

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A BGP-15 gyógyszerjelölt kardioprotektív hatásának  
vizsgálata preklinikai in vivo és humán ex vivo  
modellen**

Dr. Lampé Nóra

Témavezető: Dr. Juhász Béla



**DEBRECENI EGYETEM**  
Gyógyszerészeti tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

# **A BGP-15 GYÓGYSZERJELÖLT KARDIOPROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PREKLINIKAI IN VIVO ÉS HUMÁN EX VIVO MODELLEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az experimentális farmakológia tudományágban

Írta: Dr. Lampé Nóra okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományok doktori iskolája  
(farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Juhász Béla PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma PhD

Dr. Almássy János PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós PhD

tagok: Dr. Siposné Dr. Fehér Pálma PhD

Dr. Almássy János PhD

Dr. Deák Ádám PhD

Dr. Dér Péter PhD

Az értekezés védeése online történik, 2022.04.28-án 11.00 órai kezdettel. A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni a vitán, úgy jelezze a [juhasz.bela@med.unideb.hu](mailto:juhasz.bela@med.unideb.hu) email címre küldött üzenettel 2022.04.26. 16.00 óráig. A tárgymezőbe kérjük beírni: Lampé Nóra részvételi szándék.

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	1
<b>2. Célkitűzések</b> .....	3
<b>3. Anyagok és módszerek</b> .....	4
3.1. Izolált trabecula vizsgálata .....	4
3.1.1. Minta előkészítése .....	4
3.1.2. Protokoll .....	4
3.1.3. Eredmények értékelése.....	5
3.2. BGP-15 kezelt nyulak vizsgálata.....	5
3.2.1. Állatmodell.....	5
3.2.2. Protokoll .....	6
3.2.3. Echokardiográfia .....	6
3.2.4. Szérum paraméterek és morfometria.....	7
3.2.5. Szövettan .....	8
3.2.6. Izolált érgyűrű vizsgálata .....	8
3.2.7. Western blot .....	9
3.2.8. A miokardium cGMP-tartalmának meghatározása .....	9
3.2.9. Titin esszé.....	10
3.2.10. In vitro PDE1 gátlás .....	10
3.3. Statisztikai elemzés.....	10
<b>4. Eredmények</b> .....	12
4.1. Izolált trabecula vizsgálata .....	12
4.1.1. Jobb pitvari minták kontrakciós ereje .....	12
4.1.2. Adenozinra adott válasz .....	12
4.1.3. Isoproterenolra adott válasz .....	12
4.1.4. Propranololra és BGP-15-re adott válasz .....	13
4.1.5. A betegadatok és a minták viselkedésének kapcsolata .....	14
4.2. BGP-15 kezelt nyulak vizsgálata.....	14
4.2.1. Diasztolés funkció .....	14
4.2.2. Szérum lipid paraméterek.....	16
4.2.3. Endotélium-függő vazorelaxáció .....	16
4.2.4. cGMP szint.....	17
4.2.5. In vitro PDE1 gátlás .....	17
4.2.6. PKG-tengely.....	17
<b>5. Megbeszélés</b> .....	19
<b>6. Összefoglalás</b> .....	22
<b>7. Publikációk</b> .....	23

<b>8. Köszönetnyilvánítás</b> .....	25
-------------------------------------	----

## 1. Bevezetés

A metabolikus szindróma egy olyan tünet együttes, melyet magas vérnyomás, hiperglikémia, abdominális elhízás és diszlipidémia jellemez, növelve a 2-es típusú diabétesz mellitus és kardiovaszkuláris megbetegedések gyakoriságát. A betegség első hivatalos definícióját a WHO adta meg 1998-ban, ám a későbbiekben több kritériumrendszert is létrehoztak a kórkép minél pontosabb definiálására. Ezek közül a legújabb a Harmonizációs diagnosztikai kritériumrendszer (2009). A betegség prevalenciája, nemek és életkor szerinti megoszlása nagymértékben függ attól, hogy mely kritériumrendszert alkalmazzuk, ám mindenképpen növekvő tendenciát mutat.

