

# A flavonoid quercetin rövid és hosszú távú hatása a koronária arteriolákra

Doktori értekezés

**Dr. Monori-Kiss Anna**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Nádasy György, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Monos Emil, az MTA doktora, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Blázovics Anna, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Dr. Farkas Orsolya, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, az MTA rendes tagja,  
rektor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pavlik Gábor, az MTA doktora,  
professor emeritus  
Dr. Szőke Éva, az MTA doktora,  
nyugalmazott egyetemi tanár

Budapest  
2018

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke .....	4
2. Bevezetés.....	6
2.1. A quercetin beviteli jellemzői és farmakokinetikája .....	6
2.2. A francia paradoxontól a kardioprotektív hatásmechanizmusig.....	11
2.3. A quercetin vaszkuláris hatásai.....	15
2.3.1. Akut vazóaktív hatások .....	15
2.3.1.1. Humán vizsgálatok eredményei .....	15
2.3.1.2. Állatkísérletek eredményei.....	17
2.3.2. Hosszú távú kezelés vaszkuláris hatásai.....	19
2.3.2.1. Humán vizsgálatok eredményei .....	19
2.3.2.2. Állatkísérletek eredményei.....	21
3. Célkitűzés.....	23
4. Módszerek.....	24
4.1. Kísérleti állatok.....	24
4.1.1. A quercetin akut hatásmódjának vizsgálatához használt állatok .....	24
4.1.2. Krónikus quercetin kezelés hatásainak vizsgálatára használt állatok ...	24
4.2. Koronária arteriolák vizsgálata .....	25
4.2.1. Preparátumok előkészítése .....	25
4.2.2. Vaszkuláris protokollok.....	27
4.2.2.1. A quercetin akut alkalmazásának dózis-hatás összefüggései.....	27
4.2.2.2. Az akutan alkalmazott quercetin hatásmechanizmusának vizsgálata koronária arteriolán.....	27
4.2.2.3. Biomechanikai és farmakológiai remodeling vizsgálata.....	29
4.3. Felhasznált anyagok.....	31
4.4. Alkalmazott számítási képletek .....	32

4.5.	Statisztikai analízis.....	33
5.	Eredmények.....	34
5.1.	A quercetin dózis-hatás összefüggése patkány intramurális koronária arteriolán állandó intraluminális nyomás mellett.....	34
5.2.	A quercetin akut hatásmódja.....	34
5.3.	Hosszú távú quercetin kezelés hatása az állatok általános állapotára.....	41
5.4.	Hosszú távú quercetin kezelés hatása a koronária arteriolák átépülésére.....	41
6.	Megbeszélés .....	54
6.1.	A quercetin akut, dóziszfüggő relaxációs hatása patkány intramurális koronária arteriolán <i>in vitro</i> .....	54
6.2.	Quercetin akut hatásmódja.....	55
6.3.	Hosszú távú quercetin kezelés hatása a koronária arteriolák átépülésére.....	58
7.	Következtetések .....	63
8.	Összefoglalás.....	65
9.	Summary .....	66
10.	Irodalomjegyzék .....	67
11.	Saját publikációk jegyzéke .....	89
12.	Köszönetnyilvánítás.....	91

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	angiotenzin konvertáló enzim
Ach	acetilkolin
ANOVA	variancia analízis
ATP	adenozin-trifoszfát
BK	bradikinin
Ca <sup>2+</sup> ATP-áz	kalcium adenozin-trifoszfátáz
cGMP	ciklikus guanilil-monofoszfát
COX	ciklooxigenáz enzim
CYP 3A4	citokróm P450 enzimcsalád 3A4-es tagja
DT idő	decelerációs idő (deceleration time)
EDHF	endotél eredetű hiperpolarizáló faktor
E <sub>inc</sub>	inkrementális elasztikus modulus
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz
FMD	áramlás indukálta vazodilatáció (flow-mediated dilation)
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein)
HUVEC	humán köldökszinórvéna endoteliális sejtvonal (human umbilical vein endothelial cells)
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-6	interleukin 6
IUPAC	Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség (International Union of Pure and Applied Chemistry)
IQR	interkvartilis tartomány
JNK	c-Jun NH2 terminális kináz

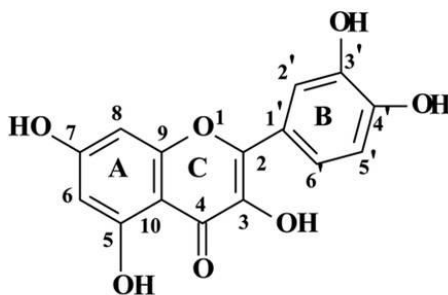
LDL	kis sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein)
L-NAME	N $\omega$ -nitro-L-arginin-metil-észter
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
nKR	normál Krebs-Ringer oldat
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor- $\kappa$ B
NO	nitrogén-monoxid
Nrf2-ARE	nukleáris faktor eritroid-2 kapcsolt faktor antioxidáns jelenlétére reagáló szakasza (nuclear factor erythroid 2-related factor antioxidant responsive element)
PON2	paraoxonáz-2 enzim
PPAR $\gamma$	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor $\gamma$
RCT	randomizált kontrollált humán beavatkozással vizsgálat
SNP	nátrium-nitroprusszid
Syk	lép tirozin kináz (spleen tyrosine kinase)
TNF $\alpha$	tumor nekrozis faktor $\alpha$
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

## 2. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás mind súlyosabb arányokat ölt. Napjainkban ez a vezető halálok Magyarországon. A tudományos közösség egyik feladata a kardiovaszkuláris betegségek enyhítését célzó új eljárások, terápiák felkutatása. Nobel-díjjal kitüntetett magyar kutatónk, Szent-Györgyi Albert már 1936-ban foglalkozott a flavonoidok kapilláris permeabilitásra kifejtett hatásával (1). Az eltelt 80 évben egyre részletesebb kép alakult ki a polifenolok, köztük a flavonoidok sokszínű világáról, melynek meghatározó eleme a quercetin. A dinamikusan gyarapodó szakirodalom e molekula kardioprotektív hatásának különböző mechanizmusait ugyan tárgyalja, de - feltehetően metodikai nehézségek miatt - igen kevés adat került publikálásra a quercetin koronária artériákra kifejtett közvetlen hatásáról. A terápiás lehetőségek kiaknázásához nélkülözhetetlen a pontos vazodilatátor hatás megismerése a miokardium vérellátásában kulcsfontosságú koronária arteriolákon. Disszertációm tárgya ezért a quercetin koronária arteriolákra kifejtett hatásának vizsgálata rövid és hosszú távú alkalmazás esetén.

### 2.1. A QUERCETIN BEVITELI JELLEMZŐI ÉS FARMAKOKINETIKÁJA

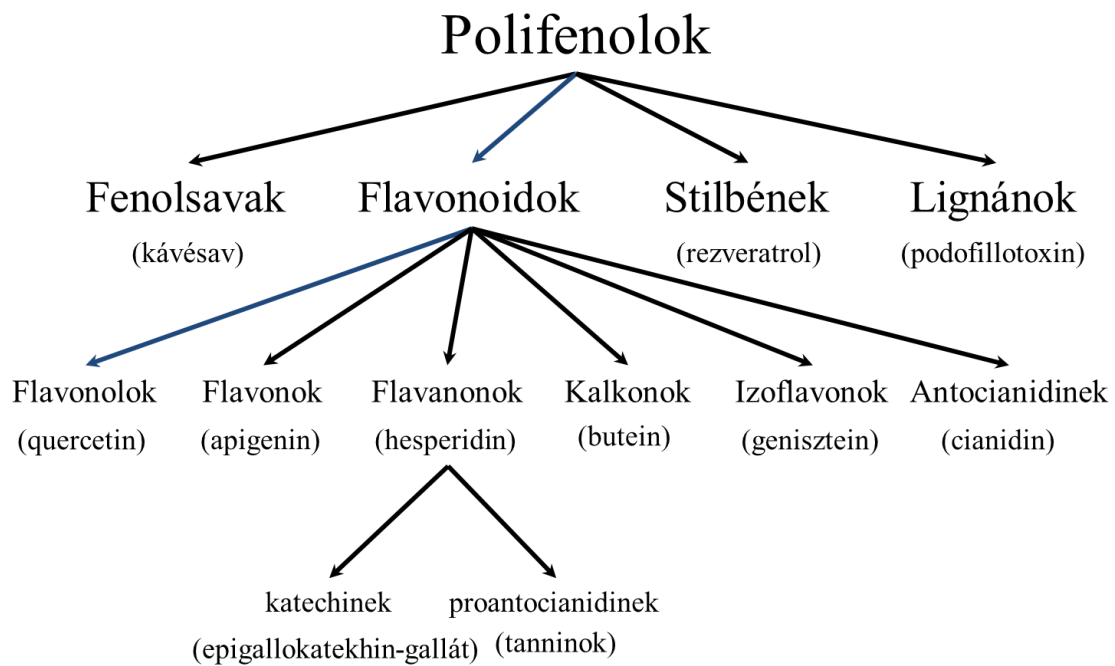
A quercetin IUPAC (Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség) nomenklatúra szerinti neve, amely pontosan azonosítja a molekulát, 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxikromen-4-on (avagy szinonimaként 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavon) (2). IUPAC nevének megfelelő szerkezeti képlete az 1. ábrán látható.



1. ábra. A quercetin szerkezeti képlete (3). A szénatomok számozása és a gyűrűk betűvel jelölése a konvencionális nomenklatúrát követi.

Az élénksárga színű, szobahőmérsékleten kristályos quercetin hideg vízben gyakorlatilag nem, meleg vízben gyengén, de alkoholban és apoláros közegben jól oldódik. Gyakran az egyik hidroxilcsoportot cukorcsoport szubsztituálja. Az így keletkező glikozidok vízben való oldékonysága javul, de *in vivo* tulajdonságai megváltoznak (4, 5). A változatos cukormolekuláknak köszönhetően nagyszámú quercetin glikozid variáns létezik a növényvilágban. A quercetin hatásainak vizsgálata során, ahogy egyre inkább a tudományos és gyógyszergyári kutatások érdeklődési körébe került, a nevezéktan némileg félrevezető lett. A quercetin név eredetileg csak az aglikonra, a cukorcsoport nélküli quercetin molekulára vonatkozott, ma viszont már (helytelenül) különféle quercetin származékokra egyaránt használják (6). Dolgozatomban a quercetin nevet csupán az aglikonra vonatkoztatva használom, melynek szerkezeti képlete az 1. ábrán látható. A glikozidok és metabolitok megnevezése így elkülönül az alapszerkezetétől. Ezek szerkezeti képlete a 3. ábrán látható.

Mivel a különböző metabolitok biológiai hatása egymástól eltérő lehet, a rájuk vonatkozó információkat igen gondosan kell szelektálni. A helyzetet tovább bonyolítja a molekulacsalád pontos megnevezése, hiszen gyakran nem kémiaiilag egynemű anyaggal végeznek vizsgálatokat, hanem egy-egy molekulacsoport, például polifenolok vagy flavonoidok komplexével. Az elérhető hatás azonban a molekulacsoportoknak megfelelően változhat. A quercetin a polifenolok közé tartozó flavonoidok, azon belül a flavonolok közé tartozik. A molekula „családfájának” főbb ágai és a nagyobb csoportok jellegzetes képviselője a 2. ábrán került bemutatásra. A molekulacsalád több tagja a kutatások előterébe került már, akár kardioprotektív hatásaik (mint a rezveratrol (7), a hesperidin (8), vagy az epigallokatekin-gallát (9)), akár egyéb hatások kapcsán, mint például a podofillotoxin (10) a hashajtó hatása miatt.



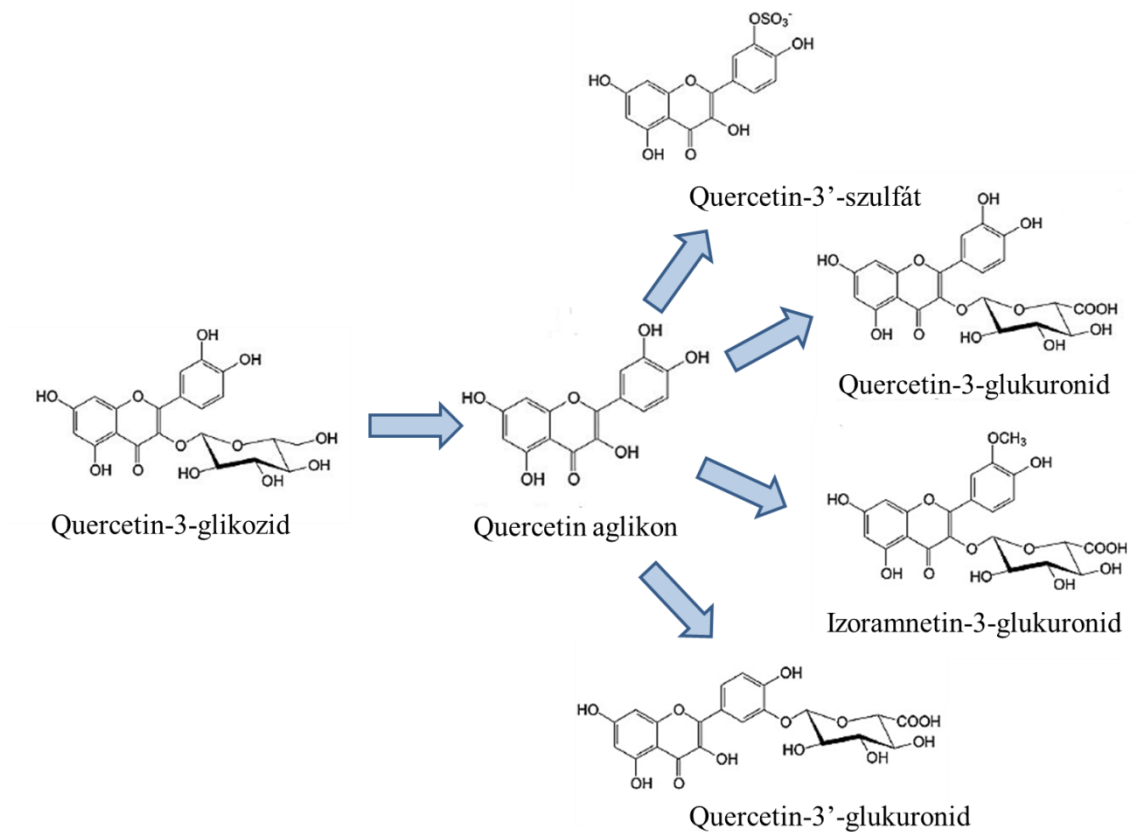
2. ábra. A quercetin besorolása a polifenolok csoportjába (Panche és munkatársai 2016-os munkája alapján (11)). A quercetin a polifenolok közt a flavonoidok, azon belül pedig a flavonolok közé tartozó molekula. A főbb csoportok jellemző képviselője zárójelben szerepel a csoport neve alatt. A polifenolok közt több kardioprotektív hatásáról ismert szerkezet is van, mint a stilbén rezveratrol, vagy a flavanonok közé tartozó hesperidin.

A quercetin és glikozidjai a növényvilágban széleskörűen elterjedt molekulák. Hétköznapi, vegyes étrend esetén számos forrásból hozzájutunk. Az egyik legelterjedtebb, és már gyermekkorban is igen jelentős forrása az almafélék és bogyós gyümölcsök. Nagy mennyiségben fordul elő még például a kapribogyóban, szőlőben, hagymafélékben, brokkoliban, paradicsomban, teában, kávéban, csokoládéban, vörösborból és diófélékben is. Különbőféle, a gyógyászatban használt növényekben és azok kivonataiban is megtalálható, mint például a *Ginkgo biloba* (páfrányfenyő, melynek kivonata javítja az agyi vérkeringést), a *Hypericum perforatum* (közönséges orbáncfű, enyhe nyugtató), vagy a *Sambucus canadensis* (amerikai bodza, az európai fekete bodza rokona, teája a meghűlés tüneteinek enyhítésére alkalmas) (6).



Az átlagos quercetin és flavonoid bevitel az étkezési kultúra függvényében országonként eltérő. A napi polifenol bevitel nagyjából 1 g (12), ezen belül a flavonoidok becsült része 50-800 mg naponta, amibe beletartozik a flavonoidok összes alosztálya, a flavonoloktól kezdve az antocianinokig, tehát potenciálisan több száz molekula. Ennek az 50-800 mg-nak jelentős részét, 28-42 mg-ot a quercetin és annak glikozidjai teszik ki (13). A jellemzően sok zöldséget és gyümölcsöt fogyasztó kultúrákban a quercetin bevétele nagyobb arányú, mint az inkább feldolgozott élelmiszereket fogyasztó kultúrákban. Kínában átlagosan 18 mg (14), Japánban 16 mg (15) az átlagos napi quercetin aglikon bevitel, a glikozidált formák figyelembe vétele nélkül. A mediterrán országokban is kiemelkedő, 18 mg az átlagos napi bevitel (16). Magyarországra kevésbé jellemző a sok zöldség és gyümölcs fogyasztása, a hazai fogyasztás feltételezhetően az Egyesült Államok napi bevétele (10 mg) (17) környékén mozog.

Az elfogyasztott quercetin a gyomorsavban stabil. A felszívódás a vékonybél felső szakaszain kezdődik meg. Az aglikon felszívódását jelentősen fokozza a táplálékkal elfogyasztott lipidek jelenléte (18). A glikozidok felszívódása részben enzimatis deglikoziláció (19) után aglikonként, egyszerű diffúzióval, másrészt glikozidként a  $\text{Na}^+$ -függő glukóz transzporter útján történik (6). A felszívódott quercetin és quercetin-glikozidok jelentős „first pass” metabolizmuson mennek keresztül a májban, a vesében és a belekben, így a vérplazma szabad quercetin szintje elhanyagolható. A keletkező metabolitok mind humán (20), mind rágcsáló (21) metabolizmus esetén legnagyobb részt glukuronidok, szulfátok és metilezett származékok. A metabolizmus főbb állomásait és a keletkező tipikus metabolitokat a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra. A quercetin és glikozidjainak metabolizmusa (Traka és Mithen 2011-es munkájának felhasználásával készült ábra (22)). Az első lépés a deglikoziláció, melynek során az aglikon felszabadul. A metabolizmus második lépéseként glukuronizáció, szulfatáció és metiláció történhet. A quercetin és glikozidjainak, például a rutinak tipikus, vérplazmában megtalálható metabolitjai a 3- és 3'-glukuronidok, a quercetin-3'-szulfát, és a quercetin-3-glukuronid metilált formája, az izoramnetin-3-glukuronid.

A quercetin és ezen metabolitok képesek belépni az enterohepatikus körforgásba, valamint a vérplazmában gyengén kötődnek az albuminhoz, így a quercetin és metabolitjainak felezési ideje hosszú (11-28 óra) (6). Ez még a relatív gyenge biohasznosulás mellett is jelentős, 0,1-1  $\mu\text{mol/liter}$  plazmakoncentrációt eredményez (13, 23). A keletkezett metabolitok rövid távú (24) és hosszú távú (25) hatásai eltérőek. Az egyéni metabolizáló enzim expresszió magyarázhatja a quercetin hatásának variabilitását (26). A szöveti hatások egy részének létrejöttéhez viszont nem a teljes metabolit szükséges, csupán az eredeti aglikon (5). Az ellentmondást a szöveti (27), így az érfalban is expresszálódó (28) béta-glukuronidáz oldja fel, ami *in situ* hasítja a metabolitokat (29), és szabaddá teszi az eredeti molekulát. A felszabaduló quercetin

nagy lipofilitásának (2) köszönhetően átdiffundál (30), vagy bilirubin transzporter segítségével jut át a sejtmembránon (31). A komplex és elhúzódó hatáshoz hozzájárul az is, hogy a bélflóra által termelt egyéb quercetin metabolitok is rendelkeznek kardiovaszkuláris hatásokkal (32). Mindezek a metabolitok létrehozhatnak egy metabolit-ujjlenyomatot, ami jellemzően eltér alacsony- és magas flavonoid bevitel esetén (33), így akár a rendszeres gyümölcs- és zöldségfogyasztás biomarkerének is tekinthető. A hosszú felezési idő végén a quercetin származékok túlnyomó többsége a vizelettel, kisebb része a széklettel távozik a szervezetből (6).

A quercetin még nagy dózisok alkalmazása esetén sem karcinogén. Napi 1000 mg dózis felett aspecifikus mellékhatások jelenhetnek meg, mint fejfájás és hányinger. Ellenben óvatosságra int az ellenőrzés nélkül vásárolható quercetin és egyéb polifenoltartalmú étrend kiegészítőkkel kapcsolatban, hogy a quercetin és a citrus flavonoidok (például a hesperidin) a citokróm P450 enzimsalád 3A4-es tagjának (CYP 3A4 enzim) gátlói (34). A CYP 3A4 a gyógyszerek és xenobiotikumok metabolizmusában, így eliminálásában kulcsfontosságú enzim (35). Gátlásával egyes szűk terápiás ablakú gyógyszerek plazmakoncentrációit megemelhethetik, akár a biztonságos határérték fölé is.

## **2.2. A FRANCIA PARADOXONTÓL A KARDIOPROTEKTÍV HATÁSMECHANIZMUSIG**

A polifenolok, köztük a quercetin a Francia paradoxon (36) kapcsán kerültek a tudományos érdeklődés előterébe. A jelenség arra az ellentmondásra keresi a magyarázatot, hogy a többi európai országgal azonos telített zsírsav bevitel ellenére miképp lehet jelentősen alacsonyabb a koronária betegségek okozta mortalitás Franciaországban. A paradoxon feloldása a mediterrán diétában és a magasabb polifenol bevitelben rejlik (37). Ezt számtalan megfigyeléses vizsgálat támasztja alá, melyek a polifenolok és a flavonoidok magas beviteli mennyiségével összefüggő összmortalitás (38-40), és kardiovaszkuláris mortalitás (41-43) csökkenéséről számolnak be. A kardiovaszkuláris mortalitás csökkenéséből is kiemelendő az iszkémiás szívbetegséghez köthető mortalitás jelentős csökkenése (44). A fenti vizsgálatokból megannyi „szuperétel” emeltek ki, melyek önmagukban is képesek létrehozni az előnyös hatásokat. Ilyenek például a vörösbor (45), a kávé (46), a csokoládé (47), a zöld és fekete tea (43), az eper (48), az alma (49), a citrusfélék (50), vagy a natto (51)

(fermentált egész szójabab, japán nemzeti különlegesség). Habár ezek a vizsgálatok precíz metodikával, randomizált kontrollált humán vizsgálatokkal (RCT) egyértelműen bizonyították az egyes ételek kardioprotektív hatásait, nyilvánvalóvá vált, hogy a valódi előnyt ezen „szuperételek” kiegyensúlyozott, vegyes fogyasztása jelenti (például a mediterrán diéta keretében (52)). Hátránya ezeknek a vizsgálat típusoknak, hogy nem visznek közelebb a hatást kiváltó „tű” megtalálásához a nagy „polifenol-szénakazalban”, és továbbra sem egyértelmű: van-e a kardioprotekció szempontjából kiemelten fontos molekula a 4000 féle polifenol közt? Valamint az a kérdés is nyitott marad, hogy az egyes hatások kiváltásához mekkora az optimális dózis.

A hatásmechanizmus tisztázása és a potenciális gyógyszerfejlesztés szempontjából nagy jelentőségűek és jóval szerencsésebbek azok a vizsgálatok, amelyekben kémiaiilag egynemű szupplementációt alkalmaztak. Ezen vizsgálatok – melyek nem kizárólag a kardioprotektív hatásokra korlátozódtak – jelentős megfigyelésekhez vezettek, melyek közül a legfontosabbak a következőkben foglalhatók össze.

#### a) Vérnyomáscsökkentő hatás

A quercetin antihipertenzív hatása az egyik leginkább tisztázottnak tekinthető tény: a vérnyomáscsökkentést több, jól tervezett RCT vizsgálat eredményeit összegző metaanalízis is igazolja (53). E szerint napi 500 mg quercetin bevitelétől számíthatunk 4,5 Hgmm szisztolés és 3 Hgmm diasztolés nyomás csökkenésre. A vérnyomáscsökkentés hátterében több mechanizmus is áll:

- a teljes perifériás ellenállás csökkentése: endotélfunkció javításával (54) és endotél független vazodilatációval (55). A vaszkuláris hatások részletes tárgyalása a 2.3. fejezetben olvasható.
- a vértérfogat csökkentése: a nefron  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  kotranszporterének serkentésével (56)
- a renin-angiotenzin rendszer gátlása: a quercetin csökkenti az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) mRNS expresszióját (57). Egyes vizsgálatokban az ACE aktivitásának csökkenését (58) is bizonyították, de ezt a hatást más szerzők cáfolják (59, 60).

- az oxidatív stressz csökkentése (61): a quercetin egyrészt a reaktív oxigén szabadgyökök befogásával, másrészt molekulaszervezetéből adódó antioxidáns tulajdonságainál fogva csökkentheti az oxidatív stresszt (62). Ez az antioxidáns hatás egészséges egyéneknél nem érvényesül (63), csak fokozott oxidatív stressz esetén (64). Állatkísérletekben gyakrabban írták le a vérplazma antioxidáns kapacitásának fokozódását, mint humán vizsgálatokban. Ennek az lehet az oka, hogy az alkalmazott quercetin dózisok rágcsálókban magasabb plazmaszintet eredményeznek, mint emberben, a magasabb quercetin koncentrációval pedig az antioxidáns hatás is kifejezettebbé válik (34). Azonban kísérletes modelltől függően a quercetin prooxidánsként is viselkedhet (65), ahogyan más antioxidánsok is kompenzatorikus szuperoxid termelést indukálnak túl nagy dózis bevétele esetén (66).

#### b) Trombocita aggregáció gátlás

Humán (67) és állatkísérletes adatok (68) szerint a quercetin a VI-os glikoprotein, a Syk foszforilációjának gátlásával gátolja a kollagén indukálta trombocita aktivációt, és gátolja a trombociták aggregációját. Alacsonyabb, csak étrenddel elérhető dózisok azonban nem befolyásolják a hemosztázist egészséges egyéneknél (69).

#### c) Plazma lipid szintjének csökkentése

Egy nemrég publikált metaanalízis szerint e téren a quercetinnek csak minimális hatása van. Legalább 4 hetes, napi 500 mg dózisú quercetin kezelés csökkenti a plazma triglicerid szintjét, de nem befolyásolja a kis sűrűségű lipoprotein (LDL) és nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) mennyiségét (70). Ha azonban figyelembe vesszük az antioxidáns hatást, és ennek eredményeképp az oxidált LDL részecskék arányának csökkenését, akkor már protektív hatásokkal számolhatunk (71). Ez egyben rámutat a következő hatásmódra is, hiszen az oxidált LDL részecskék gyulladást indukálnak, melyet a quercetin kezelés gátol (72).

