

A metabolikus kardiovaszkuláris rizikófaktorok és az iszkémia/reperfúziós károsodás csökkentése: fókuszban a természetes vegyületek

PhD értekezés összefoglalója

Dr. Demján Virág

Témavezető:

Dr. Csont Tamás PhD

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Metabolikus Betegségek és Jelátvitel Kutatócsoport

Biokémiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2021

Publikációk listája

1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Cikkek:

- I. **Demján V.**, Kiss T., Siska A., Szabó M. R., Sárközy M., Földesi I., Csupor D., Csont T. Effect of *Stellaria media* tea on lipid profile in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020, 2020:5109328, doi:10.1155/2020/5109328 [Q1, IF: 2.629]
- II. **Demján V.**, Sója A., Kiss T., Fejes A., Gausz F. D., Szűcs G., Siska A., Földesi I., Tengölics R., Darula Zs., Csupor D., Pipicz M., Csont T. *Stellaria media* tea protects against diabetes-induced cardiac dysfunction in rats without affecting glucose tolerance. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.08.003> [D1]

Konferencia prezentáció:

- III. **Demján V.**, Gáspár R., Csont T. Effects of modulation of NMDA receptors in ischemia/reoxygenation injury of cardiac cells. *Cardiologica Hungarica*, 2020 Scientific Congress of the Hungarian Society of Cardiology, Experimental Cardiology II. section, Supplementum D, Vol 50., p. 163.

2. Az értekezéshez nem kapcsolódó cikkek

- I. Pipicz M., **Demján V.**, Sárközy M., Csont T. Effects of Cardiovascular Risk Factors on Cardiac STAT3, *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19(11):3572, [Q1, IF: 5.923]

1. Bevezetés

1.1. Kardiovaszkuláris betegségek és iszkémiás szívbetegség

A kardiovaszkuláris megbetegedések, különösen a szív vérellátási zavarával járó iszkémiás szívbetegségek és köztük az akut miokardialis infarktus világszerte vezető halálokok. Az ateroszklerózis és ahhoz társuló iszkémiás szívbetegség kialakulásában nem befolyásolható és befolyásolható rizikófaktorok egyaránt szerepet játszanak. A befolyásolható rizikófaktoroknak nagyobb klinikai relevanciája van és ezek kezelése kulcsszerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésében.

1.2. Hiperkoleszterinémia és diabétesz: metabolikus kardiovaszkuláris rizikófaktorok

A hiperkoleszterinémia és a diabétesz magas prevalenciájuk miatt különösen fontosak, továbbá ezen metabolikus betegségek önmaguk is kedvezőtlenül befolyásolják a szívfunkciót az érlemezésedéstől függetlenül.

A hiperkoleszterinémia egy magas vér összcholesterinszinttel jellemezhető anyagcsere betegség. A koleszterin felhalmozódhat a szív koszorús ereinek falában érlemezésedést, plakk képződést okozva, amely következményesen csökkent szív vérellátáshoz és ezáltal oxigén- és tápanyaghiányhoz vezethet. Súlyos esetekben hirtelen plakkruptúra, majd trombus képződés következhet be, mely akut miokardialis infarktus kialakulásához vezet.

A diabétesz egy magas vércukorszinttel és károsodott glükóz toleranciával járó metabolikus betegség. A diabétesz az erek funkcionális és strukturális változásait okozva hozzájárul az endotél diszfunkcióhoz és az érlemezésedés kialakulásához. Megfelelő terápia hiányában számos makro- és mikrovaszkuláris komplikáció, például diabéteszes kardiomiopátia alakulhat ki.

1.3. Akut miokardialis infarktus és iszkémia/reperfúziós károsodás

Az akut miokardialis infarktus az iszkémiás szívbetegség egyik fő manifesztációja. A koronáriaerek elzáródását a legtöbb esetben ateroszklerotikus plakk ruptúra talaján kialakuló trombusképződés okozza, mely elzárja a normál véráramlást és ezáltal iszkémiás károsodást okoz. A terápiában az elsődleges cél a vérellátás mielőbbi helyreállítása, azaz a reperfúzió, hogy megelőzzék a további sejtelhalást és csökkentsék az infarktusméretet. Azonban nemcsak az iszkémiás periódus okoz szövetkárosodást, hanem maga a reperfúziós terápia további sejtelhalást okozhat, tehát összességében egy iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás alakul ki.

A kialakuló I/R károsodás súlyosságának mérséklése citoprotektív farmakológiai ágensekkel az iszkémiás szívbetegség egyik ígéretes terápiás megközelítése lehet, hogy javuljon a betegség klinikai kimenetele.

1.4. Természetes vegyületek: az iszkémia/reperfúziós károsodás megelőzésének és kezelésének potenciális eszközei

A gyógynövények és a szervezetben szintetizálódó endogén molekulák tartoznak a természetes vegyületek közé, melyek ígéretesek lehetnek az iszkémiás szívbetegek rizikófaktorainak csökkentésében és a citoprotekció kiváltásában. A szintetikus gyógyszerekkel szemben előnyük a jobb tolerálhatóság, a kevesebb mellékhatás és a komplex hatásmechanizmus.