Fő rizikófaktorai közé tartozik az abdominális elhízás, inzulinrezisztencia, alacsony HDL szint, magas vérnyomás, ugyanakkor egyre több tanulmány vizsgálja a genetikai meghatározottságot, például a 11- $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz, vagy az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) gének szerepét a betegség kialakulásában.

Patogenezisében ugyanakkor vitathatatlan az inzulinrezisztencia kulcsszerepe, melyhez nagyon gyakran társul megnövekedett abdominális viszcerális zsírszövet. Ebben az állapotban a szervezet igyekszik fenntartani a normaglikémiás állapotot a  $\beta$ -sejtek mennyiségének növelésével és/vagy az inzulin szekréció kapacitásának fokozásával. Amennyiben a kompenzációs mechanizmusokkal kialakított növekvő  $\beta$ -sejt funkció és/vagy tömeg hosszabb ideig funkcióképes marad, a 2-es típusú diabétesz manifesztálódása időben eltolódik és hiperinzulinémiás állapot alakul ki. Az inzulinrezisztencia előrehaladásával azonban a  $\beta$ -sejtek kimerülnek, elveszítik funkciójukat. Az inzulin nem csupán a glükóz-, de a lipidháztartás szabályozásában is részt vesz, jelenlétében fokozódik a lipogenezis és gátlódik a lipolízis. A zsírszövet inzulinrezisztenciája fontos a metabolikus szindróma patofiziológiájának szempontjából. Kialakulása során a FFA (szabad zsírsav, free fatty acid) mobilizáció a zsírszövetben tárolt trigliceridből felgyorsul (lipolízis). Mindezek mellett a zsírszövet a proinflammatorikus citokinek túlzott felszabadulásán keresztül szintén kapcsolódik a metabolikus szindróma patofiziológiájához.

Mindezekon túl ismert az inzulinrezisztens betegek kardiovaszkuláris megbetegedésekre való fokozott hajlama. Egyrészt a hipertónia jellemző, melyhez a renin-angiotenzin rendszer aktiválása, az inzulin sóreabszorpciót fokozó hatása, valamint a szimpatikus idegrendszer fokozott aktiválása mind hozzájárul. A másik fenyegető kardiovaszkuláris probléma a diabéteszes kardiomiopátia kialakulása, melynek a diasztolés diszfunkció mellett jellemzője a szívizom hipertrófia, előrehaladottabb állapotban pedig szisztolés funkcióromlás kísérheti.

A metabolikus szindróma a 2-es típusú diabétesz és a kardiovaszkuláris megbetegedések mellett számos egyéb megbetegedés táptalaja lehet.

Terápiáját tekintve elsődleges az életmódváltás, a megfelelő diéta és a rendszeres testmozgás. Noha ez a szindróma korai stádiumában eléendő lehet, később elkerülhetlenné válik a gyógyszeres beavatkozás. A terápiát elsősorban antidiabetikumok, antihipertóniás és antihiperlipidémiás szerek alkotják. A rendelkezésre álló gyógyszerek jelentős korlátokkal és mellékhatásokkal rendelkezhetnek, melyek előtérbe helyezik új készítmények szükségességét. Vizsgálataink középpontjában a BGP-15 (O-(3-piperidin-2-hidroxi-1-propil) nikotinsav amidoxim) állt, egy magyar fejlesztésű, a propranololra szerkezetileg hasonlító gyógyszerjelölt, mely diabétesz indikációban a II. klinikai fázisvizsgálaton túljutott, bizonyítottan nem toxikus hatóanyag. Számos területen rendelkezik protektív hatásokkal, így szívelégtelenségben, súlyos izomdisztrófiában, policisztás ovárium szindrómában, de vizsgálták bőrvédő hatását akut fénykárosodás esetén is. Hatásmechanizmusa sokrétű, kardiális útvonalon a kutatások ellenére máig nem teljesen tisztázott.

