melyet a „Toxicology in vitro” című folyóirathoz kívánunk benyújtani. Készült továbbá 1 db poszter és 2 db diplomamunka.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk a hosszú távú nagy dózisú béta-karotin kezelés hatását Zucker-obese patkányokon. Az állatokat 4 hétig kezeltük alacsony- és magas-dózisú béta-karotinnal. A kezeléseket előtt, felénél és végén terheléses vércukormérést végeztünk. Majd a szíveket izoláltuk, dolgozó-perfúziós készülékkel perfundáltuk, 30 perc iszkémiának

ezután 120 perc reperfúziónak vetettük alá. Azt tapasztaltuk, hogy normál dózisú kezelés mind egészséges, mind beteg állatokban javította a posztisztkémiás szívfunkciókat. Az egészséges állatok szívfunkció értékeit a magas dózisú béta-karotin kezelés rontotta. A kezelt beteg állatok esetében szignifikánsan alacsonyabb vércukor értékeket tapasztaltunk a nem kezelt beteg csoporthoz képest, dóziszfüggetlen módon. Az egészséges állatok vércukor értékeiben nem figyeltünk meg változást a kezelések következtében, nem mutattak eltérést a nem kezelt egészséges állatok értékeihez képest. A szívek infarktusz területeit kiértékelve az alacsony dózisú kezelések hatására jelentősen csökkent az infarktus mértéke a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Megjegyzendő továbbá, hogy a magas dózisú kezelés a beteg állatokban nem okozott változást, egészséges egyedek esetén az infarktusz terület kismértékű emelkedését. Meghatároztuk a szívszövetek hemoxigenáz-1 szintjében bekövetkező változásokat is. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy alacsony dózisú béta-karotin kezelés hatására emelkedik a HO-1 expresszió, míg magas dózis esetén nem. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy alacsony dózisú béta-karotin kezelés alkalmas lehet iszkémiás szívkárosodások mértékének mérséklésére, valamint II-es típusú diabetesben a vércukor értékének csökkentésére, azonban a folyamat molekuláris mechanizmusainak feltárása további kísérletes munkát igényel. Ezen eredményeinkből egy kézirat előkészületben van. Készült továbbá 1 db nemzetközi és 1 db hazai konferencián bemutatott poszter, valamint 1 db diplomamunka.

Kísérleteink következő részében megvizsgáltuk, hogy a MME alkalmas lehet e különböző gyulladási betegségek kezelésére. Kettes típusú diabéteszes és egészséges alanyokból perifériás vér mononukleáris sejteket izoláltunk, majd 24 órán keresztül 100 ng/ml lipopoliszahariddal, valamint lipopoliszahariddal és 0,5-100 µg/ml MME-tal kezeltük. A sejtenyészeteket ezt követően áramlási citometriával vizsgáltuk, valamint meghatároztuk a HO-1 szintekben bekövetkezett változásokat is. Azt tapasztaltuk, hogy a MME az alkalmazott dózisokban jelentős mértékben csökkentette a lipopoliszaharid-indukálta gyulladást minden mintában. Ezzel párhuzamosan a MME kezelés emelte a HO-1 szinteket. Eredményeink alapján elmondható, hogy a MME alkalmas a gyulladás mértékének csökkentésére, amit részben a HO-1 enzim expresszió indukálásán keresztül fejt ki. A folyamat molekuláris hátterének pontosabb megismerése további kísérleteket igényel. Eredményeinkből 1 db közlemény készült.

A meggy-mag-kivonat kardioprotektív hatásait korábban már igazoltuk azonban az ezt indukáló molekuláris mechanizmusok tisztázására még nem került sor. Ezért kísérleteink során a továbbiakban ezt kívántuk vizsgálni. Hím Sprague Dawley patkányokat 8 héten át

kezeltünk per os 30 mg/kg/nap dózisú meggy-mag-kivonattal, míg a kontroll állatok vivőanyagot kaptak. A kezelés után az állatokat elaltattuk, a szíveket izoláltuk, majd 30 perc iszkémiának és 120 perc reperfüzióknak vetettük alá. A kísérletek végén meghatároztuk az infarktusos területek nagyságát, az apoptózis mértékét, valamint Western Blot és MDA analízist végeztünk. Harminc perc iszkémiát és 120 perc reperfüziót követően a kezelt állatok szívében szignifikánsan magasabb posztiszkémiás szívfunkciókat regisztráltunk a kontrolcsoporthoz viszonyítva. A kardioprotektív hatásokat tovább erősítette a kisebb infarktusos terület, valamint az alacsonyabb mértékű apoptózis a kezelt csoportban. A TUNEL assay-vel összhangban alacsonyabb citoszolikus citokróm c szintet detektáltunk a kezelt állatokból származó mintákban. Western Blot vizsgálatokban jelentősen magasabb Bcl-2, valamint alacsonyabb Bax szintet mértünk a kezelt csoportban a kontrollhoz képest, ami tovább erősíti a meggy-mag-kivonat antiapoptotikus hatását. Továbbá, a p-Akt és a hemeoxigenáz-1 szintje is megnövekedett a meggy-mag-kivonattal kezelt állatok szívében. Végül a kezelt állatok mintáiban csökkent MDA szintet mértünk a kontrollhoz képest, ami csökkent lipidperoxidációra utal. Ezen eredményekből egy kézirat előkészületben van, valamint 5 db nemzetközi és 1 db hazai konferencián poszter prezentáció került bemutatásra.