1.4.1. *Stellaria media*

Manapság a farmakoterápia mellett egyre népszerűbbek a gyógynövények számos metabolikus betegség, például a hiperkoleszterinémia és a diabétesz megelőzésében és kezelésében. A népi hiedelem szerint a közönséges tyúkhúr (*Stellaria media*) teaként fogyasztva javítja az általános metabolizmust, normalizálja a magas koleszterinszintet, csökkenti a vércukorszintet, ezáltal adjuváns terápia lehet a betegek számára. A népgyógyászatban a növény föld feletti részét használják tea formájában. A legújabb fitokémiai és farmakológiai kutatások eredményei szerint, számos *Stellaria* faj rendelkezik jelentős farmakológiai hatásokkal (pl. antibakteriális, anti-inflammatorikus, antiallergiás hatás). Azonban nincs olyan megbízható kísérletes vagy klinikai bizonyíték, mely alátámasztja a *Stellaria media* tea koleszterinszint-csökkentő és antidiabetikus hatását.

1.4.2. *Kinurénsav*

A citoprotektív hatású endogén molekulák nagy jelentőséggel bírhatnak az I/R károsodás mérséklésében. Egy ígéretes molekula lehet a nemrég megismert citoprotektív hatással rendelkező kinurénsav, mely a triptofán aminosav lebontása során képződik. Kimutatták neuroprotektív, anti-inflammatorikus és antioxidáns hatását, valamint hogy csökkenti az infarktusz méretet *in vivo* egér miokardiális I/R károsodás modellben. Azonban a kardioprotektív hatás háttérében álló molekuláris mechanizmusok még nem tisztázottak. Az egyik elméleti lehetőség a receptor-mediálta hatás és érintett jelátviteli útvonalak modulálása. A kinurénsav antagonistá hatású az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon, melyek nemcsak az idegrendszerben találhatóak meg, hanem a szívben is. Irodalmi adatok szerint az NMDA receptor aktiváció fokozza az I/R károsodást stroke-ban és kardiomiocita apoptózist indukál. Ezen adatok alapján az NMDA receptor antagonizmus egy lehetséges mechanizmus lehet a kinurénsav kardioprotektív hatásának háttérében.

2. Célkitűzés

Jelen értekezésben célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a természetes vegyületek szerepét az iszkémiás szívbetegség megelőzésében és kezelésében két különböző megközelítést alkalmazva: i) csökkenteni a befolyásolható metabolikus kardiovaszkuláris rizikófaktorok súlyosságát és káros kardiális következményeiket, valamint ii) citoprotekciót kiváltani az I/R károsodás mérséklése érdekében.

1. Rizikófaktorok csökkentése

A befolyásolható rizikófaktorok kezelése nagy szerepet játszik az iszkémiás szívbetegség megelőzésében, beleértve az akut miokardiális infarktust. A két fő metabolikus kardiovaszkuláris rizikófaktor, a hiperkoleszterinémiát és a diabéteszt állítottuk kutatásaink középpontjába. A népi gyógyászat szerint a *Stellaria media* tea csökkenti vér koleszterin és glükóz szintjét, azonban nincs megbízható tudományos bizonyíték, mely alátámasztja ezeket a feltételezett hatásokat. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *Stellaria media* tea potenciális terápiás hatásosságát két különböző *in vivo* állatkísérletben: i) hiperkoleszterinémia modellben, hogy megvizsgáljuk a tea koleszterinszint-csökkentő hatását és ii) experimentális diabéteszben, hogy tisztázzuk a glükóz-homeosztázisra kifejtett hatását. A hiperkoleszterinémiára és diabéteszre gyakorolt terápiás hatásosság mellett ezekben a metabolikus betegségekben vizsgáltuk a gyógynövény kezelés szív-morfológiát és -funkciót befolyásoló hatását is.

2. Citoprotekció kiváltása I/R-ben

Az I/R károsodás következtében kialakuló sejtelhalás csökkentése citoprotektív ágensekkel egy fő terápiás megközelítés, hogy minimalizáljuk a kialakuló szív-károsodást. Kutatásaink során a kinurénsav, egy természetes triptofán metabolit hatásait vizsgáltuk, melyről kardioprotektív hatást írtak le, azonban a molekuláris mechanizmusok még nem tisztáztak. Ezért célul tűztük ki, hogy megerősítsük a kinurénsav protektív hatását kardiomioblaszt sejteken *in vitro* szimulált I/R modellben, valamint hogy megvizsgáljuk az NMDA receptor antagonizmus lehetséges szerepét a kinurénsav által kiváltott kedvező hatásokban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Stellaria media* tea jellemzése

3.1.1. *Stellaria media* tea készítése

A növényt megszáritottuk, elporítottuk és forrásban lévő vízzel (1:10 w/v arányban) 15 percig ultraszonikációval kivonatot készítettünk. A nagy sűrűségű kivonatot mechanikai nyomással elválasztottuk a szilárd részecskéktől és a vizes kivonatot liofilizáltuk.

3.1.2. Teljes flavonoid tartalom és flavonoid screening meghatározás

A *Stellaria media* tea teljes flavonoid tartalmát quercetin ekvivalensként (QE) határoztuk meg alumínium-kloridos kolorimetriás módszerrel, UV-VIS spektrofotométerrel történő abszorbanciaméréssel. A gyakran előforduló flavonoidok, az apigenin, apigenin-7-glikozid, kaempferol, luteolin, quercetin és rutin jelenlétét a liofilizált *Stellaria media* vizes kivonatban ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiával (UPLC) vizsgáltuk.

3.1.3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

A vizes kivonatot nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) analízisnek vetettük alá nanoUPLC rendszer segítségével, mely online egy tömegspektrométerhez kapcsolódott. Az effluentet analizáltuk. Az MS2 adatokat ezt követően összevetettük az MzCloud adatbázis könyvtárával a Compound Discovery software segítségével.