#### d) Gyulladáscsökkentés

Sejtkultúrákon végzett vizsgálatok szerint a quercetin gátolja a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) mediálta gyulladást, mivel megakadályozza az extracelluláris szignál regulált

kináz (ERK) és a c-Jun NH<sub>2</sub> terminális kináz (JNK) TNF $\alpha$  általi aktiválódását. A direkt gyulladásgátlás mellett a quercetin indirekt útvonalon is ellene hat a gyulladással kapcsolatos folyamatoknak a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) aktiválásával. Így a quercetin a nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) által indított jelátviteli útvonalat is gátolja (6).

#### e) Antiateroszklerotikus hatás

Az oxidált LDL részecskék keltette gyulladás az ateroszklerotikus plakkok kialakulásának egyik kulcsmomentuma. A quercetin a már fent bemutatott gyulladáscsökkentéssel és egyes szirtuinok gátlásával (73) az ateroszklerózis kialakulását is lassíthatja sejtkultúra (74, 75) és rágcsáló (76) modelleken végzett kísérletek eredményei szerint.

#### f) Antidiabetikus hatás

Habár több olyan mechanizmust igazoltak sejtkultúrán és állatkísérletekben, amelyek a quercetin antidiabetikus hatására utalnak, ezeket megfelelő humán vizsgálatban még nem igazolták. Ilyen feltételezett mechanizmus az inzulin szekréció fokozása (77) és az inzulin receptor érzékenységének növelése (78).

#### g) Daganatellenes hatás

A gyümölcsök és zöldségek fogyasztása egyértelműen csökkenti egyes daganattípusok kialakulásának valószínűségét, pusztán a megfelelő rostbevitel által is. Ez a megfigyelés sokáig elfedte a flavonoidok daganatellenes hatásait. Humán vizsgálatok azonban egyéb, a rostbevittől független daganattípusok incidenciájának csökkenését is kimutatták. A quercetin bevitel emelése egy 2004-es metaanalízis szerint, szoros összefüggésben áll a tüdődaganat rizikójának csökkenésével (79). Emellett, mint adjuváns szer is használható, ugyanis a multidrog rezisztencia csökkentése révén (80) több kemoterápiás szer hatékonyságát növeli.

#### h) Neuroprotekción

A gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatások kapcsán merült fel annak a lehetősége, hogy a quercetin neuroprotektív hatású (81). Habár pillanatnyilag ez a lehetőség az

állatkísérletes vizsgálatok evidencia szintjén áll, több eredmény is indokolja célzott klinikai vizsgálatok elvégzését. A quercetin képes átjutni a vér-agy gáton (82), és emellett iszkémia-reperfúziós sérülést követően vazodilatorként részt vesz a szöveti vérkeringés helyreállításában, míg szabadgyök fogóként segít fenntartani a vér-agy gát integritását (83). Emellett az idegszövetben akkumulálódik (84), így a plazmakoncentrációnál magasabb koncentrációban van jelen a hatás helyén. A neuroprotekciónak mechanizmusai közt szerepel a nukleáris faktor eritroid-2 kapcsolt faktor antioxidáns jelenlétére reagáló szakaszának (Nrf2-ARE), a paraoxonáz-2 (PON2) enzim, és különféle szirtuinok aktiválása, és a fitoösztrogén hatás (82). A témában eddig egyetlen humán klinikai vizsgálatot közöltek, mely szerint a kávéfogyasztás neuroprotektív hatása legnagyobb részben a kávéban levő quercetinnek köszönhető (85).

Érdekes megemlíteni, hogy a vérkeringési rendszerre gyakorolt és antioxidáns hatások kapcsán felmerült a quercetin, mint sportteljesítmény fokozó szer használatának ötlete. Azonban a témában elérhető legfrissebb metaanalízis szerint egészséges emberek sportteljesítményét nem befolyásolja sem a tartós quercetin szupplementáció (86), sem az akut quercetin bevitel (87).

## **2.3. A QUERCETIN VASZKULÁRIS HATÁSAI**

### **2.3.1. AKUT VAZOAKTÍV HATÁSOK**

#### **2.3.1.1. Humán vizsgálatok eredményei**

A flavonoidok, köztük a quercetin érhatásai már 1936-ban a tudományos érdeklődés előterébe kerültek, mikor Szent-Györgyi Albert és munkatársai leírták a P-vitamin (rutin, a quercetin egy glikozilált formája) kapilláris permeabilitást csökkentő hatását (1). 1950-ben azonban elvetették a vitamin funkciót, mert nem voltak igazolható hiánybetegségek (88).

A quercetin akut humán vaszkuláris hatásairól az etikai és metodikai nehézségek miatt viszonylag kevés és szűkös eszköztárral publikált irodalmi adat áll rendelkezésre. Az elérhető ismeretek legnagyobb részben a brachiális artéria áramlás indukálta vazodilatációjára (FMD) vonatkoznak és kissé ellentmondásosak. Tovább nehezíti a tisztánlátást, hogy a vizsgálatok egy részét egy-egy hatóanyag csoporttal végezték, ahol a hatóanyagok között fellépő szinergia (89-91) is befolyásolhatta a tapasztalt hatást.

A vizsgálatok túlnyomó többségében az FMD növekedését tapasztalták. A táplálkozás kiváltotta hatások modellezéséhez flavonoid és polifenol komplexeket vizsgáltak. Így például egy magas flavonoid tartalmú almafajta (49), különböző citrusfélék (92), piros szőlő polifenol koncentrátum (93) vagy flavonoidban dús áfonyalé (94) elfogyasztása után az FMD nőtt. Ez utóbbi vizsgálat már több részlettel szolgált: a hatás dózis-függő, maximuma 1238 mg polifenol elfogyasztása esetén mérhető, és szignifikánsan korrelál a quercetin-3-glukuronid, egy tipikus humán quercetin metabolit koncentrációjával. Azonban a mechanizmust illetően már ezek a vizsgálatok sincsenek konszenzusban: az alma flavonoidjai nem befolyásolták a vérplazma nitrit vagy nitrát koncentrációit (49), míg a citrusflavonoidok hatására a vérplazma nitrit koncentrációja is nőtt (92), így itt bizonyított az endotél függő, nitrogén-monoxid (NO) mediált hatásmechanizmus.

A hatás pontosabb felderítésére adnak lehetőséget a kémiaiilag tiszta quercetinnel végzett vizsgálatok. Ezen vizsgálatok eredményei azonban ellentmondásosak az FMD-t és a vaszkuláris hatásokat tekintve. Egyszeri, 1095 mg quercetin elfogyasztása bár enyhe hipertóniában vérnyomáscsökkentő hatású, de nem befolyásolja sem az FMD-t, sem az ACE aktivitást, sem a NO, sem az endotelin-1 koncentrációit (59). 200 vagy 400 mg quercetin nem befolyásolta egészséges férfiak vérnyomását vagy plazma nitrit/nitrát koncentrációit, de a béta-glukuronidáz aktivitással szoros pozitív korrelációban növelte az FMD-t és a vizelet glutation koncentrációját (26). Ellenben 200 mg quercetin hatására egészséges férfiak vérplazmájában és vizeletében csökkent az endotelin-1 koncentrációja, és nőtt a vérplazma nitrozotiol, nitrit és nitrát koncentrációja (95). 50-400 mg quercetin-3-O-glikozid viszont semmilyen hatást nem váltott ki az FMD, a vérnyomás vagy a NO produkció tekintetében (96), ahogy 54 mg quercetin sem csökkentette a posztprandiális endoteliális diszfunkciót (97). Az ellentmondások oka lehet a kis esetszám (minden említett vizsgálat esetszáma 30 alatti) és a normalizálás (plazma quercetin metabolit koncentrációi, béta-glukuronidáz aktivitás) hiánya. Azonban az a tendencia rajzolódik ki, hogy az alacsonyabb quercetin dózisok akut alkalmazása nem befolyásolja az endotél funkciót. A flavonoid komplexekkel végzett vizsgálatok akut FMD fokozódásának hátterében egy másik polifenol, vagy a hatóanyagok szinergiája állhat.



Igen limitált számú vizsgálat tárgyalja a humán koronária áramlás változását akut quercetin kezelés hatására. 4-8 deciliter vörösbor növelte a vizsgálatban résztvevő egészséges férfiak koronária áramlási rezervét, de azonos polifenol tartalmú alkoholmentes vörösbor mellett elmaradt ez a hatás. Ez azért is érdekes, mert mindkét ital után egyformán fokozódott a plazma antioxidáns kapacitása (98). Feltételezhetjük tehát, hogy az áramlási rezervet érintő hatás az alkoholhoz köthető: vagy a felszívódási sajátosságokat befolyásolta, vagy önmagában létrehozta a hatást. A vörösborral kapcsolatos vaszkuláris vizsgálatok fénykorában izolált humán koronária artéria gyűrűkön végeztek miográfus kísérleteket, és ezek eredménye egybecseng a később bemutatásra kerülő állatkísérletes eredményekkel: a quercetin ciklikus guanilil-monofoszfát (cGMP) függő jelátviteli úton vazodilatációt hoz létre (1-100  $\mu\text{mol/liter}$  koncentrációban). Ezt a hatást az endotél irtása vagy az endoteliális NO szintáz (eNOS) gátlása eltüntette. Külön érdekessége a vizsgálatnak, hogy különféle borokat is vizsgáltak. A koronária artériák csak barrikhordós érlelésű vörösborok (például a cabernet fajták) hatására dilatáltak, ami alátámasztja a polifenolok, köztük kiemelten a quercetin szerepét (99). Azonban az ilyen polifenol komplexekkel végzett vizsgálatok eredményeinél figyelembe kell vennünk, hogy egyes polifenolok szinergizmusa jelentősen felerősíti a jelentkező hatást (91).

### **2.3.1.2. Állatkísérletek eredményei**

Az ellentmondásos humán adatok fényében szerencsés, hogy több és részletesebb állatkísérletes adat áll rendelkezésre a quercetin akut érhatásairól. Ám ezeket is csak kellő óvatossággal szabad értelmezni, mert különféle fajok (sertés, patkány, egér) különféle érszakaszain (aorta, portális véna, koronária, mezenteriális, és farok artéria) változatos dózissal (100 nmol/litertől 100  $\mu\text{mol/literig}$ ) végezték a vizsgálatokat. A hatás időbeli lefutása (100), érátmérőtől való függése (55, 101) is jelentős különbségeket eredményez. A szakirodalom egyik jelentős hiányossága, hogy a legkisebb vizsgált koronária érátmérő 250  $\mu\text{m}$ , így nincs adat a koronária rezisztenciaereken jelentkező quercetin kiváltotta dilatációról.

A vazodilatáció mechanizmusa érint endotél függő, és endotél független útvonalakat is. Az endotél függő útvonalak közül a NO mediált dilatáció alapvető mechanizmus (102-104). Ez egyrészt az endotélsejt intracelluláris kalcium koncentrációjának növelésével

(105, 106) és az eNOS következményes aktivációjával valósul meg. Másrészt a quercetin az eNOS gyors foszforilációját okozza a 1179-es szerinen (107), ami az enzim aktivitását fokozza. Sertés koronárián igazolták a quercetin és metabolitja, a quercetin-3'-szulfát cGMP függő, foszfodiészteráz-5-től független vazodilatációs mechanizmusát, (108). Ez az eredmény azért is jelentős, mert a szulfát metabolitokat nem érinti a béta-glukuronidáz, és nem keletkezik belőlük *in situ* quercetin aglikon. Tehát maga a szulfát metabolit fejtett ki vazodilatáló hatást. Az endotél függő dilatáció másik útvonala a prosztaciklin mediált simaizom relaxáció. A quercetin egyes érszakaszokon (aortán (109), portális vénán (100)) igazoltan fokozza a prosztaciklin szekréciót. Meg kell viszont jegyezni, hogy ez a hatás dózis függően bifázisos: alacsony, élettanilag reális koncentrációban a prosztaciklin szekréció fokozódása, de humán köldökvéna endotél sejteken (HUVEC sejteken) 5 µmol/liter felett már a prosztaciklin szekréció gátlása figyelhető meg (110). Ez a dózis azonban *in vivo* elérhetetlen, így csak a serkentő hatást kell figyelembe vennünk. Nincs azonban adat a rezisztencia ereket, köztük a koronária rezisztencia ereket érintő prosztaciklin mediált quercetin okozta dilatációról.

A dilatáció mechanizmusának másik nagy csoportja az endotél független útvonal (111). Ennek jól leírt esete a simaizom L-típusú kalcium csatornájának gátlása (112, 113), melyet patkány koronárián is bizonyítottak (114). Azonban patkány farkok artériában a quercetinről bebizonyosodott, hogy aktiválni is képes az L-típusú kalcium csatornát (77, 115). Komplexen vizsgálva ezt a jelenséget azonban egyértelmű, hogy ezt a simaizom eredetű kismértékű vazokonstriktiót elfedi a jóval jelentősebb, de időben kissé később jelentkező endoteliális vazodilatáció (100, 116). Mindazonáltal az L-típusú kalciumcsatornán létrejövő hatás aktiváló vagy gátló volta nem egyértelmű. Emellett a quercetin nem csak az intracelluláris kalciumszintet befolyásolja, hanem a kontraktilis fehérjék kalcium érzékenységét is csökkenti (117), és dózis függően serkenti, vagy gátolja a szarkoplazmás retikulum kalcium adenozin-trifoszfátázát ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz) (118). A flavonoidok protein-kináz C-re gyakorolt hatása is épp ilyen ellentmondásos: 100 nmol/literes dózisban aktiválják (119), míg 10 µmol/liter koncentrációban gátolják (117) az enzimet, ezzel a miozin könnyű lánc kináz foszforiláltságát befolyásolják.

Egyéb ioncsatornák közvetett és közvetlen befolyásolásával is zajlik endotél független vazodilatáció. Ilyen a koronáriák bazális tónusának beállításában kulcsfontosságú nagy

konduktanciájú kalcium aktiválta kálium csatorna (KCa 1.1 csatorna), mely a quercetin aktiválására (105, 120, 121) a simaziom hiperpolarizációját és relaxációját okozza. Másik fontos mechanizmus a mezenteriális vaszkuláris érhálózatban megfigyelt adenzin-trifoszfát (ATP) függő kálium csatorna (Kir 6.1 csatorna) aktiválása (103). Emellett a quercetin okozta dilatáció az endotél-simaziom gap junction kapcsolatain is terjed az endotél eredetű hiperpolarizáló faktor közvetítésével (122).

A quercetin akut vaszkuláris hatásai nem korlátozódnak csupán a vazodilatációra. A quercetin *in situ* felszabadítása a metabolitból időt vesz igénybe (28). Mielőtt ez ismertté vált, ezen metabolitok vazorelaxáns hatását nem feltétlenül várták ki vagy keresték, azonban több esetben tapasztalták, hogy a metabolitok gátolják a gyulladás endoteliális mechanizmusait. A quercetin metabolitjai kivédik az endotelin-1 által indukált endoteliális diszfunkciót (123) és a lipopoliszacharid által indukált vaszkuláris szintű gyulladást (124). Ennek hátterében feltehetően az NF- $\kappa$ B gátlása, az interleukin 6 (IL 6) és TNF $\alpha$  produkció gátlása, és a reaktív oxigén gyökök túltermelésének megakadályozása áll (125, 126). Azokon az érterületeken, ahol a bazális tónus igen alacsony (például a portális vénában), a quercetin akutan nem befolyásolja ezt a tónust, de csökkenti a KCl és a noradrenalin kiváltotta kontraktilis választ (127).

### **2.3.2. HOSSZÚ TÁVÚ KEZELÉS VASZKULÁRIS HATÁSAI**

#### **2.3.2.1. Humán vizsgálatok eredményei**

A krónikus flavonoid és quercetin bevitel vaszkuláris hatásait tárgyaló közlemények és humán vizsgálatok is sokat foglalkoznak az áramlás indukálta vazodilatáció változásaival. Egyes vizsgálatokban az FMD fokozódásáról számolnak be. Például 4 hetes, flavonoidban gazdag alma napi fogyasztása növelte az áramlás indukálta vazodilatációt (49), akár csak a 12 hetes 100 mg/nap quercetin étrend kiegészítés (128). Ugyanígy az FMD javulásáról számoltak be 8 hetes, magas polifenol tartalmú étrend után (129). 30 napos, 51 mg/nap dóziséis quercetin szupplementáció (hagyma kivonat formájában) a bazális FMD-t már nem befolyásolta, de a posztprandiális endotél funkció romlást kivédte (130). Szintén az endotél funkció javulásáról számoltak be mélyvénás trombózisos betegek standard terápiája mellé 3 hónapig adagolt vörös szőlő kivonat hatására (131). A fenti tanulmányokban nem mindenhol vizsgálták a vérplazma vagy a vizelet nitrit és nitrát koncentrációit, ami igazolná a NO produkció fokozódását.

Egyes szerzők eredményei megerősítik az eNOS aktivitás fokozódását magas flavonoid vagy quercetin bevitel esetén (132), míg más tanulmányokban nem találtak különbséget a nitrit/nitrát koncentrációkban a kontroll csoporthoz képest (49, 60). Ezekben a tanulmányokban érdekes lett volna a prosztaciklinnek és metabolitjainak plazmaszintjét meghatározni, de sajnos erre vonatkozóan nem közöltek adatot a szerzők.

Más vizsgálatok eredményei nem erősítik meg az áramlás indukálta vazodilatáció fokozódásának hipotézisét. 4 hetes, 160 mg/nap quercetin-3-glikozid bevitel (133), vagy 6 hetes 450 mg/nap hesperidin kiegészítés (8) nem befolyásolta az FMD-t. A szolubilis e-szelektin és IL-1 $\beta$  mennyiségének csökkenése 4 hetes, 160 mg/nap quercetin-3-glikozid kiegészítés után viszont az endotél funkció javulását és a gyulladás visszaszorulását jelzi (54), akárcsak az a megfigyelés, hogy 12 hetes 100 mg-os quercetin kezelés hatására csökken a keringő endoteliális progenitor sejtek száma (128).

Felvetődik a kérdés: mi állhat a hosszú távú bevitel FMD-re gyakorolt előnyös hatásai mögött olyan esetekben, amikor az eNOS aktivitás fokozódása nem kimutatható? Egészséges emberekben sem a polifenol-komplex (132), sem a hagymahéj kivonatból származó 162 mg/nap quercetin kiegészítés nem befolyásolta az ACE enzim aktivitását (60). A krónikus kezelés nem befolyásolta az artériás stiffnesst sem (49, 133). A quercetin kezelés nem befolyásolja az alfa linolénsav átalakulását a kardioprotektív, többszörösen telítetlen zsírsavakká, tehát ez sem része a kardioprotekciónak (134).

A hatás egy részét az oxidált LDL partikulumok mennyiségének csökkenése és az antioxidáns hatás válthatja ki, amit dialízisre szoruló betegekben már 2 hetes, napi 100 ml vörös szőlőlé fogyasztás után igazoltak (135). Azonban ugyanez a hatás egészséges, optimális redox-homeosztázist fenntartó emberekben nem feltétlenül jelentkezik (60).

Érdekes ellenben, hogy a két hónapos, 120 mg/nap quercetin terápia a stabil anginás betegekben csökkentette a DT (decelerációs) időt (136). A diasztolés funkció echokardiográfiás értékelése hagyományosan a mitrális billentyű beáramlási görbéjével történik. Ennek korai és késői diasztolés sebességének aránya a DT idő. A DT idő hossza a korrallal nő, és vele párhuzamosan a szívfunkció gyengül. Így a DT idő csökkentésével a diasztolés funkció javul, aminek komoly terápiás értéke van az anginás betegek kezelésében (137).

A hosszú távú quercetin kezelés koronária erekre gyakorolt hatására vonatkozólag - az akut quercetin hatáshoz hasonlóan - igen limitált számú vizsgálat került publikálásra. Polifenolban gazdag csokoládé két hetes fogyasztása után a koronária áramlási rezerv fokozódott (138). Ez a vizsgálat fontos eredményekkel zárult, de meg kell jegyezni, hogy a csokoládében leginkább epikatekin, katekin és egyéb flavanonok fordulnak elő, quercetin csak kis mennyiségben. Továbbá, mivel ezen vizsgálatokban ultrahangos technikát használtak, a kapott érték a lineáris áramlási sebesség növekedését, de nem feltétlenül a térfogatáramlás fokozódását jelenti. Így aztán nehéz a kapott eredményhez vezető mechanizmust megállapítani.

#### **2.3.2.2. Állatkísérletek eredményei**

Állatkísérletekből nyert adatok alapján képet kapunk a quercetin hosszú távú hatásairól nem csupán az endotél, hanem a teljes érfal vonatkozásában is. Az endotél funkciót illetően (a humán vizsgálatokhoz képest nagyobb standardizálási lehetőségek miatt) nagyobb az egyezés a publikációk eredményei között. Aorta konstriktív műtétet követő 7 napos, 150 mg/kg dózisú quercetin kezelés még a rendkívül nagy dózis ellenére sem befolyásolta az endotél funkciót, de a kialakuló hipertóniával járó aorta falvastagodást kivédte, és a vérnyomást is csökkentette a patkányokban (139). Azonban már a 10 napos, 30 mg/kg-os dózis (140), vagy ennél hosszabb, 3 (141), 4 (142), 5 (143), vagy akár 13 hetes (144) 10 mg/kg dózisú quercetin kezelés minden esetben fokozta az acetilkolin (ACh) kiváltott endotél függő relaxációt patkány aortában, de nem befolyásolta az endotél független NO donor SNP (nátrium-nitroprussid) hatását különféle hipertenzív állatmodellekben. Egyes szerzők külön kiemelték, hogy az eNOS expressziója nem változott a kontroll csoporthoz képest (140), így a quercetin kezelés az enzim aktivitását fokozta (144, 145). Hasonló eNOS aktivitás fokozással 10 mg/kg quercetin kezelés diabéteszes patkányokban (146), vagy 5 mg/kg quercetin kezelés magas zsírtartalmú étrenden élő egerekben (145) csökkentette vagy kivédte a kialakuló endoteliális diszfunkciót az aortában. Sőt, HUVEC sejtkultúrán beszámoltak a quercetin-3-glukuronid (humán és rágcsáló quercetin metabolit) sejtszintű öregedést lassító hatásairól is (147). Azonban elsődleges koronária endotélsejt kultúrán ezt a hatást nem tudták igazolni (148), ami felveti a lokálisan különböző válaszok lehetőségét.

Hosszú távú quercetin kezeléssel a NO produkció fokozásán kívül az oxidatív stressz csökkentése révén is jelentős hatásokat lehet elérni. Különbőféle, fokozott oxidatív stresszel járó patkánymodellekben az oxidatív stressz csökkenését figyelték meg a kezelt állatokban már 7 napos 25 mg/kg quercetin (149), két hetes 25-75 mg quercetin-3-O-gentobióz (150), 8 hetes 30, vagy 50 mg quercetin (150), és 5 hetes 10 mg/kg quercetin (143) kezelés hatására. Nyúlmodellben arról is beszámoltak, hogy a quercetin akkumulálódik az aorta falában, és a lokálisan magasabb koncentráció hatékonyabb antioxidánsként működik (151).

Részben ez az akkumuláció lehet a magyarázata, hogy a quercetin kezelés az érfal remodelinget is befolyásolja. Az érfal átépülése több oldalról szabályozott folyamat, melynek egyik lényeges jelátviteli mechanizmusa a reaktív oxigén gyökök mediálta útvonala (152). A quercetin képes a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz aktivitását csökkenteni (144, 153, 154), így a reaktív oxigén gyökök képzését is lassítani. Az antioxidáns kapacitással együtt ez a mechanizmus igen hatékony az oxidatív stressz csökkentésében. Ennek köszönhető például a quercetin baroreceptor érzékenységet fokozó (149), a kóros aortafal vastagodást gátló (150, 155), vagy a vaszkuláris kalcifikációt gátló hatása (156). A korosodással járó érfal átépülés során a kollagén-elasztin arány a kollagén javára tolódik el (157). Több mint 100 mg/kg quercetin kezelés naponta, 2 héten keresztül megakadályozza a ballonkatéteres sértés utáni neointima képződést és kollagén lerakódást (155). Nincs viszont állatkísérletes adat az alacsonyabb, humán dozírozással egy nagyságrendbe eső quercetin kezelés kollagén/elasztin arányt érintő hatásairól.

Az érfali sejtes elemek átépülésének fontos szabályozója a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF). A quercetin a VEGF mRNS expressziójának (158) és jelátvitelének (159) gátlásával az érújdonképződést és a patológiás érfal remodelinget gátolja. Ezt támasztja alá a mátrix-metalloproteázok gátlása is (160). Így a hosszú távú quercetin kezelés az erek szerkezetének és hálózati sajátosságainak patológiás átépülését is befolyásolhatja.

### 3. CÉLKITŰZÉS

A quercetin vaszkuláris hatásának mechanizmusát tárgyaló nagyszámú közlemény ez ideig még számos kérdésre nem adott választ. A quercetin jelentős vazodilatációt vált ki, a nagy artériáktól a kis artériák felé haladva egyre jelentősebbet (101). Kérdéses, hogy az élettanilag releváns plazmakoncentráció mekkora dilatációt okoz a koronária arteriolákon. A hatás fokozódása folytatódik az egyre kisebb átmérőjű erek mentén?

A meglevő ismereteink alapján a quercetin koronária arteriolákat dilatáló hatása jelentős részben endotél függő folyamat. Nincs azonban adatunk az endotél függő dilatáció két jelentős mediátorának arányáról: a NO és prosztaciklin dependens útvonalak quercetin általi aktiválásának arányáról. Mivel a NO vazodilatátor funkciója leginkább a kis artériákban érvényesül (161), feltételezhető, hogy az arteriolákban más mediátorok, valószínűleg vazodilatátor prosztanoidok játsszák a főszerepet

Hosszú távú quercetin kezelés viszont újra a NO függő vazodilatációra irányítja a figyelmet. Megfigyelhető-e koronária arteriolákban a bazális NO produkció megváltozása hosszú távú kezelés után? Ez, és az antioxidáns hatások hogyan befolyásolják a koronária arteriolák korosodás indukálta biomechanikai és farmakológiai remodelingjét?