A meggy-mag esetleges terápiás alkalmazását jelentősen korlátozhatja annak toxikus volta. Ezért, hogy megtudjuk, érdemes-e tovább vizsgálni a meggy-maggal, toxicitási vizsgálatokat is végeztünk. Az állatok (n=6 csoportonként) 8 napon keresztül 0-3000 mg/kg közötti dózisban kapták a meggy-mag 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 májfunkciókat szérumban GOT, GPT és AlkPhos aktivitással határoztuk meg. További kísérletekben megvizsgáltuk a meggy-mag olajos fázisának hatását UVB-sugárzásnak kitett bőrön. Hím Hartley-tengerimalacok bőrét 0, 1%, 2%, 3% és 5%-os olajat tartalmazó szuszpenzióval kentük be, majd UVB-sugárzásnak tettük ki. Azt tapasztaltuk, hogy az UVB-sugárzás okozta bőrkárosodás koncentrációfüggő módon csökkent, vagyis a meggy-mag-olaj képes lehet a UV-sugárzás káros hatásainak csökkentésére. Eredményeink alapján elmondható, hogy a meggy-mag szilárd fázisa az alkalmazott dózisokban nem mutatott toxikus hatásokat, így érdemes tovább foglalkozni vele, mivel korábban pozitív kardiovaszkuláris hatásokat tapasztaltunk. Az olajos fázis pedig alkalmas lehet az UV-sugárzás okozta oxidatív károsodások hatásainak csökkentésére. További kísérleteinkben pedig megvizsgáltuk a meggy-mag extrakt mutagénitását is patkány hepatocitákon. Tíz µl patkány hepatocita szuszpenziót 30 percig 37 °C-on inkubáltunk 10, 20, 250 és 1000 µg/ml koncentrációjú

meggy-mag-extraktummal, majd comet-assay segítségével vizsgáltuk a mutagenitást. Az eredmények alapján elmondható, hogy a meggy-mag-extrakt alacsony mutagenitási indexsel rendelkezik, ami a magasabb koncentráció tartományban mutatott kismértékű mutagenitást. Ezen előzetes eredmények alapja lehetnek a meggy-mag-extrakt terápiás hasznosíthatósági vizsgálatainak. A továbbiakban elvégeztük a meggy-mag kivonat kis esetszámú (n=6) rövid időtartamú (14 nap) alacsony dózisu (250 mg/nap) humán kipróbálását is. A vizsgálat elsődleges célja az esetlegesen jelentkező toxikus mellékhatások kiszűrése volt. Eredmények alapján nem találtunk semmilyen vizsgált hematológiai paraméterben toxicitásra utaló mellékhatást, illetve a vizsgálati alanyok sem számoltak be semmilyen nem kívánt hatásról. Ebben a dózisban alkalmazva a meggy-mag kivonat tehát nem rendelkezik toxikus mellékhatásokkal, azonban ebben a dózisban a kivonat állatokban tapasztalt jótékony hatásai sem mutatkoznak egyértelműen, igaz a dózis jóval alatta marad az ott alkalmazottaknak. Ezen eredményeinkből 1 db közlemény, 1 db hazai konferencia poszter, 1 db hazai konferencia előadás készült. További egy közlemény előkészületben van, valamint 1 db szabadalmi bejelentést is tettünk.

A hem oxigenáz-1 (HO-1), mely 32-es hő sokk fehérjeként is ismert (HSP-32), a HO család indukálható formája. Korábbi kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a meggy-mag kivonat képes a HO-1 enzim expressziójának és működésének indukálására. Kísérleteinkben a HO-1 szerepét vizsgáltuk az iszkémia/reperfúzió-indukálta kamra fibrillációk kialakulásának megelőzésében és az infarktusos terület nagyságának csökkentésében. Kísérleteinkhez HO-1 transzgenikus (Tg) egereket használtunk, melyeket patkány HO-1 genomikus transzgenével állítottuk elő. A Tg és nem-transzgenikus (NTg) egér szíveket izoláltuk, 20 perc normotherm, globál iszkémiát követően 120 perc reperfúziónak tettük ki. A kísérletek teljes ideje alatt regisztráltuk az epikardiális elektrokardiogramot (EKG). Az EKG-kat analizáltuk, hogy meghatározzuk a ventricularis fibrillatio (VF) előfordulási gyakoriságát. A reperfúzió végén az infarktusos terület nagyságát TTC módszer segítségével mértük, valamint immunhisztokémiai festéssel megvizsgáltuk a HO-1 expresszió változását. Eredményeink tovább bizonyítékokat szolgáltatnak a HO-1 kardioprotektív hatásával kapcsolatban, mely a kamrai fibrillációk előfordulási gyakoriságának és az infarktusos területek mértékének csökkenésében mutatkozott meg. Eredményeinket 1 db hazai konferencia előadásban, valamint 1 db hazai és 1 db nemzetközi konferencián poszter prezentáció formájában ismertettük.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy van-e kapcsolat a kamrai fibrilláció és az autofágia folyamata között. Izolált egérszíveket iszkémia/reperfúziónak tettünk ki, majd a