3.1.4. A *Stellaria media* tea *in vitro* antioxidáns aktivitásának vizsgálata

A szabadgyökfogó képességet DPPH módszerrel vizsgáltuk. Valamint oxigéngyök elnyelő kapacitás (ORAC) eljárást alkalmaztunk fluoreszcenciaméréssel. Standardként troloxot használtunk. Az antioxidáns kapacitást $\mu\text{mol Trolox Equivalens/g}$ száraz kivonatként adtuk meg.

3.2. *Stellaria media* tea hiperkoleszterinémiára és szívfunkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata

3.2.1. Kísérleti állatok

A kísérlet megfelel a laboratóriumi állatok ellátásáról és felhasználásáról szóló irányelvnek, valamint szigorúan betartottuk az 1998-as XXVIII számú magyar szabályozásokat az állatok védelméről. A tanulmányt a Szegedi Tudományegyetem helyi etikai bizottsága engedélyezte (XV.1181/2013). 24 felnőtt (8 hetes) hím Wistar patkányt használtunk, melyek a kísérlet kezdetén 270–324 g tömegűek voltak. Az állatokat standard körülmények között (22 ± 2 °C szobahőmérséklet, 12 h fény/sötét ciklus), párban tartottuk egyedileg szellőztetett ketrecekben és *ad libitum* hozzáférést biztosítottunk számukra a táphoz és csapvízhez.

3.2.2. Kísérleti elrendezés

A patkányokat kontroll, hiperkoleszterinémia (HChol) és hiperkoleszterinémia+*Stellaria media* (HChol+*Stellaria media*) csoportba randomizáltuk. A kontroll patkányok (n=8) standard laboratóriumi tápot kaptak. A másik 16 állatot egy speciális koleszterinnel dúsított táppal etettük (2% koleszterin és 0,25% nátrium-kolát-hidrát) 8 hétig, hogy experimentális hiperkoleszterinémiát váltsunk ki. A koleszterinnel dúsított táppal etetett állatok közül 8 állat *Stellaria media* tea liofilizátumot kapott tésztagolyóba gyúrva (HChol+*Stellaria media*). A nyolcadik héten az állatokat nátrium-pentobarbitállal (Euthasol, 50 mg/ttkg, ip.) elaltattuk és vért vettünk a hasi aortából a szérum lipid profil vizsgálatára. Terminálás előtt echokardiográfiát végeztünk, hogy megvizsgáljuk az experimentális hiperkoleszterinémia és a *Stellaria media* hatását a kardiális morfológiára és funkcióra.

3.2.3. *Stellaria media* tea adagolása

A *Stellaria media* tea dózisa 100 mg/ttkg volt, mivel ezt tekintik a humán napi dózissal ekvivalensnek. A HChol+*Stellaria media* csoportban lévő patkányok naponta egyszer tésztagolyóba gyúrt liofilizált *Stellaria media* teát kaptak. A tésztagolyó (2 g/ttkg/nap) 55% lisztet, 20% porcukrot és 25% vizet tartalmazott. Az egyhetes akklimatizációs periódus során a patkányokat hozzászoktattuk a tésztagolyóhoz és megtanítottuk őket, hogy önként fogadják el a tésztagolyót a ketrecükben.

3.2.4. Szérum lipid szintek mérése

A szérum összkoleszterin-, HDL koleszterin-, és triglicerid-szinteket Roche enzimatis kolorimetriás esszékkel mértük. Az LDL koleszterin szinteket plate readerre adaptált kit segítségével detektáltuk.

3.2.5. Transztorakális echokardiográfia

A kardiális morfológiát és funkciót transztorakális echokardiográfiával vizsgáltuk. Kétdimenziós és M-mód felvételek készültek Vivid IQ ultrahang készülékkel 5.0–11 MHz transzducer használatával. Három egymást követő szív ciklus adatait elemeztük és átlagoltuk.

3.2.6. Statisztikai analízis

Minden értéket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Egyutas ANOVA-t használtunk a 3 kísérleti csoport közötti különbségek meghatározására. $p < 0.05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikáns különbségnek, Tukey *post hoc* teszt alkalmazásával.

3.3. *Stellaria media* tea diabéteszre és szívfunkcióra gyakorolt hatásának vizsgálata

3.3.1. Kísérleti állatok

Összesen 30 felnőtt (9 hetes) hím Wistar patkányt használtunk, melyek a kísérlet kezdetén 292–420 g tömegűek voltak. Az állatokkal való bánásmód és az etikai szabályozások megegyeztek a 3.2.1 fejezetben leírtakkal.

3.3.2. Kísérleti elrendezés

A kontroll patkányokat (n=10) standard táppal etettük. A másik 20 állat egy speciális, fruktózzal dúsított tápot kapott 20 héten keresztül, mely 60% fruktózt tartalmazott és az állatokat a 17. héten alacsony dózisu streptozotocinnal (STZ) oltottuk (20 mg/ttkg, ip.), hogy experimentális diabéteszt váltsunk ki. Továbbá 10 állatot *Stellaria media* teával kezeltünk, melyet orális gavage technikával (szondával) adagoltunk (Diabétesz+*Stellaria media*). Négyhetente éhomi vércukorszintet mértünk, melyet orális glükóz tolerancia tesztek (OGTT) egészítettek ki a 12., 16. és 19. héten. A 20. héten az állatokat elaltattuk és vért vettünk a hasi aortából szérumparáméterek analízisére, valamint izoláltuk a hasnyálmirigyet és a szívet. Az izolált szíveket Neely-féle dolgozó perfúzióknak vetettük alá a szívfunkció vizsgálata céljából. A bal kamrai szívszövet-mintákat a további biokémiai analízis elvégzéséig -80°C -on tároltuk.