Vizsgálataim során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Kimutatható-e, és ha igen, milyen mértékű a vazorelaxáció patkány intramurális koronária arteriolákban különböző fiziológiás quercetin dózisok akut alkalmazása esetén?
2. Mennyiben NO felszabadulás, és mennyiben prosztanoid felszabadulás által mediált az intramurális koronária arteriolákban kialakuló vazodilatáció?
3. Hogyan befolyásolja az intramurális koronária arteriolák korosodással együtt járó strukturális és funkcionális átépülését a tartós, hosszú távú quercetin szupplementáció?

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

#### 4.1.1. A quercetin akut hatásmódjának vizsgálatához használt állatok

Kísérleteinkhez 350-450 g tömegű, a Semmelweis Egyetem Nagyvárad téri Elméleti Tömbjének tenyészetéből származó hím Wistar patkányokat használtunk, melyeket a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Tömbjének állatházában tartottunk. Az állatházban 12 órás sötét-világos ciklusokat biztosító fényrendszer, állandó 22°C hőmérséklet és 56%-os páratartalom mellett ad libitum táp (S8106-S011 SM, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Németország) és ivóvíz állt rendelkezésre. Az állatokat legalább 3 nap akklimatizáció után a kísérlet napján intraperitoneálisan pentobarbitál alkalmazásával (45 mg/ttkg, Nembutal, Ceva Santé Animale, Libourne, Franciaország) anesztetizáltuk. A szív tömegét kimetszés után oxigenizált hideg (4°C) normál Krebs-Ringer (nKR) oldatba tettük, melynek összetétele a következő (mmol/literben): NaCl 119, KCl 4,7, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,17, NaHCO<sub>3</sub> 24, CaCl<sub>2</sub> 2,5, glukóz 5,5, EDTA 0,034. Az oxigenizálást 20 percig tartó buborékolatással végeztük 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> és 75% N<sub>2</sub> tartalmú gázeleggyel. A működő szív kontrakciói a koronária erekből jól láthatóan kimosták a vért. A kísérletek során végig betartottuk az állatkísérletekre vonatkozó nemzetközi (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition) és hazai, az Európai Unió irányelveivel konform (1998. XXVIII törvény, 40/2013 Kormány rendelet) előírásokat. Az etikai engedély kelte 2009.09.28-a, regisztrációs száma 22.1/2960/003/2009. Az engedélyező hatóság a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság.

#### 4.1.2. Krónikus quercetin kezelés hatásainak vizsgálatára használt állatok

Két hónapos (180-200 g testtömegű) hím Wistar patkányokat két csoportba osztottunk. Mindkét csoportot a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Tömbjének állatházában tartottuk, és azonos, normál tápot kaptak ad libitum (S8106-S011 SM, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Németország). A quercetinnel kezelt csoport a táp mellé 0,3 g/l quercetint tartalmazó szuszpenziót kapott inni. A szuszpenziót segédanyag nélkül állítottuk elő quercetin-hidráttal (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) és csapvíz felhasználásával. A szuszpenzió oxidációra érzékeny, így minden második nap frisset



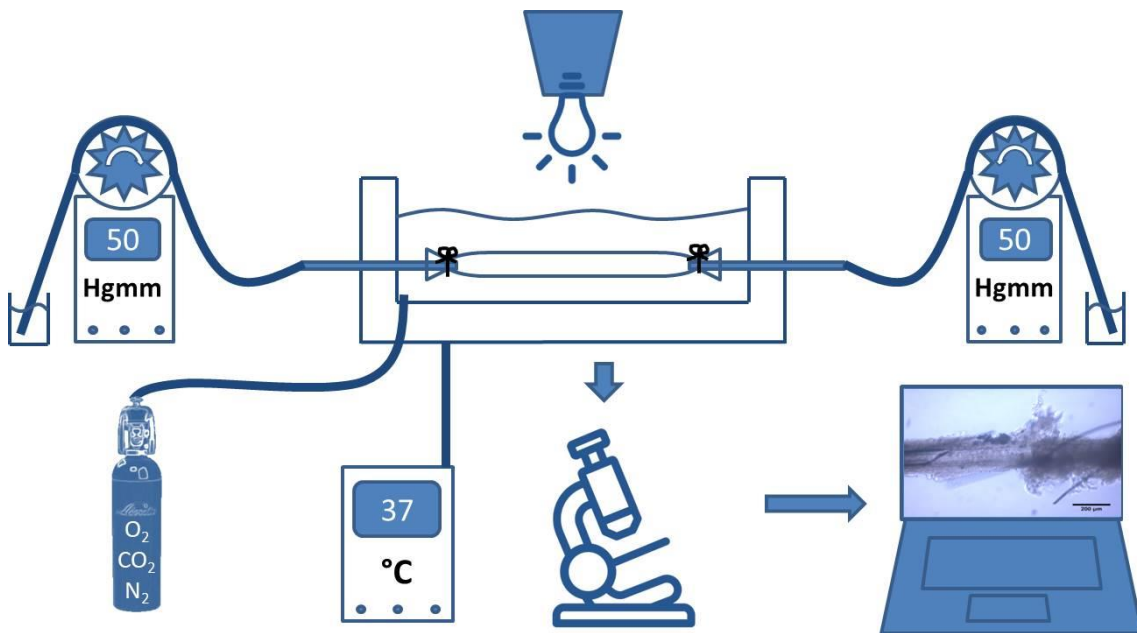
készítettünk. Az állatházi protokoll szerint a tápot autoklávozással sterilizálják, a táp quercetin tartalma elhanyagolható (162). A quercetin bevitele így a szuszpenzió mennyiségétől függött. A standard hőmérséklet és páratartalom mellett az állatok napi ivóvíz igénye állandó, mintegy 100 ml/ttkg/nap (163). Az alkalmazott szuszpenzió átlagosan 30 mg/ttkg/nap quercetin dózist biztosított a kezelés nyolc hete alatt. A kontroll csoport azonos tápot és a szuszpenzió vivőanyagául szolgáló csapvizet kapott. A patkányok testtömegét, bőrének turgorát és viselkedését hetente kétszer ellenőriztük. Nyolc hét kezelési idő után az állatokat az előzőekben ismertetett módon anesztetizáltuk, majd a szív kimetszése után a már ismertetett módon hideg normál Krebs-Ringer oldatba helyeztük. A szív tömegét megmértük és előkészítettük a koronária ér preparálására. A vizsgálatokat a fentivel azonos etikai engedély alapján végeztük.

## **4.2. KORONÁRIA ARTERIOLÁK VIZSGÁLATA**

### **4.2.1. PREPARÁTUMOK ELŐKÉSZÍTÉSE**

Vizsgálatainkat nyomás angiométer technikával végeztük. Egy kísérleti állatból többnyire egy, maximum két megfelelő arteriola preparálható. A második szegmenst csak akkor használtuk, ha preparálási nehézségek miatt az elsőt el kellett vetnünk. A kísérleti állat-preparátum arány tehát 1:1 volt, így a feltüntetett esetszámok mind kísérleti állatra, mind arteriolára nézve helytállóak. A kísérletekhez olyan megfelelő (minimum 3 mm) hosszúságú intramurális koronária arteriolát preparáltunk a bal leszálló koronária artéria hálózatból, amelynek kevés oldalága van. Laboratóriumunkban kifejlesztett „tomba” preparálási technika (164) során a szövetek elválasztását mikrocspeszekkel végezzük éles vágások nélkül. Így elkerülhető a kis oldalágak átmetszése, ami a kanülált arteriola szivárgásához vezetne. A 30 µm-nél nagyobb oldalágakat lekötöttük. Az izolált arteriolát két végén kanülálva szervfürdőbe helyeztük (Experimetria LTD, Budapest), és a kanülökkel az *in vivo* axiális hossz helyreállítása céljából kb. 10-20%-kal megnyújtottuk. A szervfürdőt 37°C-ra temperáltuk, és oxigenizált normál Krebs-Ringer oldatot áramoltattunk át rajta 2,8 ml/perc sebességgel (a szervfürdő térfogata 12 ml), valamint a fent már ismertetett gázeleggyel buborékolattuk az állandó pH (7,4) és parciális oxigéntenzió (90-100 Hgmm) biztosítására. A kanülöket is 37°C-os normál Krebs-Ringer oldattal töltöttük

fel, és mindkét kanült egy-egy szervo kontroll pumpához csatlakoztattuk (Living System, Burlington, Amerikai Egyesült Államok). A pumpák a 40 perces inkubációs idő alatt lassan 50 Hgmm-re emelték az intraluminális nyomást és fenntartották azt. Ez a nyomás az általunk vizsgált koronária szakaszok átlagos vérnyomásának felel meg. A kanülált érszegmentumban nem volt áramlás. Az egyes vazoaktív farmakonok hatását állandó nyomás mellett vizsgáltuk, míg a biomechanikai mérések során áramlás nélkül vizsgáltuk az érfal válaszát az intraluminális nyomás emelésére. A kialakuló érválaszok megjelenítéséhez a szervfürdőt inverz állású mikroszkópra helyeztük (Leica, Wetzlar, Németország), és a mikroszkóphoz nagy felbontású digitális kamerát csatlakoztattunk (Leica DFC 320), ami a kép számítógépes megjelenítését tette lehetővé. Az egyes inkubációs idők lejártával fotót készítettünk a preparátumról. A külső és belső átmérőket off-line analizáltuk (Leica QWin), és mikrométer etalon (Wild, Heelbrugg, Svájc) segítségével kalibrációt végeztünk. A nyomás angiométer vázlatos elrendezése a 4. ábrán látható.



4. ábra. A nyomás angiométer. A szervfürdőben kanülökre rögzítve foglal helyet a vizsgált preparátum. A kanülökön keresztül az intraluminális nyomás szervo pumpákkal állítható be. A kád hőmérsékletét 37°C-on tartottuk, és a szervfürdőt 75% N<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> gázeleggyel buborékoltattuk. A szervfürdő, benne a vizsgált preparátummal egy inverz mikroszkóp és digitális kamera segítségével megfigyelhető. A preparátum

pillanatnyi átmérőértékeit digitális fotókon rögzítettük és off-line elemeztük. A stilizált számítógépen egy koronária arteriola látható, a méretarányt jelző sáv 200  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.2. VASZKULÁRIS PROTOKOLLOK**

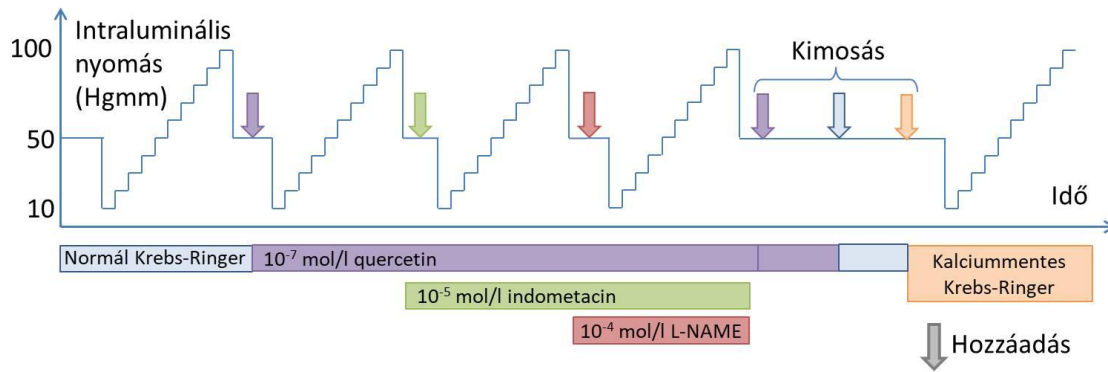
##### **4.2.2.1. A quercetin akut alkalmazásának dózis-hatás összefüggései**

Ezeket a vizsgálatokat  $151\pm 27$   $\mu\text{m}$  maximálisan relaxált belső átmérőjű koronária arteriolákon végeztük ( $n=8$ ), mely érátmérőt kalciummentes Krebs-Ringer oldatban határoztunk meg. Az aktív, spontán tónus alatt (normál Krebs-Ringer oldatban, 50 Hgmm-en) mérhető belső érátmérő átlagértéke  $127\pm 25$   $\mu\text{m}$  volt. A fenti inkubációs periódus után az inkubáláshoz használt normál Krebs-Ringer oldatot  $10^{-9}$  mol/literes quercetin oldatra cseréltük és 20 percig inkubáltunk változatlan nyomáson (50 Hgmm). A quercetin törzsoldat elkészítéséhez 96%-os etanolt használtunk koszolvensként. A szuperfúziós oldat etanoltartalma a legtöményebb quercetin oldatban 0,001 térfogatszázalék ( $1,7\times 10^{-4}$  mol/liter), aminek nincs vasoaktív hatása (165, 166). Az inkubációs idő letelte után a pillanatnyi érátmérőt rögzítettük és a szuperfúziós oldatot  $10^{-8}$  mol/liter töménységűre cseréltük. Ezeket a lépéseket ismételve növeltük a quercetin koncentrációt  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ , és végül  $10^{-5}$  mol/liter koncentrációig, minden koncentrációnál 20 perces inkubációs idővel. Így az átlagos 100 nmol/liter plazmakoncentráció (13) alatt és felett két-két nagyságrenddel dózis-hatás görbét rögzítettünk. A legtöményebb quercetin koncentráció után a szuperfúziós folyadékot újra normál Krebs-Ringer oldatra cseréltük a reprodukálhatóság ellenőrzése érdekében. Azokat a preparátumokat, amelyek a vizsgálat ezen pontján több, mint 5% eltérést mutattak az eredeti átmérőhöz képest, elvetettük ( $n=2$ , ami nem tartozik bele a fent feltüntetett esetszámba). Végül a szuperfúziós folyadékot kalciummentes Krebs-Ringer oldatra cseréltük a passzív, maximálisan relaxált érátmérő meghatározásához. A kalciummentes Krebs-Ringer oldat összetétele mmol/literben a következő: NaCl 92, KCl 4,7,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,18,  $\text{MgCl}_2$  20,  $\text{MgSO}_4$  1,17,  $\text{NaHCO}_3$  24, glukóz 5,5, EGTA 2, EDTA 0,025.

##### **4.2.2.2. Az akutan alkalmazott quercetin hatásmechanizmusának vizsgálata koronária arteriolán**

Ebben a vizsgálatban célunk volt a quercetin hatásának érátmérőtől való függésének feltárása, ezért ezeket a vizsgálatokat 100-320  $\mu\text{m}$  (átlagosan  $188\pm 14$   $\mu\text{m}$ ) maximálisan

relaxált belső átmérő tartományba eső koronária arteriolákon végeztük (n=16). Az erek aktív, spontán tónus alatt mérhető belső átmérője 70-240  $\mu\text{m}$  (átlagosan  $149\pm 13 \mu\text{m}$ ) volt. A vazorelaxáció mechanizmusának és nyomásfüggésének felderítéséhez az inkubációs periódus után normál Krebs-Ringer oldatban először az intraluminális nyomás változására létrejövő érátmérő változást jellemző görbét vettünk fel 10 és 100 Hgmm intraluminális nyomástartományban. A nyomást lépcsőzetesen változtattuk: 10 Hgmm-enként emeltük a nyomást, és 3 perces inkubációs időszakot hagytunk a miogén válasz kifejlődéséhez és az érátmérő stabilizálásához. 100 Hgmm után az intraluminális nyomást visszaállítottuk 50 Hgmm-re, és a szuperfúziós folyadékot  $10^{-7}$  mol/liter koncentrációjú quercetin oldatra cseréltük, ami a quercetin átlagos plazmaszintjének felel meg (167). 20 perc inkubációs időszak után újra elvégeztük a fent leírt nyomás-átmérő görbe felvételét. A quercetin kimosása nélkül  $10^{-5}$  mol/liter végkoncentrációban indometacint adtunk a szuperfúziós oldathoz, és 20 percig inkubáltunk 50 Hgmm-es intraluminális nyomáson, majd megismételtük a nyomás-átmérő protokollt. Végül kimosás nélkül  $10^{-4}$  mol/l végkoncentrációban  $\text{N}^{\text{o}}$ -nitro-L-arginin-metil-észtert (L-NAME) adtunk a szuperfúziós oldathoz, és 20 perc 50 Hgmm-es inkubáció után elvégeztük a nyomás-görbe protokollt. A mérés ezen pontján további két validációs lépést iktattunk be: a reprodukálhatóságot  $10^{-7}$  mol/literes quercetin oldattal, majd normál Krebs-Ringer oldattal ellenőriztük. Azokat a preparátumokat, amelyek átmérője a mérések ezen pontján több, mint 5%-kal eltért a protokoll elején beállított nyugalmi átmérőtől, elvetettük (n=2, ami nem tartozik bele a fent feltüntetett esetszámba). Végül a passzív átmérő megállapításához kalciummentes Krebs-Ringer oldattal történt 20 perces inkubáció után is elvégeztük a nyomás-átmérő protokollt. A teljes protokoll az 5. ábrán látható.



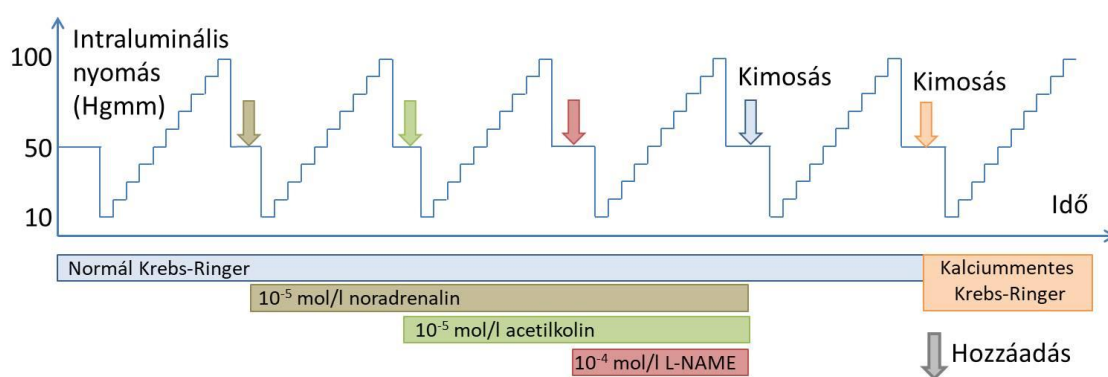
5. ábra. Akutan alkalmazott quercetin hatásmódjának vizsgálati protokollja. Minden 50 Hgmm-es inkubáció 20 percig, a nyomásemelkedés egyes lépcsői pedig 3 percig tartottak. 100 Hgmm után 10 percig 50 Hgmm-en inkubáltunk, hogy a miogén válasz okozta simaizom tónus oldódjon, mielőtt beadtuk a következő farmakont. A vizsgálatok reprodukálhatóságát a kalciummentes Krebs-Ringer oldatban végzett inkubáció előtt quercetin és normál Krebs-Ringer oldatokkal ellenőriztük. Ezen ellenőrzés alapján 2 preparátumot vetettünk el, mert méretük több, mint 5%-kal különbözött a protokoll elején beállítottól. A végleges esetszám  $n=16$ .

#### 4.2.2.3. Biomechanikai és farmakológiai remodeling vizsgálata

A vizsgálatokat a hosszú távú quercetin kezelést kapott és velük párhuzamosan kontrollként tartott patkányok koronária arterioláin végeztük, melyekből  $174 \pm 4 \mu\text{m}$  maximális, passzív belső átmérőjű koronária szegmentumokat preparáltunk. A fent leírt inkubációs periódus után a következő két protokoll egyikét végeztük el:

- Protokoll A: A bevezető inkubáció után normál Krebs-Ringer oldatban a fentiekben ismertetett módon intraluminális nyomás-belső érátmérő változás összefüggéseit ábrázoló jelleggörbét vettünk fel 10 és 100 Hgmm közötti nyomástartományban ( $n=10$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt állatok erein). A görbe felvétele után 10 perccel helyreállt a kiindulási 50 Hgmm intraluminális nyomásra jellemző belső átmérő érték. Ekkor a preparátumot  $10^{-5}$  mol/liter végkoncentrációjú noradrenalinral 10 percig inkubáltuk, majd újra elvégeztük a nyomás-belső érátmérő görbe felvételét. Kimosás nélkül  $10^{-5}$  mol/liter végkoncentrációjú acetilkolinral 10 perces 50 Hgmm-es inkubáció után felvettük a nyomás-átmérő jelleggörbét. Végül  $10^{-4}$  mol/liter végkoncentrációjú L-NAME-mel 20 percig

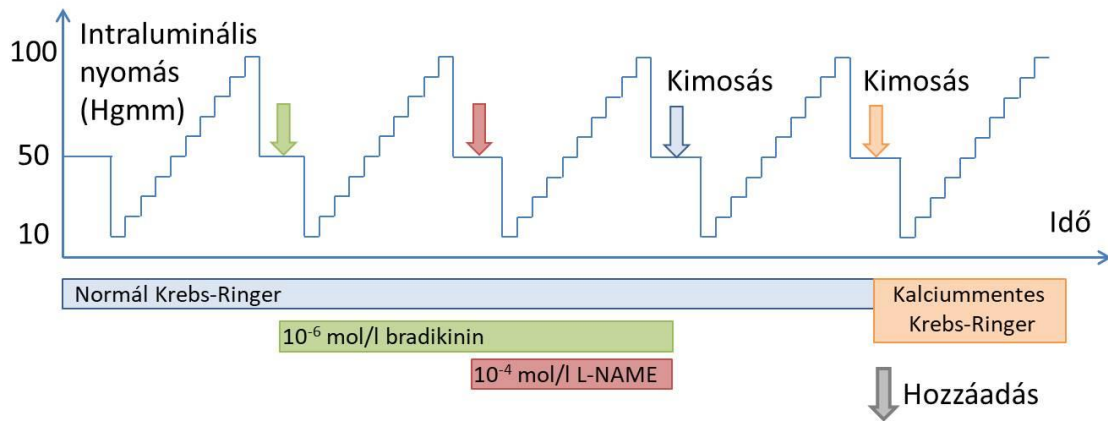
inkubáltunk 50 Hgmm-en, majd ismét felvettük a nyomás-érátmérő görbét. A reprodukálhatóságot a protokoll e pontján 20 perces 50 Hgmm-es normál Krebs-Ringer oldattal való inkubálással ellenőriztük. Azokat a preparátumokat, amelyek átmérője több, mint 5%-kal eltért a bevezető inkubáció végén mért értéktől, elvetettük (a kontroll csoportból n=2, a quercetinrel kezelt csoportból n=0, ami nem számít bele a fent feltüntetett esetszámba). Végül kalciummentes Krebs-Ringer oldatban 20 perc 50 Hgmm-es inkubáció után felvettük a passzív nyomás-átmérő jelleggörbét. Az „A” protokoll a 6. ábrán látható.



6. ábra. Biomechanikai és farmakológiai remodeling vizsgálata, "A" protokoll. A noradrenalin és az acetilkolin inkubációs ideje 10 perc volt, minden más 50 Hgmm-es inkubáció 20 percig tartott. A nyomásemelkedés egyes lépcsőin 3 percig tartottuk fent a nyomást. 100 Hgmm után 10 percig 50 Hgmm-en inkubáltunk, hogy a miogén válasz okozta simaizom tónus oldódjon, mielőtt beadtuk a következő farmakont. A protokollt 12 kontroll és 12 quercetinrel kezelt patkány koronária arterioláján végeztük el. A validitást ellenőrző második normál Krebs-Ringer oldatos inkubáció után 2 kontroll arteriola mérete nem állt vissza a protokoll elején mért értékre, így ezeket elvetettük. A végleges esetszám: n=10 kontroll, n=12 quercetinrel kezelt.

- Protokoll B: A második protokoll esetében is a bevezető inkubációt követően normál Krebs-Ringer oldatban felvettük a nyomás-átmérő jelleggörbét (n=12 kontroll és n=12 quercetinrel kezelt). Ez után  $10^{-6}$  mol/liter végkoncentrációban bradikinint adtunk a szuperfúziós folyadékba, és 10 percig inkubáltunk 50 Hgmm-en, majd felvettük a nyomás-érátmérő görbét.  $10^{-4}$  mol/liter koncentrációjú L-NAME hozzáadása után 20 percig inkubáltunk 50 Hgmm-en, majd újra nyomás-

érátmérő görbét rögzítettünk. A reprodukálhatóságot 20 perces 50 Hgmm-es normál Krebs-Ringer oldatos inkubációval ellenőriztük, mint a fenti protokolloknál, majd kalciummentes Krebs-Ringer oldatban 20 perces 50 Hgmm-es inkubáció után felvettük a passzív nyomás-átmérő görbét. Ebben a vizsgálatban nem kellett preparátumot elvetnünk. A teljes „B” protokoll a 7. ábrán látható.



7. ábra. Biomechanikai és farmakológiai remodeling vizsgálata, "B" protokoll. Minden 50 Hgmm-es inkubáció időtartama 20 perc volt, míg a nyomásemelkedés egyes állomásain 3 percig tartottuk fent a nyomást. 100 Hgmm után 10 percig 50 Hgmm-en inkubáltunk, hogy a miogén válasz okozta simaizom tónus oldódjon, mielőtt beadtuk a következő farmakont. A protokollt n=12 kontroll és n=12 quercetinrel kezelt patkányból származó koronária arteriolán végeztük el. A validitást ellenőrző második normál Krebs-Ringer oldatos inkubációnál minden arteriola megfelelt a vizsgálati kritériumoknak.

### 4.3. FELHASZNÁLT ANYAGOK

A normál Krebs-Ringer és a kalciummentes Krebs-Ringer oldatok összetevőit, és a 96%-os etanolt a Reanal Laborvegyészeti Kft-től (Budapest) vásároltuk. A farmakonokat (quercetin-hidrát, indometacin, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin-metil-észter-hidroklorid, (-)-noradrenalin, bradikinin-acetát, acetilkolin-klorid) a Sigma Aldrich-től (Budapest) szereztük be.

#### 4.4. ALKALMAZOTT SZÁMÍTÁSI KÉPLETEK

A pillanatnyi belső átmérő értékeket az azonos nyomáson mért passzív átmérőre normalizáltuk.

$$\text{Relatív belső átmérő (passzív átmérő \% - ában)} = \frac{D_{i(\text{aktuális})} * 100}{D_{i(\text{passzív})}}$$

$D_{i(\text{aktuális})}$  az adott belső átmérő,  $D_{i(\text{passzív})}$  pedig az azonos intraluminális nyomáson, kalciummentes közegben felvett passzív átmérő.