szíveket két csoportra osztottuk, attól függően, hogy a reperfúzió kezdetén kialakult vagy nem kamrai fibrilláció. Western blot segítségével vizsgáltuk az autofágiához köthető LC3B, ATG-5, ATG-7, ATG-12, Bcl-2 és Beclin-1 proteinek szintjét. Azt tapasztaltuk, hogy a Beclin-1, valamint az LC3B-II/LC3B-I arány (mindkettő az autofágia ismert biomarkere) jelentős mértékben emelkedett a fibrilláló szívizomban a nem fibrilláló szívekkel összehasonlítva. Megfigyeltük továbbá, hogy a Bcl-2 szintje, annak ellenére, hogy a fő regulátora a Beclin-1-nek, nem emelkedett jelentős mértékben a fibrilláló szívekben. Megjegyzendő továbbá, hogy az Atg7 expressziója szintén növekedett a fibrilláción átesett szívekben, azonban ez nem volt statisztikailag szignifikáns mértékű. Mindezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy van kapcsolat a kamrafibrilláció kialakulása és az autofágia folyamat között, azonban ennek pontosabb felderítéséhez további kísérletekre van szükség. Eredményeinkből 1 db közlemény, 1 db konferencia közlemény és 1 db hazai konferencián bemutatott poszter készült.

Szervezetünkbe naponta nagy mennyiségben kerülnek különböző testidegen anyagok a környezetből. Ezek közé tartoznak a gyógyszerek is, melyeknek azonban gyakran lehetnek mellékhatásai is. Ezért a mesterséges származékok természetes hatóanyagokkal történő kiváltása egyre nagyobb hangsúlyt kap a gyógyszeres kezelések során. További kísérleteinkben megvizsgáltuk három természetes eredetű hatóanyag, a kínai páfrányfenyő (*Ginkgo biloba*) levél kivonat (EGb761), a karotinoidok közé tartozó astaxantin és a C-vitamin, különböző kombinációkban történő együttadásának hatásait, ibuprofénrel összehasonlítva, asztmához kapcsolódó gyulladási folyamatokban, tengerimalac asztma modellben. Hartley tengerimalacokat ovalbuminnal szenitizáltuk majd ovalbumin aeroszol belélegeztetésével indukáltuk az asztmát. A kezelések után a bronchoalveoláris folyadékban meghatároztuk a gyulladási sejtek számát, a tüdőszövetből pedig a ciklikus nukleotid koncentrációkat. Eredményeink alapján elmondható, hogy a három hatóanyag kombinációja hatásosabb volt, mint amikor azokat külön-külön alkalmaztuk. A legoptimálisabb összetétel a következő volt: astaxantin (10 mg/kg), C-vitamin (200 mg/kg) és EGb761 (10 mg/kg), mely mind az eosinofilek mind a neutrofilek számának 1,6 x, míg a makrofágok számának 1,8 x mértékű csökkenését eredményezte. A cAMP szintek 1,4 x, míg a cGMP szintek 2,04 x voltak magasabbak a kezeltlen asztmás csoporttal összehasonlítva. Elmondható továbbá, hogy a kombinált kezelés azonos vagy nagyobb hatékonysággal csökkentette a gyulladást, mint az ibuprofén, az egyik leggyakrabban alkalmazott nem-szteroid gyulladásgátló vegyület. Ezen eredményeink arra engednek következtetni, hogy különböző természetes eredetű hatóanyagok alkalmazásával a különböző szintetikus készítmények alkalmazása csökkenthető vagy esetleg

elhagyható, eliminálva azok potenciális toxikus mellékhatásait. Ezen eredményeinkből 1 db közlemény jelent meg.

A pályázat támogatásával 5 db nemzetközi közlemény és 1 db konferencia közlemény született, valamint további 4 db előkészületben van. Eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián is ismertettük, melyeken 16 db poszter prezentációt és 2 db előadást mutattunk be, valamint 1 db szabadalmi bejelentést tettünk.