3.3.3. *Stellaria media* tea adagolása

A *Stellaria media* tea liofilizátum elkészítése megegyezett a 3.1.1 fejezetben leírtakkal. A liofilizált port ezt követően desztillált vízben oldottuk (100 mg/ml). A Diabétesz+*Stellaria media* csoportban lévő állatok hagyományos orális gavage technikával (szondával) kapták a *Stellaria media* teát (100 mg/ttkg) naponta egyszer a kísérlet kezdete óta. A Kontroll és Diabétesz csoportok ezzel ekvivalens mennyiségű desztillált vizet kaptak.

3.3.4. Endokrin hasnyálmirigy funkciót jellemző szérumparáméterek vizsgálata

Az éhomi vércukorszintet és az OGTT méréseket a *vena saphena*-ból vett vérmintákon végeztük. Az OGTT-nél 1,65 g/ttkg glükózt adtunk az állatoknak orális gavage technikával és a vércukorszintet 30, 60, 90 és 120 perc elteltével megmértük, majd görbe alatti területet (AUC) számoltunk. A hemoglobín A1c (HbA1c) szinteket DCA Vantage Analyzer-rel mértük. A szérum inzulin szintet enzimhez kötött immunszorbens esszével vizsgáltuk.

3.3.5. *Ex vivo* dolgozó szívperfúzió

A szíveket izoláltuk, az aortát és bal pitvart kanuláltuk és kezdetben Langendorff szerint perfundáltuk Krebs-Henseleit pufferrel. Ezt követően a perfúziós rendszert átkapcsoltuk Neely-féle dolgozó üzemmódba recirkuláló pufferrel. Megmértük a szívfrekvenciát, koronária átáramlást, aorta átáramlást, perctérfogatot, balkamrában kifejlődő nyomást és ennek első deriváltjait (dp/dt_{\max} és dp/dt_{\min}), valamint a balkamrai végdiasztolés nyomást (LVEDP).

3.3.6. Western blot analízis

Western blot technikával vizsgáltuk a „signal transducer and activator of transcription 3” (STAT3), protein kináz B (Akt) és extracelluláris szignál regulált-kináz (Erk) fehérjék foszforilációját, valamint a Bax és Bcl-XL fehérjék aktivációját.

3.3.7. Statisztikai analízis

Minden értéket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. Ismételt méréses kétutas ANOVA-t használtunk a testtömegváltozás analízisére. Egyutas ANOVA-t használtunk a 3 kísérleti csoport közötti különbségek meghatározására. $p < 0.05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikáns különbségnek, Holm-Sidak *post hoc* teszttel. A dolgozó szívperfúzió és Western blot eredmények esetében az $\text{átlag} \pm 2\text{SD}$ tartományon kívül eső adatokat kizártuk, hogy minimalizáljuk a szélsőséges értékek hatását.

3.4. Kinurénsav és NMDA receptor moduláció hatásának vizsgálata szimulált iszkémia/reperfúziós modellben

3.4.1. Kísérleti elrendezés

H9c2 kardiomioblaszt sejteket szimulált I/R-nak tettünk ki, mely modellezi az akut miokardiális infarktust. A sejteket $64 \mu\text{M}$ kinurénsavval kezeltük, hogy igazoljuk protektív hatását. Az NMDA receptorok szerepének vizsgálatára a sejteket egy NMDA receptor agonistával, NMDA-val ($25\text{--}400 \mu\text{M}$), egy NMDA receptor antagonistával, MK-801-gyel ($0,47\text{--}120 \mu\text{M}$), NMDA+MK-801 vagy NMDA+kinurénsav kombinációjával kezeltük.

3.4.2. Szimulált iszkémia/reperfúzió

A hatórás szimulált iszkémia során a sejteket hipoxiás inkubátorba helyeztük és glükózmentes hipoxiás oldatban tartottuk, melynek pH-ját 6,4-re állítottuk. Ezután a sejteket ismét visszahelyeztük a normoxiás inkubátorba 2 órára és differenciációs médiummal fedtük őket. A sejtek egy kontroll csoportját normoxiás oldattal kezeltük, mely tartalmaz glükózt és fiziológiás pH-val rendelkezik.

3.4.3. Életképesség és oxidatív stressz mérés

A sejtek életképességét calcein esszével mértük. A sejtelhalást a szimulált I/R által indukált sejthalál %-ában adtuk meg, melyet a normoxiás és vivőanyaggal kezelt hipoxiás csoportok életképességének különbségeként számoltunk ki. Dihidroetídium festést végeztünk, hogy megvizsgáljuk a szimulált I/R által indukált celluláris szuperoxid termelődést.

3.4.4. Sejtmagmorfológia vizsgálata

A sejtmagok apoptotikus morfológiai eltéréseit (szétesett sejtmagok, apoptotikus testek, sejtmagfragmentumok vagy kisebb, kondenzált sejtmagok) DAPI festéssel vizualizáltuk.

3.4.5. Statisztikai analízis

Minden értéket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. Egyutas ANOVA-t használtunk a kísérleti csoportok közötti különbségek meghatározására. $p < 0.05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikáns különbségnek, Fisher LSD *post hoc* teszt alkalmazásával. Az analízis során az $\text{átlag} \pm 2\text{SD}$ tartományon kívül eső adatokat kizártuk, hogy minimalizáljuk a szélsőséges értékek hatását.

4. Eredmények

4.1. *Stellaria media* tea jellemzése

4.1.1. Teljes flavonoid tartalom és flavonoid screening

A teljes flavonoid tartalom $9,88 \pm 0,10$ mg QE/g volt. A flavonoid screening rutin jelenlétét azonosította a retenciós idők és az UV spektrum referencia standarddal való összehasonlítása alapján.