Spontán tónusként azt a vazokonstriktor erőt értelmeztük, ami beidegzés és vasoaktív farmakonok hatása nélkül jelen van a koronáriákban. Értékét a passzív átmérőre normalizálva adtuk meg.

$$\text{Spontán tónus (\%)} = 100 - \text{relatív belső átmérő (passzív átmérő \% - ában)}$$

Aktív feszülést a spontán tónussal azonos módon számítottunk, azonban a két paramétert meg kell különböztetnünk. A spontán tónus a vaszkuláris simaizmok intrinzik, önálló, farmakonok hatásától mentes kontrakciója, míg az aktív feszülést különféle vasoaktív farmakonok alakítják.

$$\text{Aktív feszülés (\%)} = 100 - \text{relatív belső átmérő (passzív átmérő \% - ában)}$$

A tangenciális falfeszülés számítása a Laplace-Frank egyenleten alapul

$$\sigma = \frac{P_t * r_i}{h}$$

ahol  $P_t$  a transzmurális nyomás (méréseinket légköri nyomáson végeztük, így a transzmurális nyomás jó közelítéssel az intraluminális nyomás),  $r_i$  a belső sugár  $\mu\text{m}$ -ben, és  $h$  az érfal vastagsága  $\mu\text{m}$ -ben.

Az inkrementális elasztikus modulust Cox munkájára alapozva (168) a következő képlet alapján számítottuk:

$$E_{\text{inc (Hgmm)}} = \frac{(2r_i^2 * r_{10}) * \Delta P}{(r_{10}^2 - r_i^2) * (r_{20} - r_{10})}$$



ahol  $r_i$  a belső sugár,  $r_{10}$  a külső sugár (mindkettő az alacsonyabb nyomásértéken,  $\mu\text{m}$ -ben),  $r_{20}$  a külső sugár (a magasabb nyomásértéken,  $\mu\text{m}$ -ben),  $\Delta P$  a nyomáskülönbség (esetünkben 10 Hgmm, tehát 1,33 kPa).

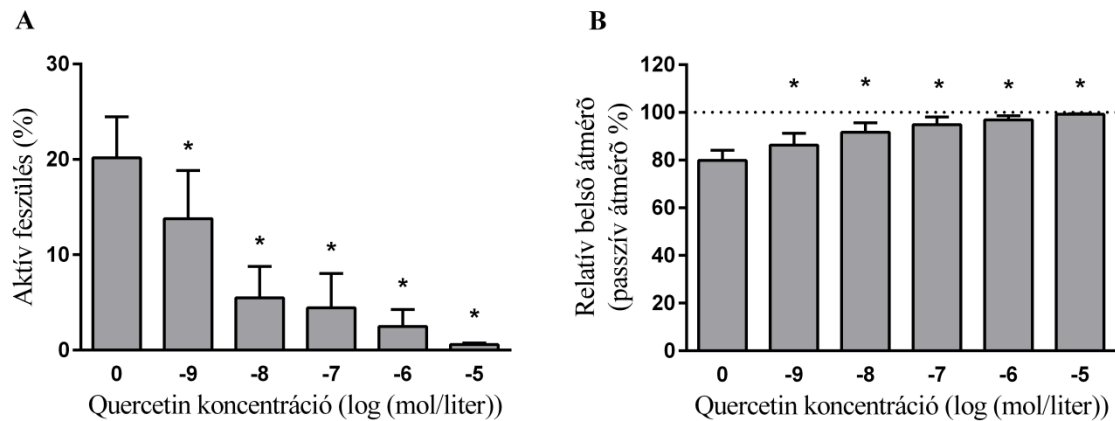
#### **4.5. STATISZTIKAI ANALÍZIS**

Az adatokat Microsoft Excel adattáblában rögzítettük. A statisztikai elemzést GraphPad Prism 6.0-val végeztük. Az értékek eloszlásának normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A normál eloszlású adatokat  $\text{átlag} \pm \text{az átlag standard hibája}$  ( $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ ) formában jelenítjük meg. Normál eloszlású adatok statisztikai vizsgálatához t-tesztet, egy-, kétutas normál és ismétléses variancia analízist (ANOVA) Tukey poszt-hoc teszttel, Pearson korrelációs vizsgálatot és lineáris regressziót használtunk. Nem normál eloszlású adatok vizsgálatához az adatok leírása a medián és interkvartilis tartomány (medián [IQ25%; IQ75%]) formáját követi. Az ilyen adatok vizsgálatához Mann-Whitney tesztet használtunk. A statisztikai szignifikanciát minden esetben  $p < 0,05$  szintben határoztuk meg.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A QUERCETIN DÓZIS-HATÁS ÖSSZEFÜGGÉSE PATKÁNY INTRAMURÁLIS KORONÁRIA ARTERIOLÁN ÁLLANDÓ INTRALUMINÁLIS NYOMÁS MELLETT

A koronária arteriolák spontán tónusa  $20,2 \pm 4,3\%$  volt. A quercetin növekvő dózisa jelentős vazorelaxációt idéztek elő, a  $10^{-5}$  mol/literes koncentráció már teljesen relaxálta a simaizmot (8. ábra). Ez a relaxáció reverzibilisnek bizonyult, kimosás után az arteriolák eredeti tónusa maradéktalanul helyreállt.

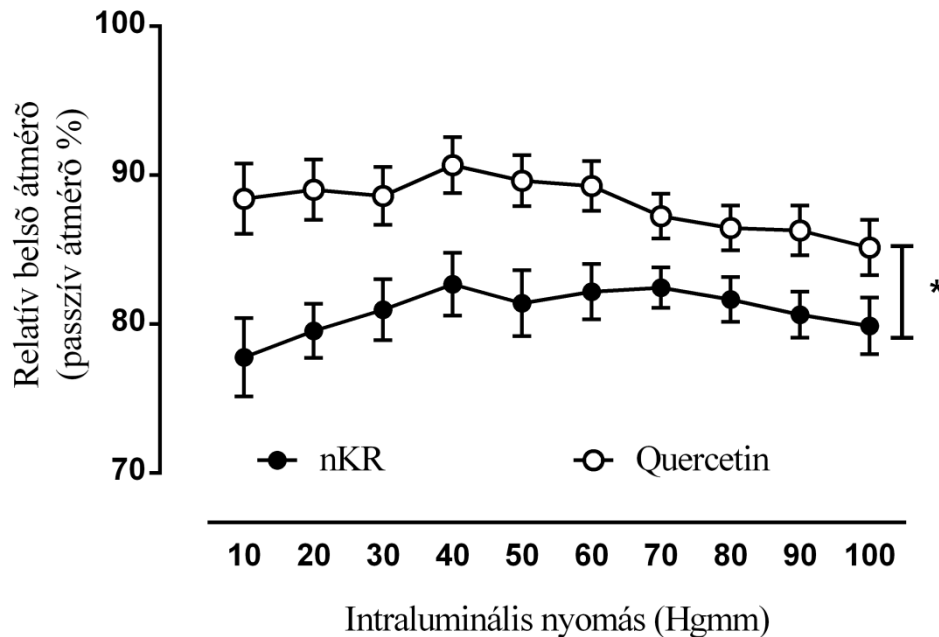


8. ábra. A quercetin dózis-hatás összefüggése patkány intramurális koronária arteriolákon. A panel: A quercetin növekvő koncentrációja fokozatosan csökkenti a koronária arteriolák tónusát. B panel: A quercetin növekvő dózisa okozta vazodilatáció.  $10 \mu\text{mol/liter}$  koncentrációban a tónus gyakorlatilag megszűnik, és az arteriola maximális méretére dilatál. A két panelen ugyanazon eredményekből számolt más-más paraméter látható. Az adatok mindkét panelen az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg. \*:  $p < 0,05$  vs. normál Krebs-Ringer (0 mol/liter quercetin) egyutas ismétléses ANOVA Tukey poszt-hoc teszttel,  $n=8$ .

### 5.2. A QUERCETIN AKUT HATÁSMÓDJA

$10^{-7}$  mol/liter quercetin jelentős vazodilatációt hozott létre az izolált koronáriákon, ahogy azt vártuk a dózis-hatás görbe ismeretében. A hatás a 10-100 Hgmm-es

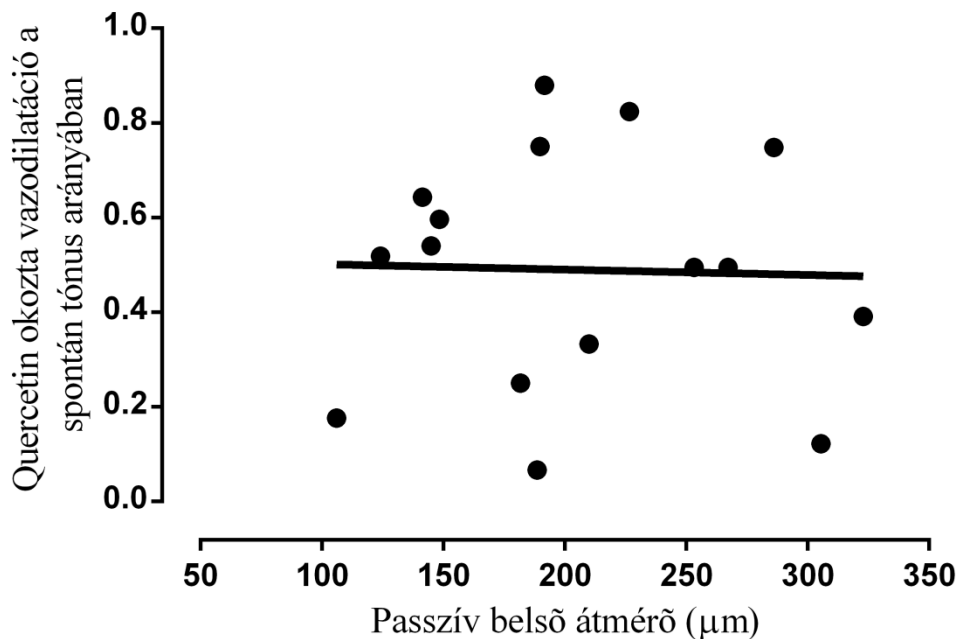
nyomástartomány teljes terjedelmén megmutatkozik, de 10 és 70 Hgmm között Tukey poszt-hoc teszttel is szignifikáns (9. ábra). A görbék egymáshoz viszonyított helyzetének megváltozását a farmakon-nyomás interakciós tényező írja le, ami  $p=0,08$ -nak bizonyult. Tehát jelen adataink szerint nincs ilyen interakció.



9. ábra.  $10^{-7}$  mol/liter quercetin vazorelaxáló hatása. A teli körök a normál Krebs-Ringer oldatban mért átmérőértékek, az üres jelölés a quercetin hatására megváltozott relatív átmérő. Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg. Kétutas ismétléses ANOVA:  $p < 0,05$ , Tukey poszt-hoc teszttel szignifikáns 10-70 Hgmm között,  $n=16$ .

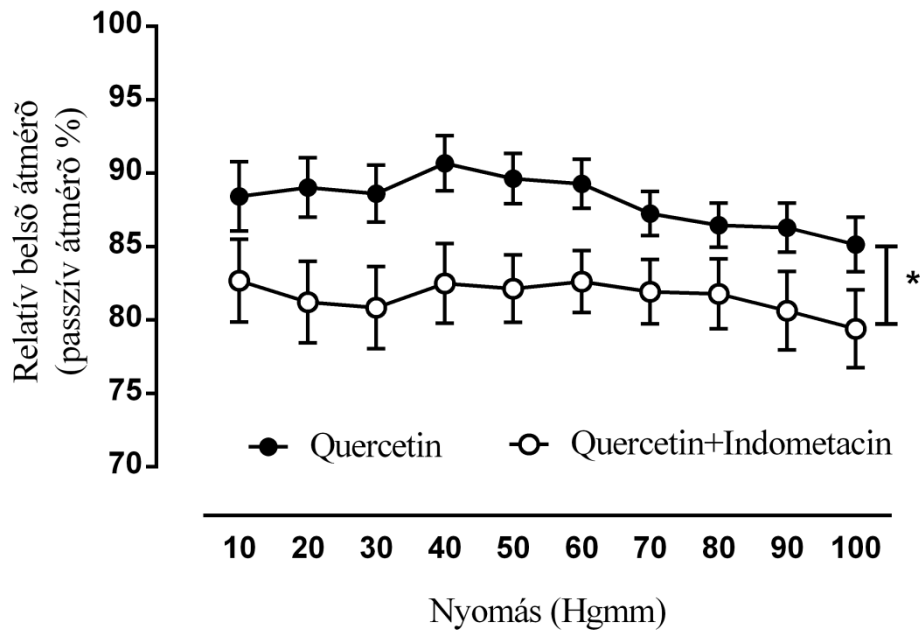
Vizsgáltuk, hogy a létrejövő vazodilatáció mértéke függ-e az érszakasz morfológiai átmérőjétől. Eredményeink szerint a 70-250  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű, fiziológias állapotú koronária arteriolák relaxációja független a passzív érátmérőtől, csak a kiindulási spontán tónustól függ (10. ábra). Különböző átmérőjű rezisztenciaerek reaktivitásának összehasonlítása csak megfelelő standardizálás után lehetséges. Mivel nem alkalmaztunk referencia kontrakciót, a standardizálás alapja az arteriola spontán tónusa volt. Az arteriolák a meglévő tónus (átlagosan a passzív átmérő  $21,3 \pm 2,3\%$ -a) mintegy felét ( $48,9 \pm 6,7\%$ ) relaxálják 100 nmol/liter quercetin hatására, mérettől és kiinduló

tónustól függetlenül (Pearson korreláció a passzív átmérő és a tónuscsökkenés aránya között,  $r = -0,03$ ,  $R^2 = 0,001$ ,  $p > 0,05$ ). Mivel az arteriolák átmérője a tónusukkal fordítottan arányos, a nagyobb tónusú, kis átmérőjű ereknél ez a relaxáció élettanilag jelentősebb, mint a kisebb tónusú, nagyobb arterioláknál.



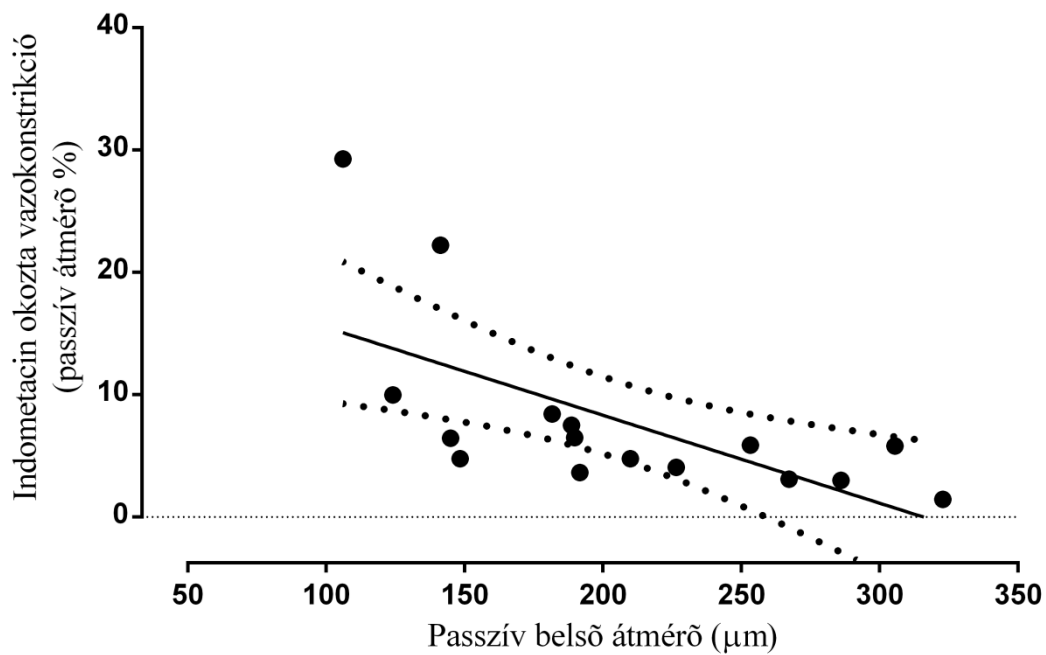
10. ábra. Az arteriolák spontán tónusa  $10^{-7}$  mol/liter quercetin hatására átlagosan a felére csökken. A tónushoz viszonyított relaxáció nem függ az arteriolák anatómiai méretétől, csak az erek spontán tónusa függ az ér kaliberétől. A korreláció tehát az arteriolák anatómiai mérete és a quercetin hatása között nem szignifikáns ( $n=16$ ). A megjelenített egyenes a lineáris regressziós egyenes, melynek egyenlete:  $Y = -0,0001 * \text{passzív belső átmérő } (\mu\text{m}) + 0,51$ . Az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma  $-0,0024$  és  $0,0022$  között van.

A dilatáció mechanizmusát indometacin és L-NAME segítségével vizsgáltuk. Indometacin  $10^{-5}$  mol/liter koncentrációban a quercetinnel dilatált arteriolák vazokonstriktóját okozta (11. ábra).



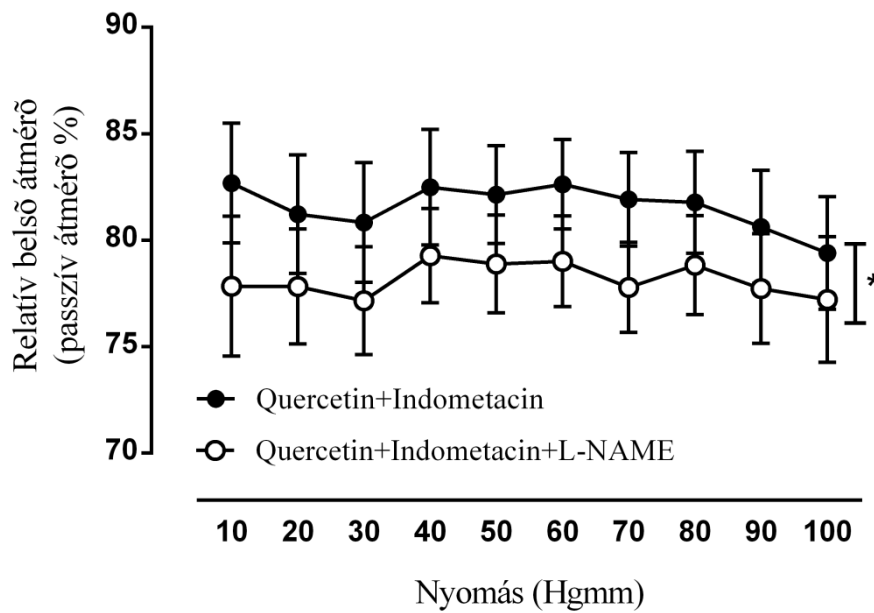
11. ábra.  $10^{-7}$  mol/liter quercetin jelenlétében (teli körök) beadott  $10^{-5}$  mol/liter indometacin hatására (üres körök) vazokonstriktió történik. Az adatok az átlag $\pm$ az átlag standard hibája formában jelennek meg. A két görbe közötti különbség kétutas ismétléses ANOVA alkalmazásakor  $p < 0,05$ , és Tukey poszt-hoc teszttel is 20-60 Hgmm között szignifikáns,  $n=16$ .

A quercetinnel dilatált koronária arteriolákban az indometacin okozta vazokonstriktió 60-100 Hgmm belső nyomás között jelentős mértékben függ az arteriolák anatómiai méretétől. Az anatómiailag kisebb arteriolákban az indometacin indukálta vazokonstriktió jelentősebb, mint a nagyobb átmérőjűekben (12. ábra). Az összefüggés 60 Hgmm-en, a fiziológias nyomás közelében volt a legerősebb,  $r=-0,65$ ,  $R^2=0,42$  (a Pearson korrelációs koefficiens konfidencia intervalluma -0,87-től -0,21-ig tart,  $p < 0,01$ ).

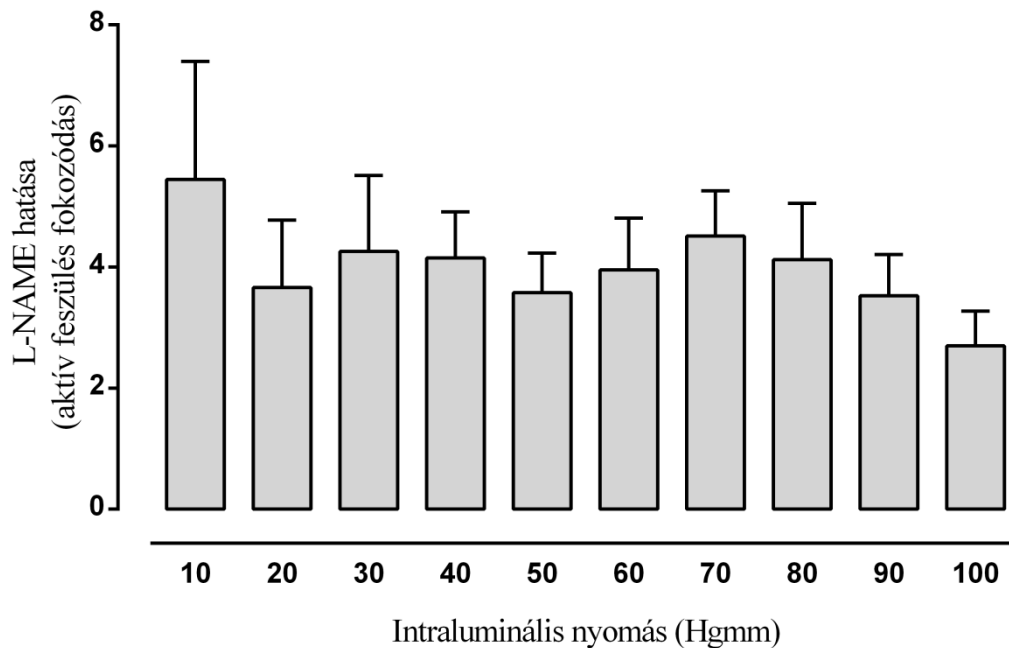


12. ábra. A quercetin előkezelés utáni indometacin okozta vazokonstrikció nagysága az arteriola anatómiai méretétől függ. A megjelenített adatok 60 Hgmm-es belső nyomásra vonatkoznak. A korreláció szignifikáns ( $p < 0,01$ ,  $n = 16$ ). A lineáris regresszió egyenlete:  $Y = -0,07 * \text{passzív belső átmérő } (\mu\text{m}) + 23,01$ . Az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma  $-0,12$  és  $-0,03$  között van, melyet a pöttyözött vonal jelez.

A quercetint és indometacint tartalmazó szuperfúziós oldathoz az eNOST gátló L-NAME-et adva a vazokonstrikció szignifikáns (13. és 14. ábra).



13. ábra.  $10^{-7}$  mol/liter quercetin és  $10^{-5}$  mol/liter indometacin jelenlétében (teli körök) L-NAME hatására (üres körök) vazokonstriktió alakul ki. Az adatok az átlag±az átlag standard hibája formában jelennek meg. A kétutas ismétléses ANOVA teszttel számított eredmény szignifikáns ( $p < 0,05$ ), és Tukey poszt-hoc teszttel számítva is 10 és 70 Hgmm-en szignifikáns,  $n=16$ . A nagy szórások oka, hogy az arteriolák méretfüggése miatt az indometacinra vonatkozó érzékenységük eltérő volt (lásd: 12. ábra), így már a kiindulási relatív átmérőkben is nagy különbségek voltak.



14. ábra.  $10^{-7}$  mol/liter quercetin és  $10^{-5}$  mol/liter indometacin jelenlétében L-NAME hatására vazokonstriktió alakul ki. A feltüntetett adatok a 13. ábrán feltüntetett adatokból számított értékek, a quercetin+indometacin, és a quercetin+indometacin+L-NAME oldatban meghatározott aktív feszülés különbségei az egyes nyomásokon. Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg. Egymintás t-próbával vizsgálva a különbség az L-NAME kezelés előtti és utáni érátmérőben minden nyomáson szignifikánsan különbözik nullától ( $p < 0,05$ ,  $n=16$ ).

Az L-NAME hatása nem korrelált az arteriola anatómiai méretével (Pearson korreláció,  $r=0,07$ ,  $R^2=0,06$ ,  $p > 0,05$ ). 50 Hgmm-en a NO szintézis gátlásával az L-NAME okozta vazokonstriktió mediánja 3,5%, az interkvartilis tartománya (IQR) 1,3 és 5,1% közt volt. A ciklooxygenáz (COX) enzim gátlásával az indometacin vazokonstriktor hatásának mediánja 7,8%, az IQR 3,1 és 10,5% volt. Tehát az indometacin alkalmazása a vizsgált arteriolákban jelentősebb vazokonstriktiót okozott, mint az L-NAME (Mann-Whitney próbával  $p < 0,01$ ).

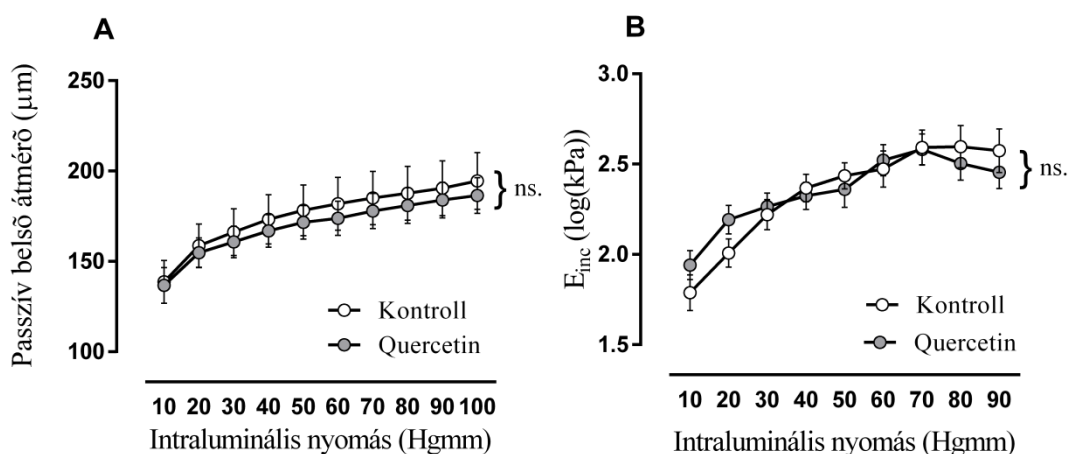


### 5.3. HOSSZÚ TÁVÚ QUERCETIN KEZELÉS HATÁSA AZ ÁLLATOK ÁLTALÁNOS ÁLLAPOTÁRA

A nyolc hetes kezelési idő végén mind a kontroll, mind a kezelt csoport tagjai egészségesek voltak. Az állatok viselkedésében, szőrzetében, testtartásában nem volt különbség. A két csoport között testtömegben (kontroll csoport:  $507 \pm 9$  g vs. kezelt csoport:  $504 \pm 10$  g, t-teszt,  $p > 0,05$ ) és szívtömegben (kontroll csoport:  $1,38 \pm 0,14$  g vs. kezelt csoport:  $1,35 \pm 0,18$  g, t-teszt,  $p > 0,05$ ) sem mutatkozott eltérés.

### 5.4. HOSSZÚ TÁVÚ QUERCETIN KEZELÉS HATÁSA A KORONÁRIA ARTERIOLÁK ÁTÉPÜLÉSÉRE

Amint már korábban említésre került, a koronária erek preparálásánál törekedtünk azonos ( $\sim 170 \mu\text{m}$ ) külső átmérőjű érszakaszok kiválasztására. A patkányok koronária hálózatainak lefutásában nagy az egyéni variancia, így nem lehet olyan anatómiai definíciót meghatározni, amely minden esetben alkalmazható lenne a vizsgálati kritériumoknak megfelelő érszakaszra. Így a standardizálás másik módszerét, az azonos átmérőjű erek összehasonlítását választottuk. A preparált erek teljesen relaxált, kalciummentes oldatban mért külső átmérőjében nem volt különbség (15. ábra A panel). Az azonos körülmények között vizsgált izobár inkrementális elasztikus modulus értékek sem különböztek statisztikailag egymástól (15. ábra B panel).

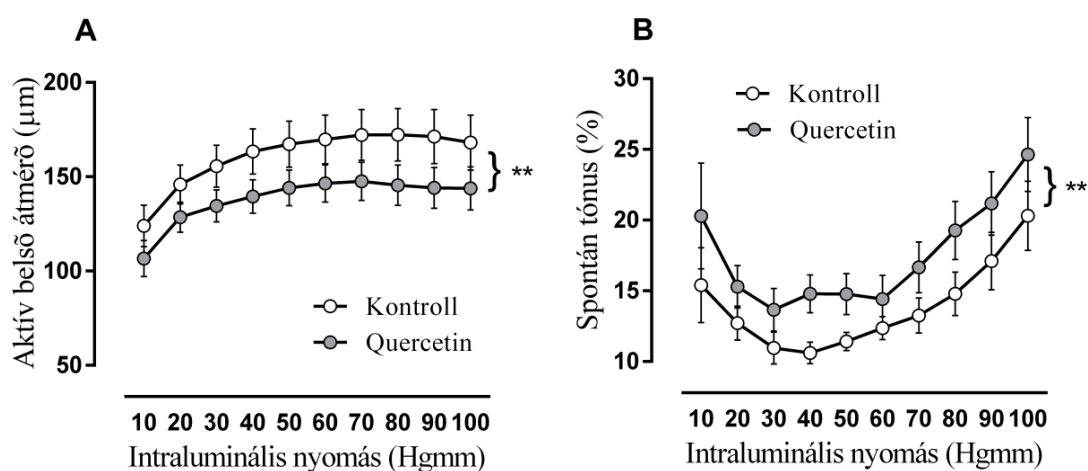


15. ábra. Passzív tulajdonságok.

A panel: passzív belső átmérő az intraluminális nyomás függvényében. Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{az átlag standard hibája}$  formában jelennek meg. A két csoport passzív, maximális belső átmérője nem különbözött egymástól (kétutas ANOVA  $p > 0,05$ ,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinrel kezelt).

B panel: inkrementális elasztikus modulus az intraluminális nyomás függvényében. Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{az átlag standard hibája}$  formában jelennek meg. A csoportok között nem volt szignifikáns különbség (kétutas ANOVA  $p > 0,05$ ,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinrel kezelt).

Az erek kiválasztásakor (a  $4^{\circ}\text{C}$ -os, hipoxiás szívizomban) a teljesen relaxált érátmérő alapján szelektáltunk. Azonban meleg ( $37^{\circ}\text{C}$ ), oxigenizált ( $20\% \text{ O}_2$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ,  $75\% \text{ N}_2$ ) normál Krebs-Ringer oldatba helyezve kifejlődött az érszégmensek spontán tónusa, ami kialakította az aktív érátmérőt. A két csoport aktív viszonyok közt mért belső érátmérője szignifikánsan különbözött egymástól (16. ábra A panel,  $p < 0,01$ ), amit a spontán tónus jelentős eltérése okozott (16. ábra B panel,  $p < 0,01$ ). Megfigyelhető, hogy az intraluminális nyomás emelkedésével a belső átmérő 50 és 100 Hgmm között nem változik, ellenben a spontán tónus egyre fokozódik (Bayliss effektus). A spontán tónus görbéjének (16. ábra B panel) „U” alakja megtévesztő. A 30 Hgmm alatti magas spontán tónus értékek mérési artefakt eredményei, mivel az alacsony intraluminális nyomáson az arteriolák telődése és cilindrikus geometriája nem biztosított. A geometria torzulása miatt a valósnál alacsonyabb átmérőértékeket mérhetünk, ami magas spontán tónusnak tűnik. Az intraluminális nyomás emelkedésekor a Bayliss effektus miatt a spontán tónus értéke emelkedik.

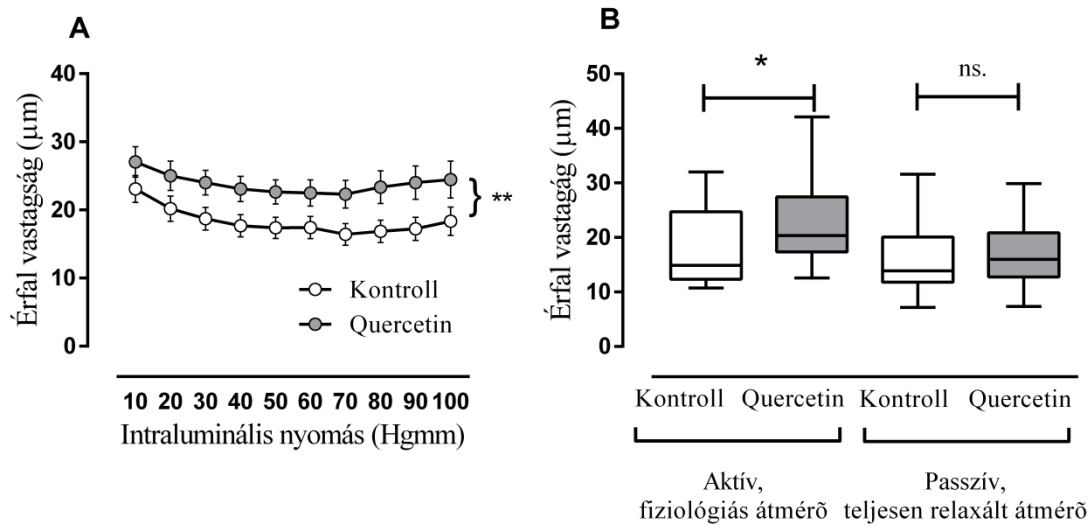


16. ábra. A hosszú távú quercetin kezelés hatása a koronária arteriolák spontán kontrakció alatt mérhető belső átmérőjére és tónusára.

A panel: belső érátmérő az intraluminális nyomás függvényében. A kezelt csoport koronária arterioláinak belső átmérője szignifikánsan kisebb volt (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , Tukey poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinnel kezelt). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

B panel: a nyugalmi körülmények között, normál Krebs-Ringer oldatban mért átmérőből számított spontán tónus a passzív átmérő százalékában, az intraluminális nyomás függvényében. A kezelt csoport arterioláinak spontán tónusa szignifikánsan magasabb (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , Tukey poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinnel kezelt). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

A magasabb spontán tónus ebben az aktív állapotban egy látszólagos falvastagodást eredményezett (17. ábra A panel,  $p < 0,05$ ). Az érfal vastagodás különösen szembeötlő, hiszen a vastagabb falú kezelt csoport arterioláinak kisebb volt a lumene, azonos külső átmérő mellett. A falvastagodás passzív körülmények között, a simaizom kontrakció megszűnésével eltűnik (17. ábra B panel), és passzív állapotban a falvastagság értékek nem különböznek. Így arra következtethetünk, hogy aktív állapotban a kontroll csoporthoz képest kisebb lumen oka a kezelt csoportban megvastagodott érfal és a magasabb spontán tónus volt.



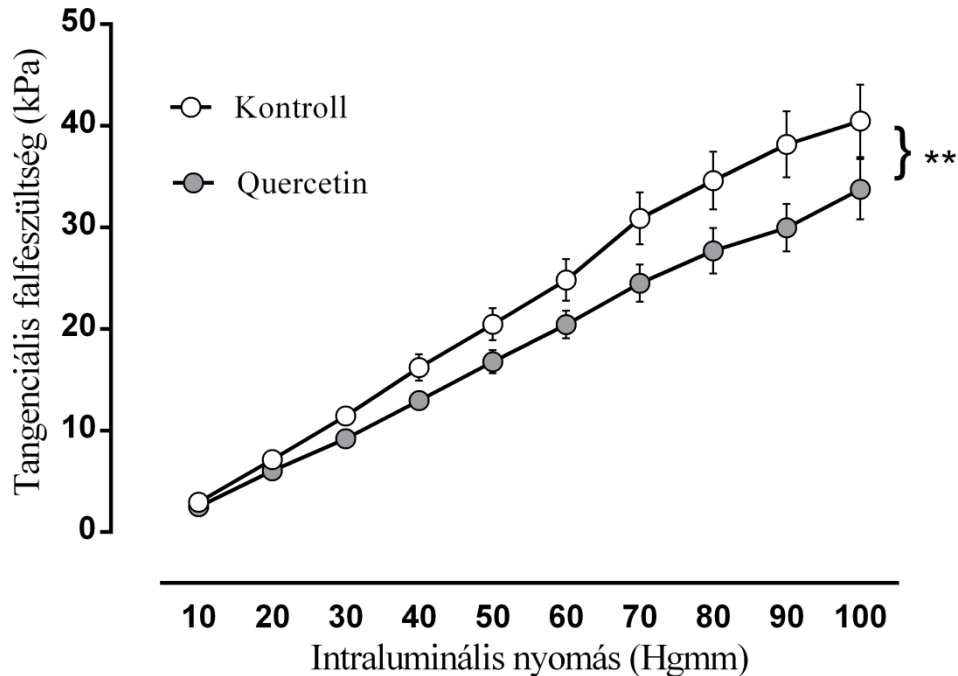
17. ábra. A quercetin kezelés hatására jelentkező érfal vastagodás.

A panel: aktív állapotban mérhető érfal vastagság az intraluminális nyomás függvényében. A kezelt csoport arterioláiban érfal vastagodást mértünk aktív körülmények között, normál Krebs-Ringer oldatban (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinnel kezelt). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{az átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

B panel: érfal vastagság 50 Hgmm-es intraluminális nyomáson. Az aktív állapot normál Krebs-Ringer oldatban, a passzív állapot kalciummentes Krebs-Ringer oldatban mért értékeket jelent. Aktív állapotban az A panelen bemutatott, jelentős falvastagság különbség mérhető (Mann-Whitney próba,  $p < 0,05$ ), ami teljesen relaxált, passzív állapotban eltűnik (Mann-Whitney próba,  $p > 0,05$ ). Az adatok mediánként és interkvartilis tartományként vannak megjelenítve, kiegészítve a minimum és maximum értékekkel ( $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinnel kezelt).

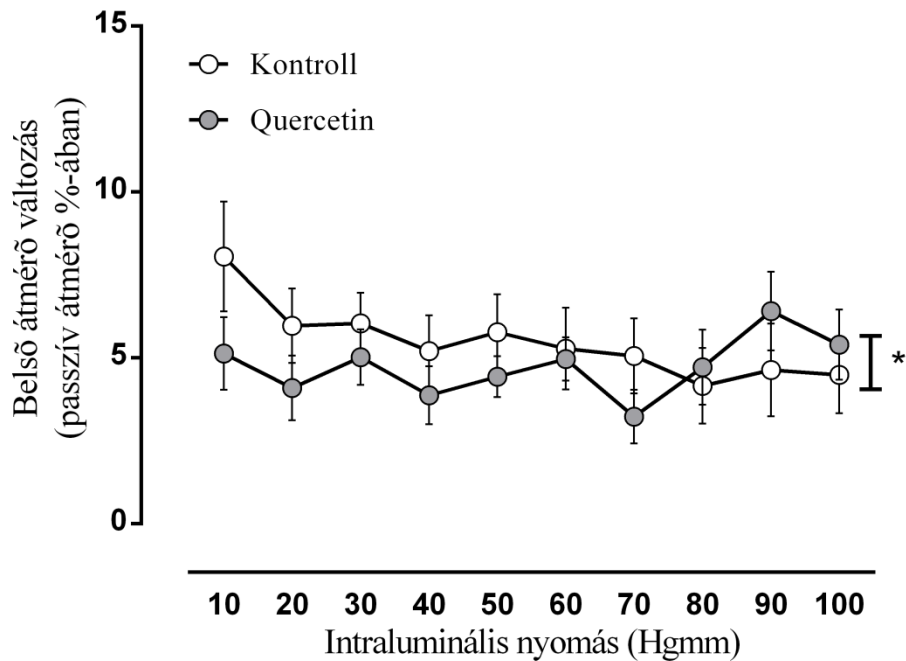
Az aktív állapotban jelentkező falvastagodásból Laplace törvénye alapján következik a tangenciális falfeszülés csökkenése (18. ábra,  $p < 0,01$ ). Az intraluminális nyomás növekedésével a feszültség csökkenése mind szembeötlőbb. Az adatokra lineáris regresszióval egyenest illesztve az egyenesek meredeksége szignifikánsan különbözik (kontroll:  $Y = 0,44 * \text{intraluminális nyomás} - 1,25$ , az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma 0,39 és 0,48 között van, quercetinnel kezelt:  $Y = 0,35 *$

intraluminális nyomás – 0,94, az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma 0,31 és 0,38 között van,  $p < 0,05$ ).



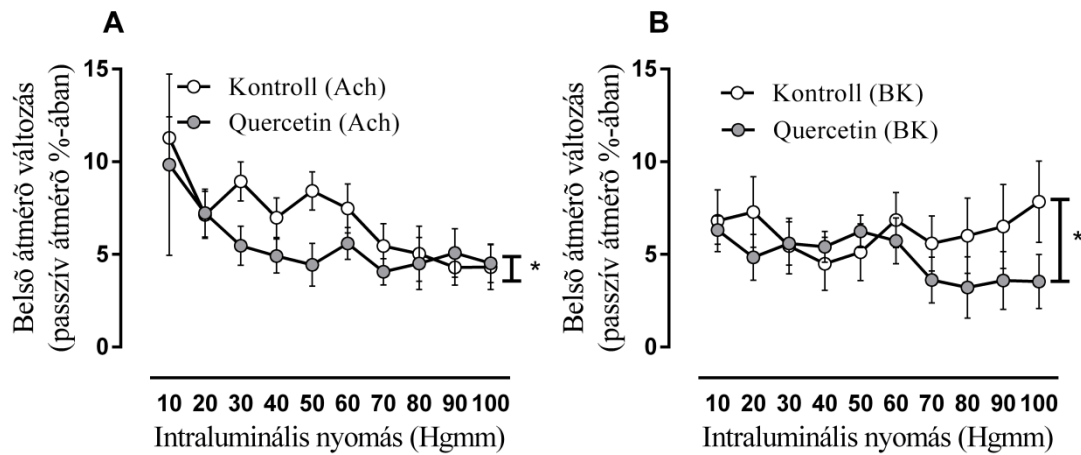
18. ábra. Tangenciális, körfogat menti falfeszültség az intraluminális nyomás függvényében aktív állapotban. Az ebben az állapotban tapasztalt érfal vastagodás szignifikáns falfeszültség csökkenést eredményez (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , de Tukey poszt hoc teszttel nem különbözik,  $n=20$  kontroll és  $n=22$  quercetinnel kezelt). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

10  $\mu\text{mol/liter}$  noradrenalin hatására mindkét csoportban az intramurális koronária erek esetén várható (169) vazodilatációt tapasztaltunk, de a kezelt csoport dilatációja elmaradt a kontroll csoportétól (19. ábra,  $p < 0,01$ ).



19. ábra. 10  $\mu$ mol/liter noradrenalin inkubáció hatására létrejövő vazodilatáció. A kezelt csoport dilatációja szignifikánsan csökkent (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , Tukey poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=10$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

Az endoteliális funkcióra az eNOS nyugalmi aktivitása (normál Krebs-Ringer oldatban), teljes aktiválása (bradikinin vagy acetilkolin hatására), és teljes gátlása (L-NAME hatására) létrejövő érátmérőkből következtettünk. Mind a maximális aktivitás kiváltotta vazodilatációt, mind a teljes gátlás okozta vazokonstrickiót a normál Krebs-Ringer oldatban mért érátmérőhöz viszonyítottuk. Mindkét endotél függő vazodilatátor, az acetilkolin és a bradikinin hatására vazodilatációt tapasztaltunk. Azonban a kontroll csoporthoz képest a quercetinnel kezelt állatokból származó arteriolák dilatációja mindkét esetben kisebb mértékűnek bizonyult, mint a kontroll csoporté (20. ábra).

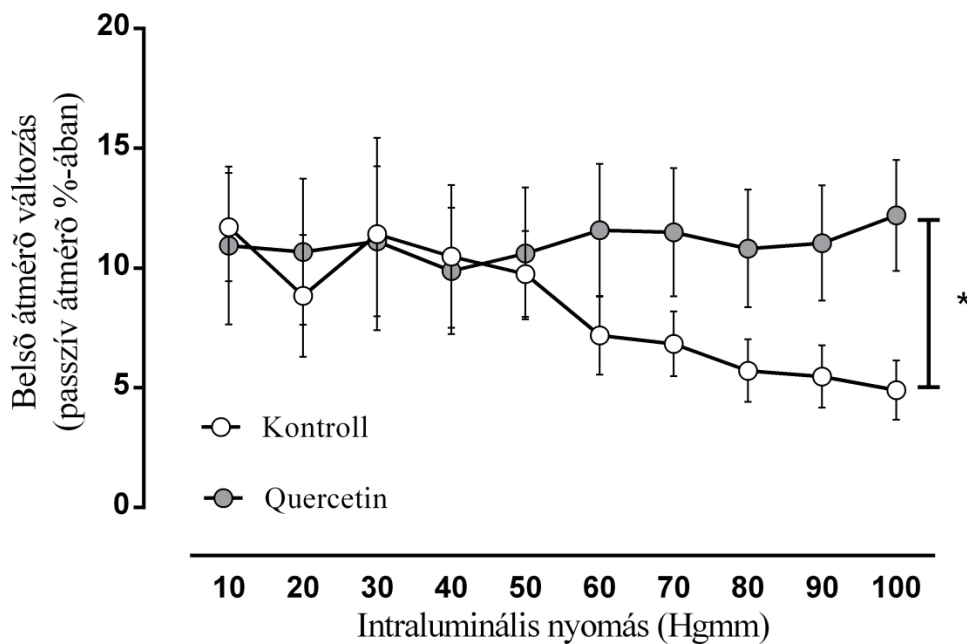


20. ábra. Endoteliális dilatáció vizsgálata.

A panel: 10 µmol/liter acetilkolin (Ach) hatása. A kezelt csoport arteriolái csökkent vazodilatációt mutattak (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , Tukey poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=10$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt). Az adatok az átlag $\pm$ az átlag standard hibája formában jelennek meg.

B panel: 1 µmol/liter bradikinin (BK) hatására a kezelt csoportban csökkent vazodilatációt tapasztaltunk (kétutas ANOVA,  $p < 0,01$ , Tukey poszt hoc teszttel nem szignifikáns,  $n=12$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt). Az adatok az átlag $\pm$ az átlag standard hibája formában jelennek meg.

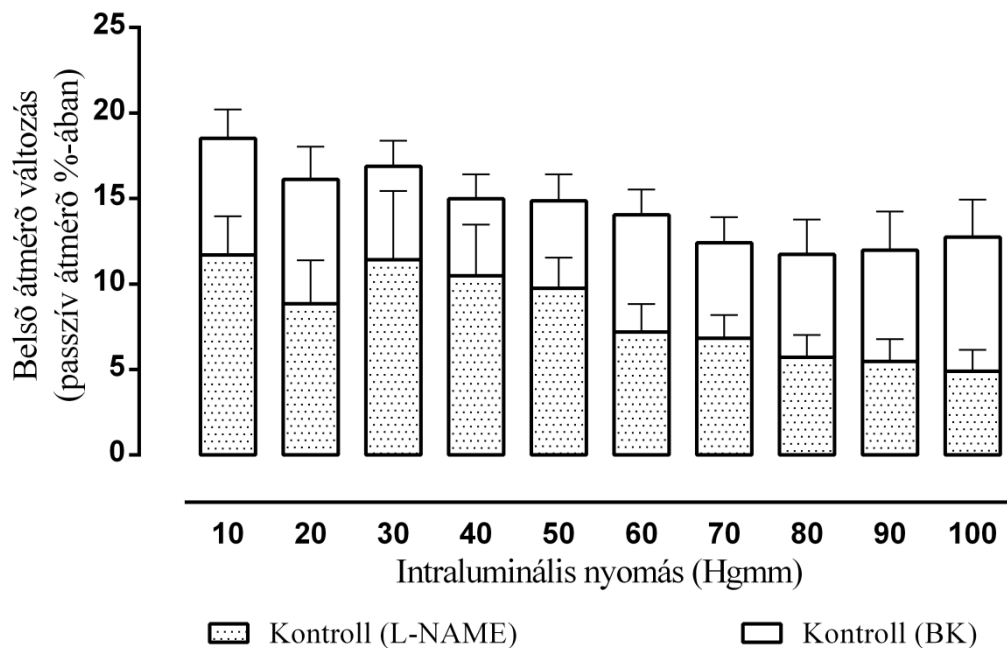
Az eNOS teljes gátlására jelentős, mintegy 10%-os vazokonstriktió alakult ki mindkét csoportban. A quercetinnel kezelt csoport vazokonstriktiója 60-100 Hgmm között magasabb volt, mint a kontroll csoporté. A kontroll csoportban tapasztalt vazokonstriktió az intraluminális nyomás emelkedésével fokozatosan csökkent, míg a quercetinnel kezelt csoportban állandó értéken maradt (21. ábra)



21. ábra. 100  $\mu\text{mol/liter}$  eNOS gátló L-NAME hatására a kezelt csoportban jelentősebb vazokonstriktió alakult ki (kétutas ANOVA,  $p < 0,05$ , Tukey poszt hoc: 60-100 Hgmm,  $n=12$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt, a B protokoll alapján mért érték). Az ábra a normál Krebs-Ringer oldatban mért érátmérő és az L-NAME oldatban mért érátmérő eltérését mutatja. Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg.

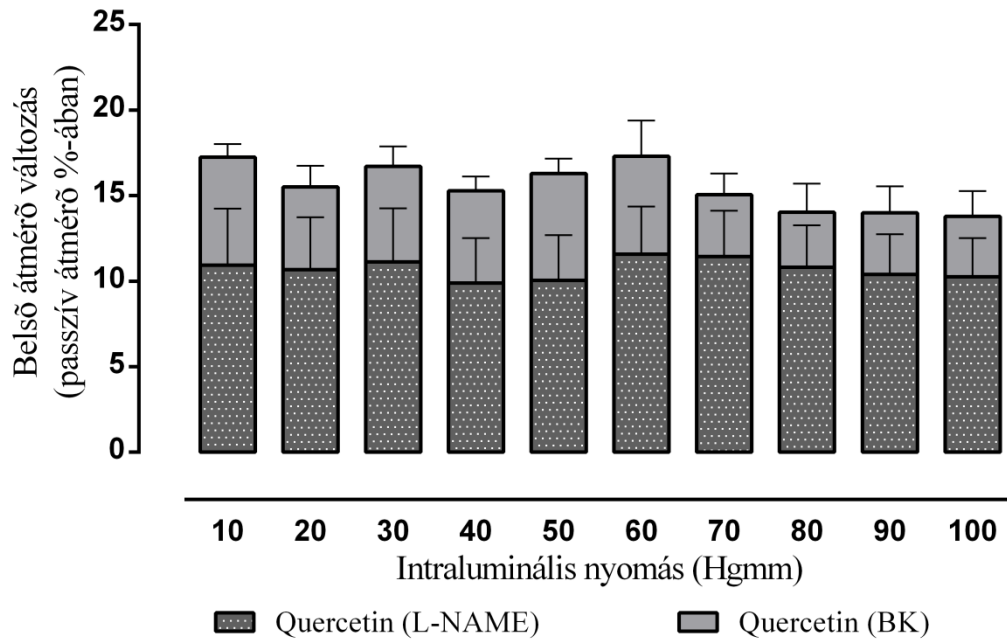
Mindezek fényében három állapotban (normál Krebs-Ringer, bradikinin és L-NAME) mért érátmérőből következtethetünk az endotél függő vazodilatáció mértékére fiziológias körülmények között, farmakonoktól mentes állapotban. Ennek nyomásfüggése jelentős, így az eredményeket ennek fényében szabad csak vizsgálni. A kontroll csoport arterioláiban az intraluminális nyomás fokozódásával a bazális, normál Krebs-Ringer oldatban működő NO produkció visszaszorul, amire az L-NAME hatásának csökkenéséből következtethetünk (22. ábra).





22. ábra. Az endotél függő vazodilatáció aktivitásának változása a kontroll csoportban. Az oszlopok alsó, mintás tartománya a normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított L-NAME hatására létrejövő érátmérő változást mutatja, míg a felső, nem mintás tartomány a normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított, bradikinin hatására létrejövő érátmérő változás. A két hatás összege az endotél függő vazodilatáció teljes tartománya. Ez a tartomány nem függ az intraluminális nyomástól (egyutas ANOVA,  $p > 0,05$ ), de a normál Krebs-Ringer oldatban való aktivitása, melyet a mintás tartomány jelez, nyomásfüggő jelenség (egyutas ANOVA,  $p < 0,05$ ). Az adatok azonosak a korábban megjelenített 20. B és 21. ábrák adataival, az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg,  $n=12$  kontroll és  $n=12$  quercetinrel kezelt.