4.1.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

Számos komponenst detektáltunk. A 10 legintenzívebb mintakomponens közül 5 vegyület különféle glikozilált apigenin-származék volt az MzCloud adatbázissal összevetve.

4.1.3. *In vitro* antioxidáns aktivitás

A *Stellaria media* tea alacsony direkt antioxidáns kapacitást mutatott mindkét vizsgálati módszerben: EC_{50} $168,30 \pm 11,06$ μ g/L a DPPH esszében és $0,97 \pm 0,16$ μ mol TE/g az ORAC mérésben.

4.2. A *Stellaria media* tea nem csökkenti a koleszterinszintet és nem befolyásolja a szívfunkciót hiperkoleszterinémiában

4.2.1. Szérum lipid paraméterek és testtömeg

Az össz- és LDL koleszterin koncentráció szignifikánsan megemelkedett a HChol és HChol+*Stellaria media* csoportokban, azonban nem volt szignifikáns különbség a HChol és HChol+*Stellaria media* csoportok között. A szérum HDL koleszterinszint szignifikánsan magasabb volt a HChol csoportban a kontroll csoporthoz képest, azonban a *Stellaria media* kezelés ezt nem befolyásolta szignifikánsan. A triglicerid szintekben nem volt szignifikáns különbség. A testtömeget és testtömeg-növekedést sem a koleszterindús etetés, sem a *Stellaria media* kezelés nem befolyásolta szignifikánsan.

4.2.2. Transztorakális echokardiográfiával vizsgált szívfunkció

A diétával kiváltott hiperkoleszterinémia és a *Stellaria media* kezelés nem okozott változást a kardiális morfológiában és funkcióban a kontroll csoporthoz képest a mért paraméterek egyikében sem.

4.3. A *Stellaria media* tea nem befolyásolja a glükóz homeosztázist diabéteszben, de javítja a diabétesz által indukált kardiális diszfunkciót

4.3.1. Éhomi vércukorszint, glükóz tolerancia és testtömeg

A Diabétesz csoportban szignifikánsan megemelkedett az éhomi vércukorszint és az AUC érték. A *Stellaria media* kezelés nem befolyásolta az éhomi hiperglikémiát és a glükóz intoleranciát. A kísérlet utolsó 6 hete alatt a testtömeg-növekedés csökkent a Diabétesz csoportban, de ez a hatás nem volt szignifikáns a *Stellaria media*-val kezelt csoportban.

4.3.2. Endokrin hasnyálmirigy funkciót jellemző szérumparaméterek

A 20 hetes kísérlet végén a megemelkedett éhomi vércukorszint, a tendenciózusan megemelkedett HbA1c és a körülbelül 20%-kal csökkent szérum inzulin szint károsodott endokrin hasnyálmirigy funkcióra utal a Diabétesz csoportban. A *Stellaria media* tea nem javította ezeket a paramétereket.

4.3.3. Dolgozó szívperfúzió

Az aorta átáramlás, perctérfogat és szívmunka szignifikánsan romlott a Diabétesz csoportban. A *Stellaria media* kezelés viszont szignifikánsan javította a perctérfogatot és a szívmunkát. Az LVEDP értékek tendenciózusan megemelkedtek a Diabétesz csoportban, azonban a *Stellaria media* nem befolyásolta jelentősen ezt a paramétert.

4.3.4. Kardiális jelátviteli útvonalak

A STAT3 fehérje foszforilációja szignifikánsan megemelkedett a Diabétesz csoportban, melyet a *Stellaria media* kezelés csökkentett. A Bax és Bcl-XL fehérjékben, valamint az Akt és Erk fehérjék foszforilációjában nem volt szignifikáns különbség.

4.4. A kinurénsav citoprotektív hatású a kardiális sejtekre szimulált iszkémia/reperfúzióban, mely független az NMDA receptor modulációtól

4.4.1. A kinurénsav hatása a sejtek életképességére és az oxidatív stresszre szimulált I/R-ben

A szimulált I/R protokoll szignifikánsan megnövelte a sejtelhalást és az oxidatív stressz mértékét a normoxiás kontroll csoporthoz képest. A 64 μ M kinurénsav szignifikánsan javította ezeket a változásokat.

4.4.2. Az NMDA kezelés és az antagonistákkal való kombinációjának hatása a sejtek életképességére és az oxidatív stresszre szimulált I/R-ben

A szimulált I/R alatti 100, 200 és 400 μ M NMDA kezelés szignifikánsan növelte a sejtelhalást. Ezzel összhangban, a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest az NMDA kezelés megemelte az apoptotikus morfológiai eltérést mutató sejtmagok arányát. Ezeket a változásokat az antagonistákkal való kombinált kezelések megszüntették. Az oxidatív stressz mérés esetén az NMDA kezelés és az NMDA és a két antagonistá kombinációja hasonló változásokat eredményezett, mint a sejtelhalásnál, azonban ez nem érte el a statisztikai szignifikancia küszöbét.

4.4.3. Az NMDA receptor antagonistá MK-801 hatása a sejtek életképességére szimulált I/R-ben

A kinurénsavval ellentétben az NMDA receptorok gátlása MK-801 antagonistával nem csökkentette a szimulált I/R által indukált sejtelhalást szignifikánsan egyik vizsgált koncentrációban sem, ami arra utal, hogy a kinurénsav által kiváltott kardioprotekció NMDA receptoroktól független lehet.

5. Megbeszélés és következtetés

Jelen munkánkban természetes vegyületek (egy gyógynövény és egy endogén molekula) hatásait vizsgáltuk az iszkémiás szívbetegség megelőzésében és kezelésében két különböző megközelítést alkalmazva: csökkenteni a befolyásolható metabolikus kardiovaszkuláris rizikófaktorok súlyosságát és a kardiális következményeiket, valamint citoprotekciót kiváltani, hogy mérsékeljük az I/R károsodás okozta sejtelhalást.

5.1. Új eredmények

Az értekezés új eredményei a következőkként foglalhatók össze:

- a *Stellaria media* tea nem csökkenti a vér koleszterinszintjét és nem befolyásolja a szívfunkciót hiperkoleszterinémiában;
- a *Stellaria media* tea jótékony hatású a diabétesz által indukált kardiális diszfunkcióra: javítja a károsodott perctérfogatot és szív munkát, valamint megelőzi a diabétesz által indukált kardiális STAT3 foszforilációt;
- a *Stellaria media* tea kedvező kardiális hatásai függetlenek a diabétesz súlyosságának modulációjától, mivel a tea nem befolyásolja az éhomi hiperglikémiát vagy a glükóz intoleranciát diabéteszben;
- az NMDA receptor antagonizmus nem a fő mechanizmus a kinurénsav szimulált iszkémia/reperfúzióban kifejtett kardiocitoprotektív hatásában.

A *Stellaria media* egy manapság népszerű gyógynövény koleszterin- és vércukorszint csökkentésére. Azonban eredményeink nem támasztják alá használatának megalapozottságát ezen indikációkban, mivel a tea nem befolyásolta a lipid profilt experimentális hiperkoleszterinémiában és nem javította a glükóz homeosztázist diabéteszben. Az irodalomban a *Stellaria media* etanolos és metanolos kivonatainak elhízás ellenes hatását vizsgálták és a 400 mg/ttkg dózisban alkalmazott metanolos kivonat csökkentette a triglicerid szinteket a különböző obezitás modellekben, de nem befolyásolta az összkoleszterinszintet. A *Stellaria media* diabétesz súlyosságára gyakorolt hatását kifejezetten csak egy tanulmány vizsgálta az irodalomban. A *Stellaria media* levelének etanolos kivonata 100–400 mg/kg/nap dózisban intraperitoneális injekcióként alkalmazva csökkentette a hiperglikémiát egy 21 napos alloxán-indukált diabéteszes patkány modellben. Ezzel ellentétben, Chidrawar és mtsi. a *Stellaria media* etanolos kivonatát hatástalannak találták a hiperglikémia csökkentésére két különböző elhízás modellben is. Azonban kimutatták, hogy a 200 és 400 mg/kg dózisban alkalmazott metanolos kivonat szignifikánsan csökkentette a szérum glükóz szinteket ezekben a modellekben. Érdeemes megemlítenünk, hogy a *Stellaria media* etanolos és metanolos

kivonatának intraperitoneális alkalmazásának limitált transzlációs értéke van a gyógynövény humán fogyasztásának tükrében.

A diabéteszes kardiomiopátia a diabétesz egyik jelentős közvetlen következménye. Jelen tanulmányunkban a Diabétesz csoportban az aorta átáramlás, a perctérfogat és a szívmunka szignifikánsan lecsökkent a kontroll csoporthoz képest. A *Stellaria media* tea kezelés szignifikánsan javította a perctérfogatot és a szívmunkát, ami arra utal, hogy a *Stellaria media* teának jótékony hatásai lehetnek a szívre diabéteszes állapotban.

Kimutatták, hogy a *Stellaria media* aktív hatóanyagai, pl. fenolos komponensek, flavonoidok vagy szteroid szaponinok szerepet játszhatnak farmakológiai hatásaiban. Kísérleteinkben a flavonoid screening rutint azonosított, mint egy lehetséges komponenst a *Stellaria media* teában. Az irodalomban már kimutatták a rutin kedvező kardiovaszkuláris hatásait diabéteszben. Néhány tanulmány szerint a rutin csökkenti a diabéteszes kardiomiopátiát és javítja a bal kamrai diszfunkciót STZ-indukálta diabétesz modellben és magas szénhidrát és magas zsírbevitellel kiváltott modellekben. A kivonat LC-MS/MS analízisében különféle glikozilált apigenin-származékokat mutattunk ki, mely egyezik az irodalmi adatokkal. A glikozilált flavonoid származékok csak csekély mértékben szívódnak fel a bélrendszerből közvetlenül, ezért az emésztés során van egy deglikozilációs lépés, melyet követően csak az aglikon rész fog felszívódni, így a biológiai hatásokért is ez lesz felelős. A kimutatott komponensek aglikon része az apigenin, melyről már kimutatták, hogy csökkenti az STZ-indukált diabéteszes kardiomiopátiát és hogy védő hatású a miokardiális infarktus során fellépő kardiális diszfunkció ellen diabéteszes patkányokban, ami arra utal, hogy az apigenin-származékok hozzájárulhatnak a *Stellaria media* tea jótékony kardiális hatásaihoz.

Feltártuk, hogy a *Stellaria media* megelőzi a diabétesz által okozott megemelkedett STAT3 foszforilációt a szívben. Irodalmi adatok szerint a STAT3 egy feltételezett kulcsmediátora a diabétesz által indukált kardiális diszfunkciónak és a diabétesz megemelheti a foszforilációját. Mindemellett kimutatták, hogy a megemelkedett kardiális STAT3 aktiváció csökkentése javíthatja a diabétesz által kiváltott kardiális diszfunkciót, így ez is szerepet játszhat a *Stellaria media* tea kedvező kardiális hatásaiban. Érdekes módon a rutin lehetséges jelenléte a *Stellaria media* teában magyarázatot adhat a kísérleteink során megfigyelt hatásokra, mivel irodalmi adatok szerint a rutin citoprotektív hatást fejt ki a STAT3 foszforiláció gátlásával.