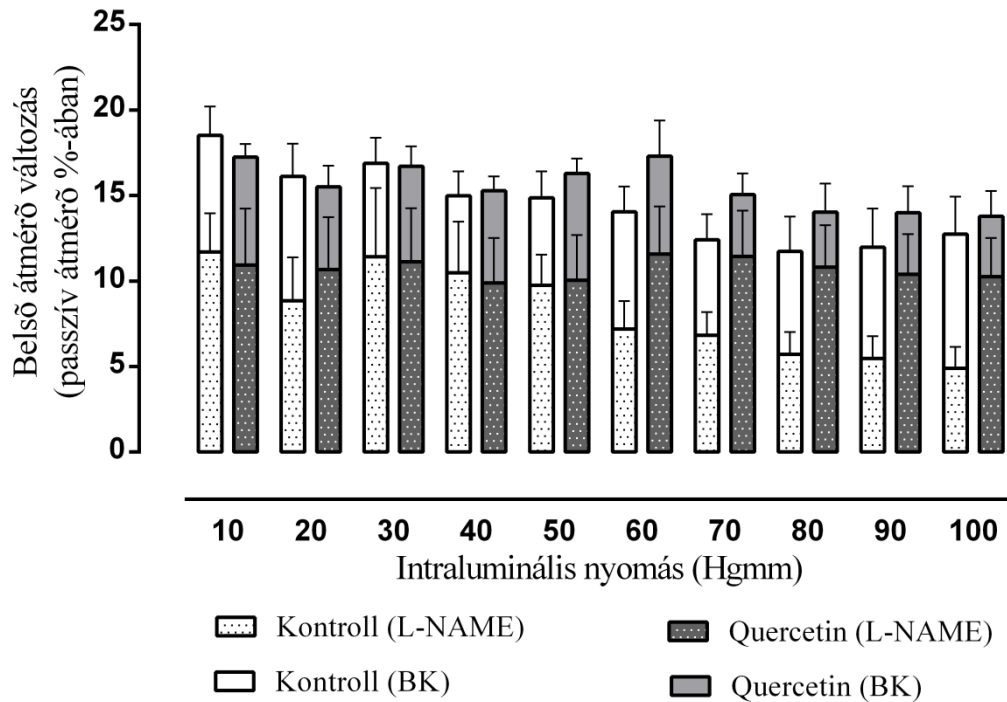
A quercetinnel kezelt csoport arterioláiban az endotél függő vazodilatáció teljes tartománya a kontroll csoporthoz hasonlóan nem függ az intraluminális nyomástól. Azonban a normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított L-NAME hatására létrejövő érátmérő változás, mely a bazális NO produkcióra utal, szintén intraluminális nyomástól függetlennek bizonyult (23. ábra).



23. ábra. Az endotél függő vazodilatáció aktivitásának változása a quercetinnel kezelt csoportban. Az oszlopok alsó, mintás tartománya a normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított L-NAME hatására létrejövő érátmérő változást mutatja, míg a felső, nem mintás tartomány a normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított, bradikinin hatására létrejövő érátmérő változás. A két hatás összege az endotél függő vazodilatáció teljes tartománya. Ez a tartomány nem függ az intraluminális nyomástól (egyutas ANOVA,  $p > 0,05$ ), és normál Krebs-Ringer oldatban való aktivitása sem nyomásfüggő jelenség (egyutas ANOVA,  $p > 0,05$ ). Az adatok azonosak a korábban megjelenített 20. B és 21. ábrák adataival, az átlag $\pm$ az átlag standard hibája formában jelennek meg,  $n=12$  kontroll és  $n=12$  quercetinnel kezelt.

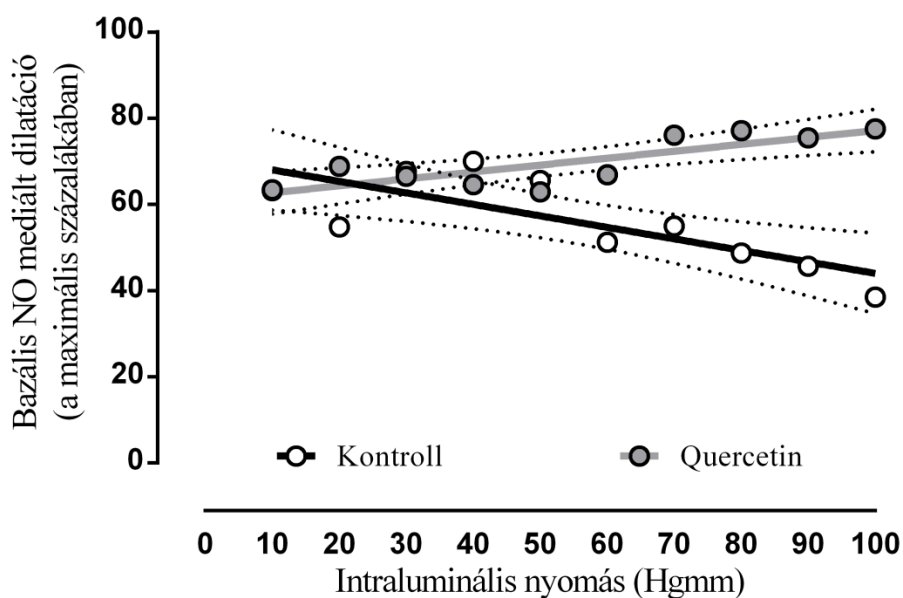
A két ábrát együttesen vizsgálva látható, hogy az endotél függő vazodilatáció tartománya (az L-NAME és a bradikinin normál Krebs-Ringer oldathoz viszonyított hatásának, az ábrán a mintás és a nem mintás oszlopok magasságának összege) nem

különbözik egymástól szignifikánsan egyik nyomáson sem (24. ábra, kétutas ANOVA,  $p > 0,05$ ). A mintás oszloprészek jelezte L-NAME hatás, mely a nyugalmi, normál Krebs-Ringer oldatban létrejövő NO mediált vazodilatációra enged következtetni, a kontroll csoportban az intraluminális nyomástól függ, viszont a quercetinrel kezelt csoportban ettől független.



24. ábra. Összefoglaló ábra a bazális és serkentett eNOS működéséről. Az L-NAME-mel mért, nyugalmi állapothoz viszonyított vazokonstriktió a bazális NO produkcióról informál (mintás oszloprész), míg a koronáriák vizsgálatához alkalmasabb bradikinin a bazális állapothoz képest maximálisra növelte a NO termelést (minta nélküli oszlopszakasz). A két hatás összege így a maximális endotél eredetű dilatáció, melyben nincs különbség (kétutas ANOVA,  $p > 0,05$ ). Azonban, míg a kontroll csoportban az intraluminális nyomás csökkenésével a bazális NO termelés csökken, a kezelt csoportban magas értéken marad, így kevés tér marad az eNOS további serkentésére (kétutas ANOVA,  $p < 0,05$ ). Az adatok az  $\text{átlag} \pm \text{átlag standard hibája}$  formában jelennek meg,  $n=12$  kontroll és  $n=12$  quercetinrel kezelt.

Mindezen adatokból kiszámítottuk a NO mediált endoteliális vazodilatáció teljes tartományának arányában a normál Krebs-Ringer oldatban tapasztalható eNOS aktivitás arányát. Az adatokra az intraluminális nyomás függvényében lineáris regressziós egyenest illesztve a két csoport közötti különbség szembeötlő. A kontroll csoport regressziós egyenese:  $Y = -0,27 * \text{intraluminális nyomás} + 70,72$ . Az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma  $-0,44$  és  $-0,10$  között van. Az egyenlet  $R^2$  értéke  $0,61$ . A quercetinnel kezelt csoport lineáris regressziós egyenesének egyenlete:  $Y = 0,16 * \text{intraluminális nyomás} + 61,13$ . Az egyenes meredekségének konfidencia intervalluma  $0,06$  és  $0,25$  között van. Az egyenlet  $R^2$  értéke  $0,66$ . Ezek alapján a két együttható szignifikánsan különbözik (25. ábra,  $p < 0,05$ ). Ezek alapján tehát a quercetinnel kezelt arteriolákban az emelkedő intraluminális nyomás ellenére állandó, a kontroll csoportokénál magasabb maradhat az eNOS aktivitása.



25. ábra. A nyugalmi NO mediált, endotél függő vazodilatáció aktivitása a teljes NO függő érválasz százalékában. A teljes NO függő érválasz kiszámításához a normál Krebs-Ringer oldatban mért érátmérőhöz viszonyított teljes, L-NAME-mel létrehozott eNOS gátlás okozta érátmérő változás és a bradikininnel létrehozott maximális eNOS aktivitás okozta érátmérő-változás összegét használtuk. Ennek százalékában határoztuk meg a normál Krebs-Ringer oldatban mért érátmérőhöz képest az L-NAME okozta érátmérő változást, ami a normál Krebs-Ringer oldatban az eNOS aktivitásának

mértékéről informál. Az adatok egyes nyomáson vett átlagaira egyenest illesztettünk. A szaggatott vonal jelzi az illesztett egyenesek 95%-os konfidencia intervallumát. A két egyenes szignifikánsan különbözik ( $p < 0,01$ ).

## 6. MEGBESZÉLÉS

A polifenolok közé tartozó flavonoid, a quercetin a napi flavonoid bevitelünk nagy részét teszi ki különböző glikozidált és aglikon formáiban (170). Ez jelentős mennyiség, körülbelül napi 28-42 mg (13), amelynek már számottevő biológiai hatásai lehetnek. A humán vizsgálatok komplex kardiovaszkuláris rizikó-csökkentő hatásokról számoltak be. Azonban a quercetin koronária rezisztencia erekre gyakorolt közvetlen hatásaira vonatkozó adatok, melyek ismerete a miokardium vérellátás szabályozásának megértése szempontjából kulcsfontosságúak volnának, ez ideig nem álltak rendelkezésre.

Bemutatott eredményeink alapján a quercetin intramurális koronária arteriolákra gyakorolt akut és hosszú távú hatásának mechanizmusa alapvetően különbözik egymástól. Rövid távon, akut hatásként a quercetin a fiziológiás koncentrációban is kifejti vazodilatáló hatást a koronária arteriolákra. Ennek a dilatációnak a vazodilatátor prosztanoidok, például a prosztaciklin, jelentősebb mediátora lehet, mint a NO. A kialakuló hatás mértéke független az arteriola spontán tónusától. Mivel az érátmérő csökkenésével a spontán tónus egyre fokozottabb, a kisebb arteriolákban a quercetin hatása élettanilag jelentősebb, és az érátmérő csökkenésével a prosztanoidok szerepe egyre hangsúlyosabbá válik.

Hosszú távon ugyanakkor a bazális NO szintézis quercetin okozta fokozása a koronária arteriolákban nagyon is jelentős lehet. Emellett a hosszú távú szupplementáció hatására az arteriolák spontán tónusa is fokozódik, a magasabb spontán tónus következménye pedig az érfal vastagodása és a falfeszülés csökkenése. Ezen folyamatok eredményeképp a koronária arteriolákban egy új egyensúlyi helyzet alakul ki a vazodilatátor és vazokonstriktor mechanizmusok között, ami a koronária keringési rezerv kisélesedésével jár.

### 6.1. A QUERCETIN AKUT, DÓZISFÜGGŐ RELAXÁCIÓS HATÁSA

#### PATKÁNY INTRAMURÁLIS KORONÁRIA ARTERIOLÁN *IN VITRO*

A quercetin dózis függő vazodilatátor hatást fejt ki az intramurális koronária arteriolákon. Ez a dilátor hatás már két nagyságrenddel a fiziológiás plazmakoncentráció (kb. 100 nmol/liter (13, 167)) alatt, 1 nmol/liter koncentrációban is szignifikáns. 100 nmol/liter

koncentrációban átlagosan  $10,1 \pm 1,5\%$ -os belső érátmérő növekedést idéz elő, míg a legtöményebb,  $10 \mu\text{mol/literes}$  oldat gyakorlatilag teljesen relaxálta a koronária arteriolákat. Ezt az élettanilag is jelentős mértékű, közvetlen vazodilatációs hatást a szív szöveti vérellátásának szabályozása szempontjából kulcsfontosságú rezisztencia ereken, (az *in vivo* körülményeket leginkább modellező nyomás angiométer technikával) legjobb tudásunk szerint munkacsoportunknak sikerült először kimutatni. Kvantitatív vizsgálataink eredményei alapján feltételezhető, hogy a plazma quercetin koncentrációja a koronária arteriolák átmérőjének élettani körülmények között is fontos szabályozója. Nagyobb átmérőjű aorta (105) és koronária ereken (120) végzett miográfós vizsgálatok irodalmi adatai alapján feltételeztük, hogy a dilátor hatás mind endotél függő (171), mind endotél független (55) útvonalon kialakul. Kísérleteinkben a vazodilatáció endotél függő mechanizmusát vizsgáltuk.

## 6.2. QUERCETIN AKUT HATÁSMÓDJA

Korábbi adatok szerint a quercetin vazodilátor hatása jelentősebb a rezisztenciaereken, mint az artériákon, ugyanis a hatás az érátmérő csökkenésével fordított arányban fokozódik (55). Így érdemesnek találtuk a quercetin érhatásait a koronária arteriolák átmérőjének függvényében vizsgálni. Eredményeink szerint, a  $70\text{-}250 \mu\text{m}$  belső átmérőjű koronária erek esetében a hatás valójában nem a méret, hanem a spontán tónus függvénye. A fiziológiás koncentrációjú ( $100 \text{ nmol/liter}$ ) quercetin oldat hatását a változó méret függvényében csak kellő standardizálás után vizsgálhatjuk. A nyomás angiométer technika előnye, hogy nem szükséges farmakológiai prekontrakciót létrehozni egy vazodilátor hatás vizsgálatához, mert a rezisztencia erek megfelelő inkubálás után felveszik a fiziológiás nyugalmi tónusukat. Ezt spontán tónusnak nevezzük. Ez a spontán tónus nagyobb az egyre kisebb érátmérők esetén. A fiziológiás állapotban mért belső érátmérőt a passzív belső átmérőre normalizálva megkapjuk a spontán tónus értékét, mellyel különböző erek átmérői és farmakonokra adott reakciói összehasonlíthatóak. A quercetin oldat ezt a tónust érátmérőtől függetlenül nagyjából a felére csökkentette. Tehát a quercetin vazodilátor hatása valójában nem az érátmérőtől függ, ahogyan azt korábban publikálták (55, 101), hanem a nyugalmi tónustól, ami viszont függ az érátmérőtől is. (Megjegyzendő, hogy a kialakult spontán tónus nem tökéletes megfelelője az *in vivo* állapotnak, hiszen sem a működő miokardiumból

érkező metabolikus vagy más humorális hatások, sem a vegetatív beidegzés, és esetünkben az áramlás indukálta hatások sem érvényesültek a preparátumban. A „spontán” kifejezés így a vaszkuláris simaizmok intrinzik, önálló tevékenységének eredményét írja le, ami nagymértékben hozzájárul az *in vivo* áramlási rezerv kialakításához.) A tónuscsökkenés igen jelentős dilatációt eredményez, ami Hagen-Poiseuille törvénye szerint a nagyobb, 150 µm átmérő feletti arterioláknál 22-28%, míg a kisebb, 150 µm átmérő alatti arterioláknál 42-50%-os véráramlás fokozódáshoz vezethet. Így a quercetin vazodilatációs hatása jelentősebb az érátmérő csökkenésével.

A flavonoidok vaszkuláris hatásait tárgyaló szakirodalom többsége endotél függő, NO mediált dilatációról számol be (4, 100, 102, 103, 105, 107, 110, 171, 172). Azonban a quercetin komplex hatásmechanizmusa egyéb mechanizmusok szerepét is felveti. Vizsgálataink eredménye a prosztanoid szintézis modulálását valószínűsíti. Vizsgálatainkban a COX gátló indometacin hatására vazokonstriktió következett be. Önmagában, quercetin előkezelés nélkül a COX enzim gátlása nem befolyásolja az értónust és átmérőt intramurális koronária arteriolákban az általunk alkalmazott nyomástartományban (173, 174). Az előzetesen beadott 100 nmol/liter quercetin hatására kialakult az endotél függő és független vazodilatáció, amelyet az indometacin csökkentett. Eredményeink szerint a vazodilatátor hatás jelentős része vazodilatátor prosztanoidok felszabadulása révén valósul meg, feltehetően a prosztaciklin domináns szerepével. Sejtkultúra vizsgálatok alapján a quercetin gátolja a COX-2 enzim kifejeződését (175), de a COX-1 enzim működését (176) és a prosztaciklin szintézist *in vivo* is serkenti (177). Hasonló, prosztaciklin mediált dilatációt igazoltak már aortában (109) és portális vénában (100), de rezisztencia ereken, köztük a koronária arteriolában még nem. Ennek kapcsán felmerül az általunk vizsgált érátmérőknél is kisebb, terminális arteriolák esetében az endotél eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) szerepe. Koronária ereken az EDHF egyes teóriák szerint szintén arachidonsav származék (161), így a quercetin ezen arteriolák dilatációját egyéb útvonalon is előidézheti.

A szakirodalomban leginkább a flavonoidok endotél függő, NO mediált vazodilatátor hatása kerül tárgyalásra (4, 100, 102, 103, 105, 107, 110, 171, 172). Eredményeink megerősítik a NO felszabadulás okozta vazodilatációt, de ennek mértéke a rezisztencia ereken nem olyan jelentős, mint a prosztanoid szintézis modulálásával mediált



vazodilatáció. Az ellentmondás háttérében részben történeti, részben szabályozás elméleti kérdések állnak. A flavonoidok vaszkuláris hatásainak feltárását a mechanizmusok leírására leginkább alkalmas miográf technikával végezték, aorta gyűrűkön. Az érátmérő csökkenésével azonban a dilátor mechanizmusok két fő képviselőjének, a prosztaciklin és a NO részvételének aránya megváltozik. Az érátmérő csökkenésével mindkét mediátor élettani szabályozó szerepe egyre hangsúlyosabbá válik (178), a prosztanoid szintézis azonban egyre inkább a vazodilátor prosztanoidok felé tolódik el (173). Ez magyarázatul szolgál azon eredményünkre, hogy a COX gátlásával létrejövő vazokonstrikció mértéke fordítottan arányos az arteriola kaliberével. Az egyre kisebb erek tónusának beállításában egyre jelentősebb ez a mechanizmus, így a quercetin prosztanoid mediált hatása is hangsúlyosabb. Ilyen korrelációt az érátmérő és a NO mediált quercetin hatás felfüggesztés között nem találtunk. Az L-NAME hatására létrejövő érátmérő csökkenés szignifikáns és élettanilag jelentős ugyan, de nem sokkal magasabb az indometacin kezelés után, quercetin előkezelés nélkül tapasztalható vazokonstrikciónál (173). A bazális NO szintézist tehát az akut quercetin kezelés csak kismértékben változtatja meg. Ez egybecseng az akut quercetin alkalmazása során nyert humán FMD kísérletes adatokkal is. Az eredményeket árnyalja, hogy hatás kiváltásához szükséges quercetin szérum koncentrációnak már szabadgyök fogó hatása is van (179), amivel meghosszabbíthatja a NO féléletidejét és megnövelheti a biológiai hatását.

Az akut quercetin kiváltotta endotél eredetű vazodilatáció koronária arteriolákban tehát NO és prosztanoid mediált útvonalon is létrejön. A prosztanoid mediált relaxáció az érátmérő csökkenésével egyre kifejezettebbé válik a koronária arteriolákban.

Kísérletünk limitációja, hogy a méréseket áramlás-mentes állapotban vizsgáltuk, így sem folyamatos, sem a koronária erekre jellemző pulzatis áramlás és nyírófeszültség nem érte az endotélt. Áramlás hatására a nyíróerő indukálta NO felszabadulás prosztaciklin koncentráció változással is jár (180), így valószínűsíthetjük, hogy a quercetin kezelés megváltoztatja a nyíróerőre adott dilátor választ. Rendszerünkben a hemodinamikai erőktől elkülönítve, tisztán farmakológiai jelenségként vizsgáltuk a quercetin kiváltotta vazodilatációt.

### 6.3. HOSSZÚ TÁVÚ QUERCETIN KEZELÉS HATÁSA A KORONÁRIA ARTERIOLÁK ÁTÉPÜLÉSÉRE

Az akut quercetin hatás tisztázására végzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy az érfal proosztanoid szintézisének megváltozása a dilátor hatás jelentős eleme. Az endogén proosztanoid szintézis hosszú távon befolyásolja a vaszkuláris remodeling folyamatát (174), így a következő logikus lépés a krónikus quercetin szupplementáció vizsgálata volt.

Eredményeink szerint a quercetin kezelés hatása nem érinti az érfal passzív elemeinek átépülését. A passzív állapotban mért érátmérő és falvastagság adatok szerint nem történt változás a falvastagság/lumen arányban. Az inkrementális elasztikus modulus alapján nem történt változás a kollagén és elasztin arányban. Korábbi vizsgálatok a hasi aorta rugalmas tulajdonságainak javulásáról számoltak be (155). Ezt a hatást azonban jelentősen magasabb, 100 mg/ttkg quercetin dózissal érték el, ballon katéterrel végzett sértést követően. A két érszakasz direkt összehasonlítása nem releváns, az aorta és a rezisztenciaerek eltérő hemodinamikai funkciói más-más biomechanikai paramétereket kívánnak meg. Az általunk vizsgált érátmérő tartományban a vérnyomás pulzációja már jelentősen csökkent az aortához képest, így a rugalmasság fokozódása a rezisztencia erekben nem várható. Másrészt a fenti vizsgálatban alkalmazott dózis már egyértelműen a farmakológiai tartományba esik. Az általunk alkalmazott dózis (30 mg/ttkg patkányban) nagyjából 5 mg/kg humán dózissal felel meg (181). Ez a humán vizsgálatokban használt 500 mg napi dózis (6, 26, 182) patkány megfelelője, az étrend kiegészítők és alacsonyabb dózissal farmakológiai kezelések tartománya. A friss metaanalízisek is 500 mg/nap quercetin dózist tartanak vízváltónak a hatás létrejöttéhez (53, 70).

A passzív tulajdonságokkal ellentétben az aktív állapot biomechanikai tulajdonságai megváltoztak a quercetin kezelés hatására. A tapasztalt különbségek nagy része a miogén tónus növekedésével magyarázható. Ennek háttérében többirányú hatásmechanizmust feltételezünk. A protein-kináz C szerepet játszik a spontán értónus beállításában (183), a quercetin pedig a protein-kináz C aktiválásával a kalciumcsatornák nyújtásra adott válaszát fokozza (113). Emellett a quercetin fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornáinak kalciumáramát (115), és

dóztól függően bifázisos hatása van a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázra is (118). Alacsonyabb, fiziológiás koncentráció tartományban a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz gátlás alá kerül, így a két hatás eredményeként megemelkedik a simaizom sejtek intracelluláris kalcium koncentrációja, ami fokozott tónust eredményez. A fokozott spontán tónus egy jelentős regulatorikus előnnyel jár: a quercetinnel kezelt arterioláknak a jelentősebb spontán tónus miatt nagyobb dilációs rezervük van. Számszerűsítve ezt a dilációs tartalékot, ha minden más befolyásoló körülményt állandónak tekintünk, Hagen-Poiseuille törvénye szerint a kontroll csoport nagyjából 75%, míg a quercetinnel kezelt csoport kb. 100%-os véráramlás fokozódásra képes. Hasonló eredményt publikáltak egy humán beavatkozási vizsgálat során: két hetes, magas flavonoid tartalmú csokoládé napi fogyasztása után a koronária áramlási rezerv fokozódott (138). Ugyanez az adaptív bazális tónusfokozódás figyelhető meg például patkányokban, fizikai terhelés hatására kialakuló edzett szívben is (184).

Ez a fokozott spontán tónus áll több megfigyelésünk hátterében. Az első és legnyilvánvalóbb következmény, hogy bár a passzív átmérő tekintetében a csoportok közt nincs különbség, a quercetinnel kezelt csoport fiziológiás belső átmérője jelentősen kisebb. A preparálás során, amikor a megfelelő érszakaszt kiválasztottuk, a hipoxiás miokardium metabolikus hatása miatt az intramurális koronária arteriolák teljesen relaxáltak voltak. Ezen átmérő alapján végeztük az érszakasz kiválasztását. A meleg, oxigenizált szervfürdőben azonban helyreállt az eredeti simaizom tónus és megmutatkozott a hozzá tartozó fiziológiás érátmérő. A különböző érátmérők felvetik annak lehetőségét, hogy ezek a szakaszok eltérő funkciót tölthetnek be a koronária artéria hálózatban. Későbbi vizsgálatainkban a hosszú távú quercetin szupplementáció hatásait tervezzük feltárni az intramurális koronária arteriolák hálózati tulajdonságaira.

A második következmény a fiziológiás, aktív állapotban megfigyelhető érfal vastagodás. Mivel zéró simaizom tónus mellett (passzív állapotban) nem volt különbség a két csoport falvastagságában vagy rugalmassági tulajdonságában, ez az érfal vastagodás pusztán a simaizom tónus következménye. Ez a falvastagodás Laplace törvénye szerint az átlagos tangenciális falfeszülés csökkenését jelenti. A quercetinnel kezelt arteriolák tehát alacsonyabb falfeszültség mellett funkcionálnak *in vivo*, mint a kontroll arteriolák. Ez érintheti a későbbi érfal átépülési folyamatokat a simaizomsejtek

proliferációjától kezdve a nem kontraktilis elemek átépüléséig (185), így eredményeink további, hosszabb távú vizsgálatok lehetőségét vetik fel.

A koronária rezisztencia ereken kifejeződő adrenerg receptorok  $\beta_2$  típusúak, így ezen érszakaszok noradrenalinra adott válasza a vazodilatáció (169). Tapasztalataink szerint a quercetinrel kezelt csoport arteriolái kisebb mértékű vazodilatációt mutatnak azonos noradrenalin dózissal, mint a kontroll csoportéi. Ez a megfigyelés összhangban van a szakirodalomban leírt jelenséggel, miszerint a quercetin, glikozidjai és glukuronid metabolitja gátolni képes az adenilát ciklázot (186, 187). A szimpatikus idegrendszer aktiválódása során a metabolikus, indirekt hatások koronária áramlást fokozó hatása sokkal jelentősebb, mint a direkt receptorális hatás (188). Valószínűtlen, hogy a limitált  $\beta_2$  mediált dilatáció hátrányosan befolyásolná a véráramlás fokozódást. Ezt a feltételezést azonban a későbbiekben még Langendorff-féle preparátumban igazolni kell.

Jelentős megfigyelést tettünk a quercetin NO mediált dilatációjára vonatkozóan hosszú távú kezelés kapcsán. Az akut hatásban a felszabaduló NO dilátor hatása a koronária arteriolákban szignifikáns, de nem akkora jelentőségű, mint ahogy az a korábbi tanulmányok alapján várható lett volna. A hosszú távú quercetin kezelés ellenben jelentősen befolyásolja a NO biológiai elérhetőségét. Tapasztalataink szerint a kezelt csoport L-NAME hatására jelentősebb vazokonstriktiót mutat, ami jelentősebb bazális NO termelést jelent. Ennek hátterében több potenciális mechanizmus állhat:

- A quercetin kezelés fokozza az eNOS expresszióját, ami nagyobb mennyiségű NO termelést tenné lehetővé. Ezt a teóriát több szerző is cáfolta már munkájában (189, 190), az általunk alkalmazott dózis esetében patkány aorta vizsgálatával is (140). Így kijelenthetjük, hogy a quercetin szupplementáció nem befolyásolja az eNOS expressziót egészséges rágcsálókban. Saját adataink sem támasztják alá a fokozott eNOS enzim expressziót, ugyanis a maximális NO mediált dilatációs tartomány nem különbözött a kezelt és a kontroll csoport között (24. ábra).
- A quercetin kezelés növeli az eNOS enzim aktivitását. Ez a lehetőség valószínű, hiszen a quercetin akut hatásában is az eNOS foszforilálásának útján fokozza a NO termelést (107).

- A quercetin hatására könnyebben alakul ki az eNOS aktiválásához szükséges intracelluláris kalcium koncentráció. Ismert, hogy a quercetin képes aktiválni a  $Ca^{2+}$  aktiválta  $K^+$  csatornát (KCa 1.1 csatorna) (106), ami az endotélsejt hiperpolarizációjához és a hiperpolarizáció indukálta  $Ca^{2+}$  áramhoz vezet (191).

Eredményeinknek külön jelentőséget ad, hogy a fokozott bazális NO termelést magasabb intraluminális nyomás mellett is fenntartotta a kezelt arteriola. Az emelkedő transzmurális nyomás mellett a kontroll arteriolákban mérséklődik a NO termelés (192), és ezzel párhuzamosan kialakul a fokozott miogén válasz. Ezek eredménye a Bayliss effektus, ami létrehozza a koronária keringés áramlási autoregulációját. (Ennek a mechanizmusnak a szerepe *in vivo* alárendelt, hiszen a folyamatosan működő szív metabolikus igényei felülírják a miogén autoregulációs folyamatokat.) A csökkenő NO termelés viszont egyéb funkciók kiesésével jár, mint például sejtes és kötőszövetes elemeket érintő átépülési folyamatok, gyulladásos és helyreállító mechanizmusok (193). A quercetin kezelés hatására magasabb nyomástartományban is fokozott NO szintézis segít fenntartani a vérlemezék (194) és vaszkuláris sejtek (195) nyugalmi állapotát.

A nyugalmi állapotban és serkentés hatására létrejövő NO válaszok összegéből megismerhetjük azt a tartományt, amely lefedi a NO mediálta válaszlehetőségeket. Ennek a tartománynak a szélessége nem változott kísérleteinkben. Ez az összefüggés a szakirodalomban leírtakkal is egybevág. Logikus, hogy adott eNOS mennyiség magasabb bazális aktivitása mellett kevesebb lehetőség marad a NO szintézis fokozódásának.

Az endotél mediált dilatációs válaszokat két tipikus agonistával vizsgálhatjuk. Az acetilkolin alkalmazása az endotél funkció vizsgálatára a vaszkuláris kutatásokban leggyakrabban használt technika (193). A koronária rezisztencia ereken azonban mérettől függően ellentétes hatása van ép endotél mellett is: az általunk is alkalmazott dózis a nagyobb méretű artériákat (kb. 280  $\mu$ m) dilatálja, a kisebb arteriolákat (kb. 80  $\mu$ m) pedig kontrahálja (196). Ezt a méretfüggő hatást nem tapasztaltuk saját vizsgálatainkban, így a tapasztalt méretbeli különbségek nem érték el a méret-függő farmakológiai átépülés szintjét. A koronária erek endotél funkciójának vizsgálatához alkalmasabb módszer a bradikinin alkalmazása, ami egyértelműen NO mediált

dilatációval jár ép endotél mellett ( $B_2$  receptor), és vazokonstriktívval sérült endotél esetén ( $B_1$  receptor) (197). Mind acetilkolin, mind bradikinin esetén limitált endotél eredetű dilatációt tapasztaltunk a quercetinrel kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest. A fent ismertetett fokozott bazális NO produkció fényében ez az eredmény nem meglepő.

Eredményeinket összegezve tehát megállapíthatjuk, hogy a hosszú távú quercetin szupplementáció egészséges patkányokban a NO mediált endotél függő vazodilatáció fokozódásához vezet. Emellett adaptív mechanizmusokat indít be, melyek a spontán értónus fokozódását hozzák létre. A kialakuló érválaszok hatására új nyugalmi érátmérő alakul ki a koronária arteriolákban, ami szélesebb regulációs lehetőségekkel párosul.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutatható-e, és ha igen, milyen mértékű a vazorelaxáció patkány intramurális koronária arteriolákban különböző fiziológiás quercetin dózisok akut alkalmazása esetén?

Az intramurális koronária arteriolák már 1 nmol/liter quercetin hatására szignifikánsan relaxálnak. A relaxáció dózis függően fokozódik 10 µmol/liter koncentrációig, ahol a hatás eléri a maximumát, és az arteriolák tónusa gyakorlatilag nullára csökken. Az átlagos quercetin koncentráció 100 nmol/liter tartományban várható (167). Ebben a dózisban a quercetin kiváltotta vazorelaxáció nem csak szignifikáns, de élettanilag is jelentős: a teljesen relaxált, passzív átmérőnek átlagosan 10%-a. Az arteriolák a meglévő, átlagosan 20%-os tónusuk 49%-át relaxálják 100 nmol/liter quercetin hatására. A nagyobb spontán tónusú, kisebb átmérőjű arteriolák esetében a fokozott spontán tónus miatt, a kialakuló vazorelaxáció élettanilag jelentősebb.

2. Mennyiben NO felszabadulás, és mennyiben prosztanoid felszabadulás által mediált az intramurális koronária arteriolákban quercetin hatására kialakuló vazodilatáció?

Eredményeink szerint az akut quercetin kiváltotta vazodilatáció részben NO mediált, azonban mérettől függően (150-180 µm alatt) a prosztanoid mediált endoteliális relaxáció dominálhat. Az arteriolák kaliberének csökkenésével a prosztanoid mediált dilatáció egyre jelentősebb, míg NO mediált relaxáció esetén nem találtunk ilyen összefüggést. Így tehát az általunk legtöbbször vizsgált, kis méretű arteriolákban a prosztanoid mediált relaxáció jelentősebb volt, mint a NO mediált válasz.

3. Hogyan befolyásolja az intramurális koronária arteriolák korosodással együtt járó strukturális és funkcionális átépülését a tartós, hosszú távú quercetin szupplementáció?

A két hónapos 30 mg/ttkg/nap dózisú quercetin szupplementáció hatására az intramurális koronária arteriolák spontán tónusa és bazális NO termelése fokozódott. Ezek következményeként a kezelt állatok arterioláiban a magasabb simaizom aktivitás

megnövelte az érfal vastagságát, és lecsökkentette az izobár tangenciális falfeszülést. Mindezen változások nagyobb dilatációs rezervet biztosítanak a koronária keringésnek.



## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A quercetin a polifenolok, azon belül a flavonoidok közé tartozó növényi anyagcsere termék, melynek sokoldalú kardioprotektív hatása van. Ezen hatások mind rövid, mind hosszú távon közvetlenül is érintik az endotél és a vaszkuláris simaizom funkcióját. A quercetin rövid távú hatásai közt endotél függő és endotél független vazodilatációs mechanizmusok egyaránt kimutathatók. Koronária arteriolákon a létrejövő vazodilatáció dózis függően fokozódik, 1 nmol/liter koncentráció már szignifikáns dilatációt okoz, míg 10  $\mu$ mol/liter az arteriolák tónusát nullára csökkenti. Mivel a quercetin fiziológiás koncentrációja (100 nmol/liter) a simaizom tónust kiindulási értéktől függetlenül nagyjából a felére csökkenti, a kialakuló relaxáció mértéke az arteriolák spontán tónusának növekedésével egyre jelentősebbé válik. A quercetin koronária arteriolákra gyakorolt endotél függő dilatátor hatása részben NO mediált, részben prosztanoid mediált mechanizmusok révén valósul meg. A prosztanoid mediált relaxáció az arteriolák méretének csökkenésével egyre jelentősebbnek bizonyult. A hosszú távú quercetin kezelés hatására az intramurális koronária arteriolákban funkcionális és biomechanikai átépülés következik be, ami a spontán értónus növekedésével jár. Ennek eredményeképp a quercetinnel kezelt patkányok koronária arterioláit a tangenciális falfeszülés csökkenése és a koronária dilatációs rezerv növekedése jellemzi. Emellett a hosszú távú quercetin kezelés hatására fokozódott a bazális NO mediálta vazodilatáció. Ezek a változások az intramurális koronária arteriolákban új egyensúlyi állapotot hoznak létre a vazodilatátor és vazokonstriktor mechanizmusok között. Eredményeink arra utalnak, hogy a quercetin az akut és hosszú távú hatásai révén előnyösen befolyásolja a koronária arteriolák működését, és alkalmazása hozzájárulhat kardioprotektív hatásokhoz.

## 9. SUMMARY

Quercetin, a plant flavonoid in the polyphenol kingdom has diverse cardioprotective effects. This molecule has acute and long-term direct effect on the endothelium and vascular smooth muscle. In a short-term action, quercetin initiates endothelium dependent and endothelium independent vasodilation. This dilation is dose dependent on coronary arterioles from the significant vasodilator 1 nmol/lit concentration to 10  $\mu$ mol/lit concentration, when smooth muscle tone diminishes. Physiological concentration of quercetin (100 nmol/lit) reduces the smooth muscle tone of coronary arterioles to the half. Because smaller arterioles have higher spontaneous smooth muscle tone, vasodilation is intensified as arteriole lumen size decreases. Endothelium dependent vasodilation in coronary arterioles is mediated by the release of NO and vasodilator prostanoids, but the ratio of actions of these mediators depends on the vessel size. While NO mediated dilation has no correlation with lumen size, prostanoid dependent dilation is inversely correlated with lumen size. Long-term supplementation induces functional and biomechanical remodeling of coronary arterioles, and leads to higher spontaneous tone of coronary arterioles. This results in decreased wall stress and increased coronary flow reserve. Long-term quercetin intake increases basal NO mediated dilatation. Remodeling processes influenced by quercetin supplementation may provide a new balance state between vasodilator and vasoconstrictor forces in coronary arterioles. Quercetin intake has beneficial acute and long-term effects on intramural coronary arterioles, which contributes to cardioprotective effects of flavonoids.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bentsáth, A., Rusznyák, S. T., Szent-Györgyi, A. (1936) Vitamin Nature of Flavones. *Nature*, 138: 798
2. Database;, N. C. f. B. I. P. C. (2018) Quercetin, CID=5280343. Vol. 2018
3. Braga, L. R., Rosa, A. A., Dias, A. C. B. (2014) Synthesis and characterization of molecularly imprinted silica mediated by Al for solid phase extraction of quercetin in *Ginkgo biloba* L. *Analytical Methods*, 6: 4029-4037
4. Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. K., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., Man, R. Y. (2007) Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, 68: 1179-1188
5. Terao, J., Murota, K., Kawai, Y. (2011) Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.*, 2: 11-17
6. Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y. (2016) Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8: 167
7. Marques, B., Trindade, M., Aquino, J. C. F., Cunha, A. R., Gismondi, R. O., Neves, M. F., Oigman, W. (2018) Beneficial effects of acute trans-resveratrol supplementation in treated hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Clin. Exp. Hypertens.*, 40: 218-223
8. Salden, B. N., Troost, F. J., de Groot, E., Stevens, Y. R., Garces-Rimon, M., Possemiers, S., Winkens, B., Masclee, A. A. (2016) Randomized clinical trial on the efficacy of hesperidin 2S on validated cardiovascular biomarkers in healthy overweight individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104: 1523-1533
9. Samavat, H., Newman, A. R., Wang, R., Yuan, J. M., Wu, A. H., Kurzer, M. S. (2016) Effects of green tea catechin extract on serum lipids in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104: 1671-1682
10. Kúsz, N. (2016) Növényi szerek helye a mai gyógyszerkincsben: podophyllum peltatum - podofillotoxin. *Gyógyszerészet*, 60: 661-663
11. Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.*, 5: e47

12. Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130: 2073s-2085s
13. Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A., Symons, J. D., Jalili, T. (2007) Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr.*, 137: 2405-2411
14. Zhang, Y., Li, Y., Cao, C., Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Zhao, X. (2010) Dietary flavonol and flavone intakes and their major food sources in Chinese adults. *Nutr. Cancer*, 62: 1120-1127
15. Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., Ippoushi, K., Oike, H., Nagata, T., Akasaka, H., Saitoh, S., Shimamoto, K., Kobori, M. (2015) Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7: 2345-2358
16. Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Barricarte, A., Ardanaz, E., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larranaga, N., Martinez, C., Sanchez, M. J., Navarro, C., Chirlaque, M. D., Tormo, M. J., Quiros, J. R., Gonzalez, C. A. (2010) Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain). *J. Am. Diet. Assoc.*, 110: 390-398
17. Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C. H., de Vries, J. H. M., Katan, M. B. (2002) Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals. *J. Am. Diet. Assoc.*, 102: 1414-1420
18. Guo, Y., Mah, E., Davis, C. G., Jalili, T., Ferruzzi, M. G., Chun, O. K., Bruno, R. S. (2013) Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57: 896-905
19. Weiz, G., Breccia, J. D., Mazzaferro, L. S. (2017) Screening and quantification of the enzymatic deglycosylation of the plant flavonoid rutin by UV-visible spectrometry. *Food Chem.*, 229: 44-49
20. Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., Tamaki, T. (2011) Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J. Pharmacol. Sci.*, 115: 466-470

21. Omar, K., Grant, M. H., Henderson, C., Watson, D. G. (2014) The complex degradation and metabolism of quercetin in rat hepatocyte incubations. *Xenobiotica*, 44: 1074-1082
22. Traka, M. H., Mithen, R. F. (2011) Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. *Plant Cell*, 23: 2483-2497
23. Williamson, G. (2017) The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull.*, 42: 226-235
24. Tribolo, S., Lodi, F., Connor, C., Suri, S., Wilson, V. G., Taylor, M. A., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hughes, D. A. (2008) Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 197: 50-56
25. Donnini, S., Finetti, F., Lusini, L., Morbidelli, L., Cheynier, V., Barron, D., Williamson, G., Waltenberger, J., Ziche, M. (2006) Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *Br. J. Nutr.*, 95: 1016-1023
26. Perez, A., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Perez-Abud, R., Haro, J. M., Osuna, A., Santos-Buelga, C., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F. (2014) The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol. Res.*, 89: 11-18
27. Kawabata, K., Mukai, R., Ishisaka, A. (2015) Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct.*, 6: 1399-1417
28. Galindo, P., Rodriguez-Gomez, I., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Jimenez, R., Menendez, C., Vargas, F., Tamargo, J., Santos-Buelga, C., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2012) Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS One*, 7: e32673
29. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C. (2012) The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 1822-1825
30. Mochizuki, M., Kajiya, K., Terao, J., Kaji, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Shimoi, K. (2004) Effect of quercetin conjugates on vascular permeability and expression of adhesion molecules. *Biofactors*, 22: 201-204

31. Maestro, A., Terdoslavich, M., Vanzo, A., Kuku, A., Tramer, F., Nicolin, V., Micali, F., Decorti, G., Passamonti, S. (2010) Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovasc. Res.*, 85: 175-183
32. Najmanová, I., Pourová, J., Vopršalová, M., Pilařová, V., Semecký, V., Nováková, L., Mladěnka, P. (2016) Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 60: 981-991
33. Ivey, K. L., Rimm, E. B., Kraft, P., Clish, C. B., Cassidy, A., Hodgson, J., Croft, K., Wolpin, B., Liang, L. (2017) Identifying the metabolomic fingerprint of high and low flavonoid consumers. *J Nutr Sci*, 6: e34
34. Larson, A. J., Symons, J. D., Jalili, T. (2010) Quercetin: A Treatment for Hypertension?-A Review of Efficacy and Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3: 237-250
35. Sevrioukova, I. F., Poulos, T. L. (2013) Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans*, 42: 3116-3126
36. Richard, J. L. (1987) Coronary risk factors. The French paradox. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 80 Spec No: 17-21
37. Haseeb, S., Alexander, B., Baranchuk, A. (2017) Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Circulation*, 136: 1434-1448
38. Ivey, K. L., Jensen, M. K., Hodgson, J. M., Eliassen, A. H., Cassidy, A., Rimm, E. B. (2017) Association of flavonoid-rich foods and flavonoids with risk of all-cause mortality. *Br. J. Nutr.*, 117: 1470-1477
39. Pounis, G., Costanzo, S., Bonaccio, M., Di Castelnuovo, A., de Curtis, A., Ruggiero, E., Persichillo, M., Cerletti, C., Donati, M. B., de Gaetano, G., Iacoviello, L. (2017) Reduced mortality risk by a polyphenol-rich diet: An analysis from the Moli-sani study. *Nutrition*, 48: 87-95
40. Grosso, G., Micek, A., Godos, J., Pajak, A., Sciacca, S., Galvano, F., Giovannucci, E. L. (2017) Dietary Flavonoid and Lignan Intake and Mortality in Prospective Cohort Studies: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Am. J. Epidemiol.*, 185: 1304-1316

41. Liu, X. M., Liu, Y. J., Huang, Y., Yu, H. J., Yuan, S., Tang, B. W., Wang, P. G., He, Q. Q. (2017) Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61: 1601003
42. Mink, P. J., Scrafford, C. G., Barraj, L. M., Harnack, L., Hong, C. P., Nettleton, J. A., Jacobs, D. R., Jr. (2007) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 85: 895-909
43. Dower, J. I., Geleijnse, J. M., Hollman, P., Soedamah-Muthu, S. S., Kromhout, D. (2016) Dietary epicatechin intake and 25-y risk of cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104: 58-64
44. Goetz, M. E., Judd, S. E., Safford, M. M., Hartman, T. J., McClellan, W. M., Vaccarino, V. (2016) Dietary flavonoid intake and incident coronary heart disease: the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104: 1236-1244
45. Levantesi, G., Marfisi, R., Mozaffarian, D., Franzosi, M. G., Maggioni, A., Nicolosi, G. L., Schweiger, C., Silletta, M., Tavazzi, L., Tognoni, G., Marchioli, R. (2013) Wine consumption and risk of cardiovascular events after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *Int. J. Cardiol.*, 163: 282-287
46. Loftfield, E., Freedman, N. D., Graubard, B. I., Guertin, K. A., Black, A., Huang, W. Y., Shebl, F. M., Mayne, S. T., Sinha, R. (2015) Association of Coffee Consumption With Overall and Cause-Specific Mortality in a Large US Prospective Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.*, 182: 1010-1022
47. Lin, X., Zhang, I., Li, A., Manson, J. E., Sesso, H. D., Wang, L., Liu, S. (2016) Cocoa Flavanol Intake and Biomarkers for Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Nutr.*, 146: 2325-2333
48. Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., Lyons, T. J. (2014) Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54: 790-806

49. Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Blekkenhorst, L. C., Considine, M. J., Maghzal, G., Stocker, R., Woodman, R. J., Ward, N. C., Hodgson, J. M., Croft, K. D. (2018) Flavonoid-Rich Apple Improves Endothelial Function in Individuals at Risk for Cardiovascular Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Mol. Nutr. Food Res.*, 62: 1700674
50. Habauzit, V., Verny, M. A., Milenkovic, D., Barber-Chamoux, N., Mazur, A., Dubray, C., Morand, C. (2015) Flavanones protect from arterial stiffness in postmenopausal women consuming grapefruit juice for 6 mo: a randomized, controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 102: 66-74
51. Nagata, C., Wada, K., Tamura, T., Konishi, K., Goto, Y., Koda, S., Kawachi, T., Tsuji, M., Nakamura, K. (2017) Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: the Takayama study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 105: 426-431
52. Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Martínez-González, M. A. (2013) Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N. Engl. J. Med.*, 368: 1279-1290
53. Serban, M. C., Sahebkar, A., Zanchetti, A., Mikhailidis, D. P., Howard, G., Antal, D., Andrica, F., Ahmed, A., Aronow, W. S., Muntner, P., Lip, G. Y., Graham, I., Wong, N., Rysz, J., Banach, M. (2016) Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*, 5: e002713
54. Dower, J. I., Geleijnse, J. M., Gijssbers, L., Schalkwijk, C., Kromhout, D., Hollman, P. C. (2015) Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J. Nutr.*, 145: 1459-1463
55. Perez-Vizcaino, F., Ibarra, M., Cogolludo, A. L., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Moreno, L., Lopez-Lopez, G., Tamargo, J. (2002) Endothelium-independent



- vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302: 66-72
56. Marunaka, Y., Marunaka, R., Sun, H., Yamamoto, T., Kanamura, N., Inui, T., Taruno, A. (2017) Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules*, 22: 209
  57. Parichatikanond, W., Pinthong, D., Mangmool, S. (2012) Blockade of the renin-angiotensin system with delphinidin, cyanin, and quercetin. *Planta Med.*, 78: 1626-1632
  58. Hackl, L. P., Cuttle, G., Dovichi, S. S., Lima-Landman, M. T., Nicolau, M. (2002) Inhibition of angiotensin-converting enzyme by quercetin alters the vascular response to bradykinin and angiotensin I. *Pharmacology*, 65: 182-186
  59. Larson, A., Witman, M. A., Guo, Y., Ives, S., Richardson, R. S., Bruno, R. S., Jalili, T., Symons, J. D. (2012) Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1: nitric oxide. *Nutr. Res.*, 32: 557-564
  60. Brull, V., Burak, C., Stoffel-Wagner, B., Wolfram, S., Nickenig, G., Muller, C., Langguth, P., Alteheld, B., Fimmers, R., Naaf, S., Zimmermann, B. F., Stehle, P., Egert, S. (2015) Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br. J. Nutr.*, 114: 1263-1277
  61. Muller-Delp, J. M. (2011) Age-induced endothelial dysfunction: is it time to redefine the "reactivity" of reactive oxygen species? *J Appl Physiol* (1985), 110: 1152-1153
  62. Boots, A. W., Haenen, G. R., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.*, 585: 325-337
  63. Shanely, R. A., Knab, A. M., Nieman, D. C., Jin, F., McAnulty, S. R., Landram, M. J. (2010) Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radic. Res.*, 44: 224-231

64. Boots, A. W., Drent, M., de Boer, V. C., Bast, A., Haenen, G. R. (2011) Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin. Nutr.*, 30: 506-512
65. Choi, E. J., Chee, K. M., Lee, B. H. (2003) Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 482: 281-285
66. Blazovics, A. (2009) [From free radicals to science of nutrition]. *Orv. Hetil.*, 150: 53-63
67. Hubbard, G. P., Wolffram, S., de Vos, R., Bovy, A., Gibbins, J. M., Lovegrove, J. A. (2006) Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br. J. Nutr.*, 96: 482-488
68. Mosawy, S., Jackson, D. E., Woodman, O. L., Linden, M. D. (2013) Treatment with quercetin and 3',4'-dihydroxyflavonol inhibits platelet function and reduces thrombus formation in vivo. *J. Thromb. Thrombolysis*, 36: 50-57
69. Janssen, K., Mensink, R. P., Cox, F. J., Harryvan, J. L., Hovenier, R., Hollman, P. C., Katan, M. B. (1998) Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 255-262
70. Sahebkar, A. (2017) Effects of quercetin supplementation on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57: 666-676
71. Liu, L., Gao, C., Yao, P., Gong, Z. (2015) Quercetin Alleviates High-Fat Diet-Induced Oxidized Low-Density Lipoprotein Accumulation in the Liver: Implication for Autophagy Regulation. *Biomed Res Int*, 2015: 607531
72. Bhaskar, S., Shalini, V., Helen, A. (2011) Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF-kappaB signaling pathway. *Immunobiology*, 216: 367-373
73. Hung, C. H., Chan, S. H., Chu, P. M., Tsai, K. L. (2015) Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59: 1905-1917

74. Basu, A., Das, A. S., Majumder, M., Mukhopadhyay, R. (2016) Antiatherogenic Roles of Dietary Flavonoids Chrysin, Quercetin, and Luteolin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 68: 89-96
75. Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S. A., Shukor, M. Y. (2014) Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Res Int*, 2014: 480258
76. Garelnabi, M., Mahini, H., Wilson, T. (2014) Quercetin intake with exercise modulates lipoprotein metabolism and reduces atherosclerosis plaque formation. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 11: 22-22
77. Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J. F., Ravier, M. A., Bertrand, G., Dalle, S., Cros, G., Magous, R., Richard, S., Oiry, C. (2013) Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *Br. J. Pharmacol.*, 169: 1102-1113
78. Eid, H. M., Haddad, P. S. (2017) The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Curr. Med. Chem.*, 24: 355-364
79. Neuhauser, M. L. (2004) Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr. Cancer*, 50: 1-7
80. Chen, C., Zhou, J., Ji, C. (2010) Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sci.*, 87: 333-338
81. Barreca, D., Bellocco, E., D'Onofrio, G., Nabavi, S. F., Daglia, M., Rastrelli, L., Nabavi, S. M. (2016) Neuroprotective Effects of Quercetin: From Chemistry to Medicine. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 15: 964-975
82. Costa, L. G., Garrick, J. M., Roque, P. J., Pellacani, C. (2016) Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016: 2986796
83. Lapi, D., Vagnani, S., Pignataro, G., Esposito, E., Paterni, M., Colantuoni, A. (2012) Protective Effects of Quercetin on Rat Pial Microvascular Changes during Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion and Reperfusion. *Front. Physiol.*, 3: 32
84. Choi, E. J., Kim, G. H. (2010) Quercetin accumulation by chronic administration causes the caspase-3 activation in liver and brain of mice. *Biofactors*, 36: 216-221

85. Lee, M., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2016) Quercetin, not caffeine, is a major neuroprotective component in coffee. *Neurobiol. Aging*, 46: 113-123
86. Pelletier, D. M., Lacerte, G., Goulet, E. D. (2013) Effects of quercetin supplementation on endurance performance and maximal oxygen consumption: a meta-analysis. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 23: 73-82
87. Sharp, M. A., Hendrickson, N. R., Staab, J. S., McClung, H. L., Nindl, B. C., Michniak-Kohn, B. B. (2012) Effects of short-term quercetin supplementation on soldier performance. *J. Strength Cond. Res.*, 26 Suppl 2: S53-60
88. Vickery, H. B., Nelson, E. M., Almquist, H. J., Elvehjem, C. A. (1950) Term "vitamin P" recommended to be discontinued. *Science*, 112: 628
89. Kunasegaran, T., Mustafa, M. R., Achike, F. I., Murugan, D. D. (2017) Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 799: 160-170
90. Khandelwal, A. R., Hebert, V. Y., Kleinedler, J. J., Rogers, L. K., Ullevig, S. L., Asmis, R., Shi, R., Dugas, T. R. (2012) Resveratrol and quercetin interact to inhibit neointimal hyperplasia in mice with a carotid injury. *J. Nutr.*, 142: 1487-1494
91. Redondo, A., Estrella, N., Lorenzo, A. G., Cruzado, M., Castro, C. (2012) Quercetin and catechin synergistically inhibit angiotensin II-induced redox-dependent signalling pathways in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats. *Free Radic. Res.*, 46: 619-627
92. Rendeiro, C., Dong, H., Saunders, C., Harkness, L., Blaze, M., Hou, Y., Belanger, R. L., Corona, G., Lovegrove, J. A., Spencer, J. P. (2016) Flavanone-rich citrus beverages counteract the transient decline in postprandial endothelial function in humans: a randomised, controlled, double-masked, cross-over intervention study. *Br. J. Nutr.*, 116: 1999-2010
93. Lekakis, J., Rallidis, L. S., Andreadou, I., Vamvakou, G., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Kremastinos, D. T. (2005) Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, 12: 596-600