A jövőben érdemes lenne a *Stellaria media* tea hatásait már kialakult hiperkoleszterinémias vagy diabéteszes állapotban vizsgálni, melynek nagyobb klinikai relevanciája lehet. Tanulmányunk egyik lehetséges limitációjának tekinthető a koleszterinnel

vagy fruktózzal dúsított táp nélkül csak gyógynövény kezelésben részesülő csoport hiánya. A STAT3 jelátviteli útvonal további vizsgálata egyéb érintett célfehérjéket és direkt ok-okozati mechanizmusokat tárhatna fel. A tea más dózisban való alkalmazása, más módszerrel történő kivonása vagy standard terápiákkal való kombinálása hozzájárulhatnak a mélyebb tudáshoz. Nem csak patkány modellben, hanem humán vizsgálatokban is érdemes lenne megvizsgálni a *Stellaria media* tea hatását, hogy megfigyelhető-e szívfunkciós javulás olyan diabéteszes betegekben, akik rendszeresen tyúkhúr teát fogyasztanak.

A befolyásolható rizikófaktorok súlyosságának mérséklése mellett egy másik terápiás megközelítés a citoprotekció kiváltása farmakológiai ágensekkel, hogy csökkentsük az I/R károsodás által kiváltott sejtelhalást. Megvizsgáltuk az NMDA receptorok szerepét a kinurénsav, egy endogén metabolit kardioprotektív hatásaiban. Eredményeink szerint az NMDA receptor aktiváció súlyosbítja az I/R károsodást. Ez összhangban áll az irodalmi adatokkal, miszerint az NMDA receptor aktiváció mitokondriális diszfunkciót, oxidatív stresszt és apoptózist indukál neonatális patkány kardiomiocitákban, valamint a receptorok aktivációja pitvari fibrillációt okozott patkányokban. Továbbá, irodalmi adatok szerint az NMDA receptor antagonizmus protektív hatású lehet a szívre. Ugyanakkor a mi kísérletei eredményeink nem igazolják a NMDA receptor antagonizmus jótékony hatását a szimulált I/R által indukált sejt-károsodás mérséklésében. A kinurénsavval ellentétben az MK-801 kezelés önmagában nem csökkentette a sejtelhalást szignifikánsan, ami arra utal, hogy az NMDA receptor antagonizmus nem a fő mechanizmus a kinurénsav által kiváltott protektív hatás elérésében.

Mivel a kinurénsav kardioprotektív hatása úgy tűnik, hogy független az NMDA receptor antagonizmustól, felmerül a kérdés más lehetséges receptorok és jelátviteli útvonalak szerepéről. Az NMDA receptor antagonizmuson kívül a kinurénsav agonista hatása a G-protein kapcsolt receptor 35 (GPR35) és aril-hidrokarbon receptorokon. A GPR35 aktivációt összefüggésbe hozták kardiovaszkuláris megbetegedésekkel és kimutatták, hogy gátolja a pro-inflammatorikus szignálokat. Válaszképpen a hipoxiás inzultusra, a GPR35 mRNS és fehérjeszintje megemelkedett neonatális egér kardiomiocitákban, valamint a miokardiális GPR35 expresszió fokozódott akut miokardiális infarktus hatására *in vivo* egér modellekben. Az aril-hidrokarbon receptor útvonalról kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer fejlődésében és funkciójában. Az aril-hidrokarbon receptorok aktivációja kardioprotektív hatású volt doxorubicin-indukálta kardiotoxicitásban. Továbbá kimutatták, hogy ezen receptorok expressziója fokozódik miokardiális I/R károsodást követően kardiomiocitákban, ami arra utal, hogy a receptorok szerepet játszhatnak a miokardiális I/R károsodásban. Ezekon kívül tovább elmélkedhetünk a kinurénsav protektív

hatásának háttérben álló egyéb, receptor független lehetőségeken. Az antioxidáns hatás egy valószínű megközelítésnek tűnik, hiszen a kezelés csökkentette a dihidroetídium fluoreszcencia intenzitást a tanulmányunkban. Ez összhangban van az irodalommal, ahol a kinurénsavról kimutatták, hogy antioxidáns hatású. Tehát irodalmi adatok alapján a GPR35 és aril-hidrokarbon receptorok modulációja vagy az antioxidáns hatás ígéretes lehetőségeknek tűnnek a kinurénsav feltételezett kardioprotektív hatásának háttérben, azonban további vizsgálatok szükségesek ezek tisztázására.

Jelen tanulmányunkban a kinurénsav és az NMDA receptor moduláció hatásait *in vitro* kísérletekben teszteltük. A jövőben megvizsgálánk és remélhetőleg kimutathatnánk a kardioprotektív hatást *ex vivo* izolált szívekben vagy az akut miokardiális infarktus *in vivo* modelljeiben. Továbbá kiegészítő vizsgálatok szükségesek a háttérben álló molekuláris mechanizmusok, más receptorok és jelátviteli útvonalak szerepének feltérképezésére, melyek összefüggésbe hozhatók a kinurénsav kardioprotektív hatásával.

Összefoglalva tehát a természetes vegyületek jótékony hatásúak lehetnek és fontos szerepet játszhatnak az iszkémiás szívbetegség megelőzésében és kezelésében, így értékes jelöltek lehetnek a jövő kutatásaiban, hogy csökkentsék az iszkémiás szívbetegség mortalitását és javítsák a klinikai kimeneteleket.