94. Rodriguez-Mateos, A., Feliciano, R. P., Boeres, A., Weber, T., Dos Santos, C. N., Ventura, M. R., Heiss, C. (2016) Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Mol. Nutr. Food Res.*, 60: 2130-2140
95. Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., Croft, K. D. (2008) Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 88: 1018-1025
96. Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Rich, L., Mas, E., Shinde, S., Ward, N. C., Hodgson, J. M., Croft, K. D. (2016) Acute effects of quercetin-3-O-glucoside on endothelial function and blood pressure: a randomized dose-response study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 104: 97-103
97. Brull, V., Burak, C., Stoffel-Wagner, B., Wolfram, S., Nickenig, G., Muller, C., Langguth, P., Alteheld, B., Fimmers, R., Stehle, P., Egert, S. (2017) Acute intake of quercetin from onion skin extract does not influence postprandial blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese adults with hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Eur. J. Nutr.*, 56: 1347-1357
98. Kiviniemi, T. O., Saraste, A., Toikka, J. O., Saraste, M., Raitakari, O. T., Parkka, J. P., Lehtimaki, T., Hartiala, J. J., Viikari, J., Koskenvuo, J. W. (2007) A moderate dose of red wine, but not de-alcoholized red wine increases coronary flow reserve. *Atherosclerosis*, 195: e176-181
99. Flesch, M., Schwarz, A., Bohm, M. (1998) Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, 275: H1183-1190
100. Chiwororo, W. D., Ojewole, J. A. (2010) Dual effect of quercetin on rat isolated portal vein smooth muscle contractility. *Cardiovasc. J. Afr.*, 21: 132-136
101. Ibarra, M., Moreno, L., Vera, R., Cogolludo, A., Duarte, J., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F. (2003) Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.*, 69: 995-1000

102. Ajay, M., Achike, F. I., Mustafa, A. M., Mustafa, M. R. (2006) Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 33: 345-350
103. Gasparotto Junior, A., Dos Reis Piornedo, R., Assreuy, J., Da Silva-Santos, J. E. (2016) Nitric oxide and Kir6.1 potassium channel mediate isoquercitrin-induced endothelium-dependent and independent vasodilation in the mesenteric arterial bed of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 788: 328-334
104. Rendig, S. V., Symons, J. D., Longhurst, J. C., Amsterdam, E. A. (1998) Quercetin, a biologically active flavonoid, relaxes isolated rabbit coronary arteries. *FASEB J.*, 12: A405-A405
105. Khoo, N. K., White, C. R., Pozzo-Miller, L., Zhou, F., Constance, C., Inoue, T., Patel, R. P., Parks, D. A. (2010) Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic. Biol. Med.*, 49: 339-347
106. Kuhlmann, C. R., Schaefer, C. A., Kosok, C., Abdallah, Y., Walther, S., Ludders, D. W., Neumann, T., Tillmanns, H., Schafer, C., Piper, H. M., Erdogan, A. (2005) Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel-induced hyperpolarization-mediated  $Ca^{2+}$ -entry into cultured human endothelial cells. *Planta Med.*, 71: 520-524
107. Li, P. G., Sun, L., Han, X., Ling, S., Gan, W. T., Xu, J. W. (2012) Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism. *Pharmacology*, 89: 220-228
108. Suri, S., Liu, X. H., Rayment, S., Hughes, D. A., Kroon, P. A., Needs, P. W., Taylor, M. A., Tribolo, S., Wilson, V. G. (2010) Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, 159: 566-575
109. Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T., Vaez-Mahdavi, M. R., Roghani-Dehkordi, F. (2004) Mechanisms underlying quercetin-induced vasorelaxation in aorta of subchronic diabetic rats: an in vitro study. *Vascul. Pharmacol.*, 42: 31-35

110. Zhao, X., Gu, Z., Attele, A. S., Yuan, C. S. (1999) Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J. Ethnopharmacol.*, 67: 279-285
111. Ibarra, M., Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Lopez-Lopez, J. G., Tamargo, J. (2002) Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med.*, 68: 307-310
112. Chan, E. C., Pannangpetch, P., Woodman, O. L. (2000) Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 35: 326-333
113. Hou, X. M., Zhang, M. S., Qin, X. J. (2017) Vasodilation of quercetin on rat renal artery and the relationship with L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and protein kinase C. *Sheng Li Xue Bao*, 69: 775-780
114. Hou, X., Liu, Y., Niu, L., Cui, L., Zhang, M. (2014) Enhancement of voltage-gated  $K^+$  channels and depression of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels are involved in quercetin-induced vasorelaxation in rat coronary artery. *Planta Med.*, 80: 465-472
115. Saponara, S., Sgaragli, G., Fusi, F. (2002) Quercetin as a novel activator of L-type  $Ca^{2+}$  channels in rat tail artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 135: 1819-1827
116. Fusi, F., Saponara, S., Pessina, F., Gorelli, B., Sgaragli, G. (2003) Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur. J. Nutr.*, 42: 10-17
117. Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Jimenez, J., Tamargo, J. (1994) Inhibitory effects of quercetin and staurosporine on phasic contractions in rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 262: 149-156
118. McKenna, E., Smith, J. S., Coll, K. E., Mazack, E. K., Mayer, E. J., Antanavage, J., Wiedmann, R. T., Johnson, R. G., Jr. (1996) Dissociation of phospholamban regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ ATPase by quercetin. *J. Biol. Chem.*, 271: 24517-24525
119. Picq, M., Dubois, M., Munari-Silem, Y., Prigent, A. F., Pacheco, H. (1989) Flavonoid modulation of protein kinase C activation. *Life Sci.*, 44: 1563-1571

120. Cogolludo, A., Frazziano, G., Briones, A. M., Cobeno, L., Moreno, L., Lodi, F., Salaices, M., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F. (2007) The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation. *Cardiovasc. Res.*, 73: 424-431
121. Iozzi, D., Schubert, R., Kalenchuk, V. U., Neri, A., Sgaragli, G., Fusi, F., Saponara, S. (2013) Quercetin relaxes rat tail main artery partly via a PKG-mediated stimulation of KCa 1.1 channels. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 208: 329-339
122. Nishida, S., Satoh, H. (2013) Role of gap junction involved with endothelium-derived hyperpolarizing factor for the quercetin-induced vasodilatation in rat mesenteric artery. *Life Sci.*, 92: 752-756
123. Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A., Needs, P. W., Hughes, D. A., Santos-Buelga, C., Gonzalez-Paramas, A., Cogolludo, A., Lopez-Sepulveda, R., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F. (2009) Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis*, 204: 34-39
124. Al-Shalmani, S., Suri, S., Hughes, D. A., Kroon, P. A., Needs, P. W., Taylor, M. A., Tribolo, S., Wilson, V. G. (2011) Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of the porcine isolated coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, 162: 1485-1497
125. Guo, X. D., Zhang, D. Y., Gao, X. J., Parry, J., Liu, K., Liu, B. L., Wang, M. (2013) Quercetin and quercetin-3-O-glucuronide are equally effective in ameliorating endothelial insulin resistance through inhibition of reactive oxygen species-associated inflammation. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57: 1037-1045
126. Sanchez, M., Lodi, F., Vera, R., Villar, I. C., Cogolludo, A., Jimenez, R., Moreno, L., Romero, M., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2007) Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J. Nutr.*, 137: 910-915
127. Ivanov, I. S., Sidekhnemova, A. V., Nosarev, A. V., Tyukavkina, N. A., Plotnikov, M. B. (2013) Effect of dihydroquercetin on the tone of isolated rat veins. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 155: 65-66



128. Choi, E. Y., Lee, H., Woo, J. S., Jang, H. H., Hwang, S. J., Kim, H. S., Kim, W. S., Kim, Y. S., Choue, R., Cha, Y. J., Yim, J. E., Kim, W. (2015) Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. *Nutrition*, 31: 1131-1135
129. Otto, C. M. (2016) Heartbeat: Dietary polyphenols and vascular function. *Heart*, 102: 1337-1338
130. Nakayama, H., Tsuge, N., Sawada, H., Higashi, Y. (2013) Chronic intake of onion extract containing quercetin improved postprandial endothelial dysfunction in healthy men. *J. Am. Coll. Nutr.*, 32: 160-164
131. Bryushkov, A. Y., Ershov, P. V., Sergeeva, N. A., Bogachev, V. Y. (2016) [Effect of angioprotective therapy with bioflavonoids on endothelial dysfunction in patients with acute venous thromboses]. *Angiol. Sosud. Khir.*, 22: 102-108
132. Biesinger, S., Michaels, H. A., Quadros, A. S., Qian, Y., Rabovsky, A. B., Badger, R. S., Jalili, T. (2016) A combination of isolated phytochemicals and botanical extracts lowers diastolic blood pressure in a randomized controlled trial of hypertensive subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 70: 10-16
133. Dower, J. I., Geleijnse, J. M., Gijbbers, L., Zock, P. L., Kromhout, D., Hollman, P. C. (2015) Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 101: 914-921
134. Burak, C., Wolfram, S., Zur, B., Langguth, P., Fimmers, R., Alteheld, B., Stehle, P., Egert, S. (2017) Effects of the flavonol quercetin and alpha-linolenic acid on n-3 PUFA status in metabolically healthy men and women: a randomised, double-blinded, placebo-controlled, crossover trial. *Br. J. Nutr.*, 117: 698-711
135. Castilla, P., Echarri, R., Davalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., Lucas, M. F., Gomez-Coronado, D., Ortuno, J., Lasuncion, M. A. (2006) Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84: 252-262
136. Chekalina, N. I., Shut, S. V., Trybrat, T. A., Burmak, Y. H., Petrov, Y. Y., Manusha, Y. I., Kazakov, Y. M. (2017) Effect of quercetin on parameters of

- central hemodynamics and myocardial ischemia in patients with stable coronary heart disease. *Wiad. Lek.*, 70: 707-711
137. Sonography. (2018) How to assess diastolic function? Vol. 2018
  138. Shiina, Y., Funabashi, N., Lee, K., Murayama, T., Nakamura, K., Wakatsuki, Y., Daimon, M., Komuro, I. (2009) Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults. *Int. J. Cardiol.*, 131: 424-429
  139. Jalili, T., Carlstrom, J., Kim, S., Freeman, D., Jin, H., Wu, T. C., Litwin, S. E., David Symons, J. (2006) Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction.[Erratum appears in *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Jul;48(1):following table of contents]. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 47: 531-541
  140. Benito, S., Lopez, D., Saiz, M. P., Buxaderas, S., Sanchez, J., Puig-Parellada, P., Mitjavila, M. T. (2002) A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 135: 910-916
  141. Montenegro, M. F., Neto-Neves, E. M., Dias-Junior, C. A., Ceron, C. S., Castro, M. M., Gomes, V. A., Kanashiro, A., Tanus-Santos, J. E. (2010) Quercetin restores plasma nitrite and nitroso species levels in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 382: 293-301
  142. Machha, A., Mustafa, M. R. (2005) Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 46: 36-40
  143. Garcia-Saura, M. F., Galisteo, M., Villar, I. C., Bermejo, A., Zarzuelo, A., Vargas, F., Duarte, J. (2005) Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol. Cell. Biochem.*, 270: 147-155
  144. Sanchez, M., Galisteo, M., Vera, R., Villar, I. C., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2006) Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 24: 75-84
  145. Shen, Y., Ward, N. C., Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Wang, Y., Zhang, D., Maghzal, G. J., Stocker, R., Croft, K. D. (2013) Dietary quercetin attenuates

- oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: a critical role for heme oxygenase-1. *Free Radic. Biol. Med.*, 65: 908-915
146. Machha, A., Achike, F. I., Mustafa, A. M., Mustafa, M. R. (2007) Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*, 16: 442-447
  147. Yang, H. H., Hwangbo, K., Zheng, M. S., Cho, J. H., Son, J. K., Kim, H. Y., Baek, S. H., Choi, H. C., Park, S. Y., Kim, J. R. (2014) Quercetin-3-O-beta-D-glucuronide isolated from *Polygonum aviculare* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Arch. Pharm. Res.*, 37: 1219-1233
  148. Hwang, H. V., Tran, D. T., Rebuffatti, M. N., Li, C.-S., Knowlton, A. A. (2018) Investigation of quercetin and hyperoside as senolytics in adult human endothelial cells. *PLoS One*, 13: e0190374
  149. Monteiro, M., França-Silva, M., Alves, N., Porpino, S., Braga, V. (2012) Quercetin Improves Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 17: 12997
  150. Lin, Y., Liu, H. L., Fang, J., Yu, C. H., Xiong, Y. K., Yuan, K. (2014) Anti-fatigue and vasoprotective effects of quercetin-3-O-gentiobiose on oxidative stress and vascular endothelial dysfunction induced by endurance swimming in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 68: 290-296
  151. Terao, J., Kawai, Y., Murota, K. (2008) Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17 Suppl 1: 291-293
  152. Sahoo, S., Meijles, D. N., Pagano, P. J. (2016) NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? *Clin. Sci. (Lond.)*, 130: 317-335
  153. Jimenez, R., Lopez-Sepulveda, R., Romero, M., Toral, M., Cogolludo, A., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2015) Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.*, 6: 409-414
  154. Romero, M., Jimenez, R., Sanchez, M., Lopez-Sepulveda, R., Zarzuelo, M. J., O'Valle, F., Zarzuelo, A., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2009) Quercetin

- inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*, 202: 58-67
155. Huang, B. F., Wang, W., Fu, Y. C., Zhou, X. H., Wang, X. (2009) The effect of quercetin on neointima formation in a rat artery balloon injury model. *Pathol. Res. Pract.*, 205: 515-523
  156. Chang, X.-y., Cui, L., Wang, X.-z., Zhang, L., Zhu, D., Zhou, X.-r., Hao, L.-r. (2017) Quercetin Attenuates Vascular Calcification through Suppressed Oxidative Stress in Adenine-Induced Chronic Renal Failure Rats. *Biomed Res Int*, 2017: 7
  157. Xu, X., Wang, B., Ren, C., Hu, J., Greenberg, D. A., Chen, T., Xie, L., Jin, K. (2017) Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. *Aging Dis.*, 8: 590-610
  158. Surapaneni, K. M., Vishnu Priya, V., Mallika, J. (2015) Effect of pioglitazone, quercetin, and hydroxy citric acid on vascular endothelial growth factor messenger RNA (VEGF mRNA) expression in experimentally induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Turk J Med Sci*, 45: 542-546
  159. Li, F., Bai, Y., Zhao, M., Huang, L., Li, S., Li, X., Chen, Y. (2015) Quercetin Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Choroidal and Retinal Angiogenesis in vitro. *Ophthalmic Res.*, 53: 109-116
  160. Pereira, S. C., Parente, J. M., Belo, V. A., Mendes, A. S., Gonzaga, N. A., do Vale, G. T., Ceron, C. S., Tanus-Santos, J. E., Tirapelli, C. R., Castro, M. M. (2018) Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. *Atherosclerosis*, 270: 146-153
  161. Fisslthaler, B., Fleming, I., Busse, R. (2000) EDHF: a cytochrome P450 metabolite in coronary arteries. *Semin. Perinatol.*, 24: 15-19
  162. Yoo, J., Kim, Y., Yoo, S.-H., Inglett, G. E., Lee, S. (2012) Reduction of rutin loss in buckwheat noodles and their physicochemical characterisation. *Food Chem.*, 132: 2107-2111
  163. Wade, C. E., Miller, M. M., Baer, L. A., Moran, M. M., Steele, M. K., Stein, T. P. (2002) Body mass, energy intake, and water consumption of rats and humans during space flight. *Nutrition*, 18: 829-836

164. Nadasy, G. L., Szekeres, M., Dezsi, L., Varbiro, S., Szekacs, B., Monos, E. (2001) Preparation of intramural small coronary artery and arteriole segments and resistance artery networks from the rat heart for microarteriography and for in situ perfusion video mapping. *Microvasc. Res.*, 61: 282-286
165. Flesch, M., Schwarz, A., Bohm, M. (1998) Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, 275: H1183-1190
166. Rendig, S. V., Symons, J. D., Longhurst, J. C., Amsterdam, E. A. (2001) Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 38: 219-227
167. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 230s-242s
168. Cox, R. H. (1979) Comparison of arterial wall mechanics in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 237: H159-167
169. Ming, Z., Parent, R., Lavallee, M. (1997) Beta 2-adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves  $K_{ATP}$  channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation*, 95: 1568-1576
170. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342: 1007-1011
171. Taubert, D., Berkels, R., Klaus, W., Roesen, R. (2002) Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 40: 701-713
172. Si, H., Wyeth, R., Liu, D. (2014) The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *Eur. J. Nutr.*, 53: 269-275
173. Szekeres, M., Nadasy, G. L., Kaley, G., Koller, A. (2004) Nitric oxide and prostaglandins modulate pressure-induced myogenic responses of intramural coronary arterioles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 43: 242-249
174. Ozen, G., Norel, X. (2017) Prostanoids in the pathophysiology of human coronary artery. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 133: 20-28

175. Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., De Caterina, R., Carluccio, M. A. (2012) Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch. Biochem. Biophys.*, 527: 81-89
176. Al-Fayez, M., Cai, H., Tunstall, R., Steward, W. P., Gescher, A. J. (2006) Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 58: 816-825
177. Bai, H. W., Zhu, B. T. (2010) Myricetin and quercetin are naturally occurring co-substrates of cyclooxygenases in vivo. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 82: 45-50
178. Jiang, J., Zheng, J. P., Li, Y., Gan, Z., Jiang, Y., Huang, D., Li, H., Liu, Z., Ke, Y. (2016) Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.*, 38: 393-398
179. Horvathova, K., Novotny, L., Tothova, D., Vachalkova, A. (2004) Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, 51: 395-399
180. Ballermann, B. J., Dardik, A., Eng, E., Liu, A. (1998) Shear stress and the endothelium. *Kidney Int.*, 54: S100-S108
181. Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, 22: 659-661
182. McAnulty, L. S., Miller, L. E., Hosick, P. A., Utter, A. C., Quindry, J. C., McAnulty, S. R. (2013) Effect of resveratrol and quercetin supplementation on redox status and inflammation after exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 38: 760-765
183. Osol, G., Laher, I., Cipolla, M. (1991) Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ. Res.*, 68: 359-367

184. Hanna, M. E., Taylor, C. R., Chen, B., La, H.-S., Maraj, J. J., Kilar, C. R., Behnke, B. J., Delp, M. D., Muller-Delp, J. M. (2014) Structural Remodeling of Coronary Resistance Arteries: Effects of Age and Exercise Training. *J. Appl. Physiol.*, 117: 616-623
185. Lu, D., Kassab, G. S. (2011) Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J. R. Soc. Interface*, 8: 1379-1385
186. Pavan, B., Capuzzo, A., Forlani, G. (2015) Quercetin and quercetin-3-O-glucoside interact with different components of the cAMP signaling cascade in human retinal pigment epithelial cells. *Life Sci.*, 121: 166-173
187. Yamazaki, S., Miyoshi, N., Kawabata, K., Yasuda, M., Shimoi, K. (2014) Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline-promoted invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells by blocking beta(2)-adrenergic signaling. *Arch. Biochem. Biophys.*, 557: 18-27
188. Johnathan, D. T., Keith Neu, R., Mark, W. G., Eric, O. F. (2002) Control of Coronary Blood Flow during Exercise. *Exp. Biol. Med.*, 227: 238-250
189. Takahashi, A., Inoue, H., Mishima, K., Ide, F., Nakayama, R., Hasaka, A., Ryo, K., Ito, Y., Sakurai, T., Hasegawa, Y., Saito, I. (2015) Evaluation of the Effects of Quercetin on Damaged Salivary Secretion. *PLoS One*, 10: e0116008
190. Wan, L. L., Xia, J., Ye, D., Liu, J., Chen, J., Wang, G. (2009) Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc. Ther.*, 27: 28-33
191. Dora, K. A., Garland, C. J. (2013) Linking Hyperpolarization to Endothelial Cell Calcium Events in Arterioles. *Microcirculation*, 20: 248-256
192. Beyer, A. M., Durand, M. J., Hockenberry, J., Gamblin, T. C., Phillips, S. A., Gutterman, D. D. (2014) An acute rise in intraluminal pressure shifts the mediator of flow-mediated dilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in human arterioles. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 307: H1587-H1593
193. Cannon, R. O. (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.*, 44: 1809
194. Du, X. (2007) A new mechanism for nitric oxide- and cGMP-mediated platelet inhibition. *Blood*, 109: 392-393

195. Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., Leung, S. W. S. (2015) Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.*, 129: 83-94
196. Szekeres, M., Dezsi, L., Nadasy, G. L., Kaley, G., Koller, A. (2001) Pharmacologic inhomogeneity between the reactivity of intramural coronary arteries and arterioles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 38: 584-592
197. Drummond, G. R., Cocks, T. M. (1995) Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B1 and constitutive B2 kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 2473-2481



## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Disszertáció alapját képező közlemények:

Monori-Kiss A, Kiss F, Restifo JM, Monos E, Nadasy GL. (2017) Chronic administration of quercetin induces biomechanical and pharmacological remodeling in the rat coronary arteries. *Physiol Res*, 66: (4) pp. 591-599. IF: 1,461

Monori-Kiss A, Monos E, Nadasy GL. (2014) Quantitative analysis of vasodilatory action of quercetin on intramural coronary arteries of the rat in vitro. *PLoS One*, 9 (8): Paper e105587. 6 IF: 3,234

### Disszertáció témájától független közlemények:

Pal E, Hadjadj L, Fontanyi Z, Monori-Kiss A, Mezei Z, Lippai N, Magyar A, Heinzlmann A, Karvaly G, Monos E, Nadasy G, Benyo Z, Varbiro S. (2018) Vitamin D deficiency causes inward hypertrophic remodeling and alters vascular reactivity of rat cerebral arterioles. *PLoS One*, 13(2):e0192480 IF: 2,806

Hadjadj L, Varbiro S, Horvath EM, Monori-Kiss A, Pal E, Karvaly GB, Heinzlmann A, Magyar A, Szabo I, Sziva RE, Benyo Z, Buday M, Nadasy GL. (2018) Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency: Vascular consequences. *Diab Vasc Res*, 2018:1479164118758580 IF: 3,417

Gósi G, Monori-Kiss A, Nádasy G, Durkó A, Tőkés A, Monos E, Acsády G. (2014) Comparison of passive and active biomechanical properties of human cervical and leg veins. *Int Angiol*, 33 (4): 348-356. IF: 0,833

Varbiro S, Sara L, Antal P, Monori-Kiss A, Tokes AM, Monos E, Benko R, Csibi N, Szekeres M, Tarszabo R, Novak A, Paragi P, Nadasy GL. (2014) Lower-limb veins are thicker and vascular reactivity is decreased in a rat PCOS model: concomitant vitamin D3 treatment partially prevents these changes. *Am J Physiol Circ Physiol*, 307 (6): H848-H857. IF: 3,838

Csibi N, Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Monori-Kiss A, Benkő R, Tőkés A-M, Monos E, Várbíró Sz. (2013) A vénás rendszer adaptációs mechanizmusai policisztás petefészek szindrómában. Magyar Nőorvosok Lapja, 76 (6): 11-20.

Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Monori-Kiss A, Szekeres M, Masszi G, Monos E, Várbíró Sz. (2012) Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model – vascular effects of parallel vitamin D3 treatment. Gynecol Endocrinol, 28 (12): 961-964. IF: 1,303

Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Szekeres M, Monori-Kiss A, Horváth EM, Tőkés AM, Masszi G, Monos E, Várbíró Sz. (2012) Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - Effects of parallel vitamin D3 treatment. Acta Physiol Hung, 99 (3): 279-288. Paper 0231-424x. IF: 0,882

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Nádasy György docens úrnak és Dr. Monos Emil professzor úrnak, amiért diákkörös korom óta megtiszteltek a figyelmükkel és útmutatásukkal. Köszönöm a bizalmat és a lehetőséget, hogy megvalósíthattam ezeket a kutatási témákat! Köszönöm az értékes szakmai és emberi tanácsokat és a sok türelmet!

Hálás vagyok Prof. Dr. Benyó Zoltán igazgató úrnak a támogatásért, és hogy része lehetek a Klinikai Kísérleti Kutató Intézet csapatának! Köszönöm, hogy Benyó professzor úrhoz is bármikor fordulhattam tanácsért!

Hálás vagyok minden társszerzőmnek az elmúlt évek sikeres és örömteli kísérleteiért, publikációiért!

Köszönöm PhD hallgató társaimnak a jó barátságot, hasznos szakmai fogásokat és a közös kísérleteket! Külön kiemelném Dr. Pál Évát, Dr. Ruisanchez Évát, Dr. Török Mariannát és Dr. Mukli Pétert.

Köszönöm a tudományos diákköri hallgatóknak, akikkel volt szerencsém együtt dolgozni! Külön köszönet Kiss Fanninak és Jose Martin Restifonak a disszertációm alapját képező publikációk kísérleteiben nyújtott segítségükért!

Köszönettel tartozom a Klinikai Kísérleti Kutató Intézet jelenlegi és hajdani munkatársainak a családi légkörért és a rengeteg segítségért! Közülük is kiemelném Dr. Miklós Zsuzsannát, Dr. Ivanics Tamást, Dr. Eke Andrást és Dr. Horváth Esztert, akik szakmai tapasztalatai nem csak a kísérletes munkában, hanem az elméleti felkészülésben is sokat segítettek, és leendő oktatói képességeimért is sokat tettek.

Kísérleteim és a laboratóriumi élet megvalósíthatatlanok lettek volna Oraveczné Murányi Ildikó asszisztensi segítségével!

Végül pedig köszönöm férjemnek és szüleimnek a kitartó támogatást, ami végigkísért a fokozatszerzés rögzös útján.