6. Köszönetnyilvánítás

Kísérleteink a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA K115990) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma (20391-3/2018/FEKUSTRAT) támogatásával valósultak meg. Az értekezés a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program, GINOP-2.3.2-15-2016-00034 és GINOP-2.3.2-15-2016-00006 projektek keretében készült.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dux Lászlónak, hogy lehetővé tette munkámat a Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolában, illetve, hogy szélesítette a biokémiai tudásomat.

Szívből jövő hálával tartozom témavezetőmnek és barátomnak, Csont Tamásnak. Köszönöm támogatását, irányítását és bátorítását az egyetemi és PhD éveim alatt.

Hálás vagyok Gáspár Renátának a tanításáért és a kezdeti évekbeli bátorításáért.

Külön köszönöm kollaborációs partnereinknek, Csupor Dezsőnek és Kiss Tivadarnak, hogy bevezettek minket a gyógynövények világába és értékes szakmai segítséget nyújtottak a *Stellaria media* tea elkészítésében, a flavonoid tartalom és screening, valamint az antioxidáns kapacitás vizsgálatok elvégzésében.

Szeretném megköszönni a társszerzők segítségét a kísérletek elvégzésében: Szűcs Gergőnek a dolgozó szívperfúzió, Sárközy Mártának a transztorakális echokardiográfia, Siska Andreának és Földesi Imrének a szérumparaméterek analízise, Darula Zsuzsannának és Tengölics Rolandnak az LC/MS-MS analízis, valamint Halmi Dórának és Gáspár Renátának a kinurénsav viabilitás és oxidatív stressz mérései során végzett munkáját.

Szeretnék köszönetet mondani a kutatócsoportunk tagjainak: Csonka Csabának, Pipicz Mártonnak, Gáspár Renátának, Szűcs Gergőnek, Sárközy Mártának, Sója Andreának, Szabó Mártonnak, Diószegi Petrának, Kovács Zsuzsannának, Kovács Mónikának, Halmi Dórának, Soltész Róbertnek, Csóré Dórának, Somogyi Rékának, Čolić Atinának és Plechl Évának, valamint a Biokémiai Intézet minden munkatársának, különösen az „egyed labor” PhD hallgatóinak: Szabó Kittinek, Köhler Zoltánnak és Becsky Dánielnek a barátságukért és bátorításukért. Kiemelkedő technikai és adminisztratív segítséget kaptam Makráné Felhő Zitától, Rádi Erzsébettől, Engi Ildikótól, Bodnár Tündétől és Ocsovszki Imrétől.


Mindezen túl, nagyon hálás vagyok a családom és közeli barátaim támogatásáért. Az ő segítségük nélkül ez az értekezés nem valósulhatott volna meg. A férjem, Pipicz Márton biztos hátteret és soha véget nem érő támogatást nyújtott az évek során, átsegítve ezzel a felmerülő nehézségeken. Ezt az értekezést szeretném nekik ajánlani.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kiss Tivadar**, mint megosztott első szerző nyilatkozom arról, hogy **Dr. Demján Virág** doktorjelölt szerepe az alábbiakban megjelölt közös publikációnk eredményeinek elérésében meghatározó volt. Kijelentem, hogy a publikációt a jelölt teljes mértékben felhasználhatja PhD értekezéséhez. Tudomásom szerint ezen eredményeinket más még nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez, illetve ezt a jövőben sem teszi.

Az értekezésben felhasználásra került közös publikáció:

Demján V., Kiss T., Siska A., Szabó M. R., Sárközy M., Földesi I., Csupor D., Csont T.
Effect of *Stellaria media* tea on lipid profile in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020, doi:10.1155/2020/5109328



Dr. Kiss Tivadar

Szeged, 2021.10.05.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Gáspár Renáta** és **Dr. Halmi Dóra**, mint megosztott első szerzők nyilatkozunk arról, hogy **Dr. Demján Virág** doktorjelölt szerepe a beadás előtt álló közös publikációnk alábbiakban megjelölt eredményeinek elérésében meghatározó volt és kijelentjük, hogy ezen eredményeket a jelölt felhasználhatja PhD értekezéséhez. Tudomásunk szerint ezen eredményeinket más még nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez, illetve ezt a jövőben sem teszi.

Az értekezésben felhasználásra került eredmények:

- 64 μ M kinurénsav kezelés hatása H9c2 sejtek calcein festéssel vizsgált életképességére és dihidroetídium festéssel vizsgált oxidatív stressz mértékére szimulált iszkémia/reperfúziós modellben
- NMDA kezelés, valamint NMDA+kinurénsav és NMDA+MK-801 kombinált kezelések hatása H9c2 sejtek calcein festéssel vizsgált életképességére, dihidroetídium festéssel vizsgált oxidatív stressz mértékére, valamint DAPI festéssel vizsgált sejtmagmorfológiai eltérésekre szimulált iszkémia/reperfúziós modellben
- MK-801 kezelés hatása H9c2 sejtek calcein festéssel vizsgált életképességére szimulált iszkémia/reperfúziós modellben

A beadás előtt álló közös publikációnk adatai:

Gáspár R., Halmi D., Demján V., Diószegi P., Igaz N., Juhász L., Z. Poles M., Patai R., Polgár T.F., Vincze A., Pipicz M., Kiricsi M., Csont T. The effect of kynurenic acid on ischemia/reperfusion injury, apoptosis and mitochondrial function in cardiomyocytes

.....
Dr. Gáspár Renáta

Dr. Gáspár Renáta

.....
Dr. Halmi Dóra

Dr. Halmi Dóra

Szeged, 2021.10.05.