## 2. Célkitűzések

Vizsgálatainkban célunk volt a BGP-15 gyógyszerjelölt kardioprotektív folyamatainak megértése, a háttérben álló mechanizmusok feltárása. Mivel kardiovaszkuláris hatásmechanizmusai kevésbé ismertek, kutatócsoportunk is több irányban vizsgálódott. Első kísérleti elrendezésünk alapját adta a propranolollal való nagyfokú szerkezeti hasonlóság, mely alapján feltételeztük, hogy a BGP-15 is rendelkezhet  $\beta$ -blokkoló hatással. A vizsgálati módszerünkkel azonban ezt nem állt módunkban megállapítani, csupán az inotrópiára gyakorolt hatást tudtuk összehasonlítani. Második kísérleti elrendezésünkben a BGP-15 PKG jelátviteli útvonalban betöltött szerepét vizsgáltuk. Korábbi eredményeink alapján a BGP-15 kezelésben részesült állatoknál fokozódott a SERCA pumpa aktivitása. A folyamat háttérében a PKG útvonal aktiválódása állhat, így célunk volt a folyamat egyes elemeinek vizsgálata, így a cGMP, foszfolambán, vazodilátor-stimulált foszfoprotein, titin, foszfodiészterázok aktiválódásának feltérképezése.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Izolált trabecula vizsgálata

##### 3.1.1. Minta előkészítése

A humán minták vizsgálatán alapuló munkánkat a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének Szívsebészeti Tanszékével együttműködve végeztük. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács jóváhagyta (etikai engedély szám: ETT TUKEB 39762-3/2016/EKU), mely engedély nem csupán a minta felhasználására, de a MedSol medikációs rendszerbe történő belépésre is kiterjedt. A mintavételt a betegek írásbeli és szóbeli tájékoztatása, valamint írásbeli beleegyezése előzte meg.

A nyitott szívsebészeti műtétekből (főként bypass és billentyűműtétek) származó mintákat eltávolítást követően azonnal hideg, karbogénnel dúsított Krebs-oldatot (4°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH= 7,4) tartalmazó főzőpohárban helyeztük, majd preparálást követően egy 10 ml térfogatú szintén karbogénnel dúsított Krebs oldatot tartalmazó szervkád (TSZ-04, Experimetria, Budapest) aljához és egy a szervkád fölötti transzducerhez (SD-01, Experimetria, Budapest) rögzítettük, 10 mN nyugalmi feszülés mellett. Az izomrostot platinaelektroddal, a küszöbfeszültség másfélszeresével (7-20 V, 1 Hz, 2 ms impulzusszélesség), pontszerűen ingereltük, a kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük.

##### 3.1.2. Protokoll

Vizsgálataink során 2 protokollt alkalmaztunk, melynek az előkészítése, illetve kezdeti elemei megegyeztek. A preparátumokat 45 percen keresztül inkubáltuk folyamatos oxigénellátás mellett. Többszöri, előmelegített Krebs oldattal történő mosással biztosítottuk a megfelelő tápanyagellátást. Az inkubációs idő letelte után a preparátumokon három, egymást követő adozin koncentráció-hatás (E/c) görbét vettünk fel (0.1 µmol/l-től 1 mmol/l-ig), melyeket először 30, ezután 15 perces mosási periódus különített el.

I. Protokoll – Indirekt hatás: isoproterenol E/c görbét vettünk fel 1 nmol/l-től 0.1 mmol/l-ig, ami alapján kiszámoltuk a pozitív inotropia szempontjából félhatásos koncentrációt, majd a mosási periódus letelte után ezt a dózist pipettáztuk a mintánkra. Miután a hatás stabilizálódott, a preparátumokon BGP-15 E/c görbét vettünk fel (0.1 µmol/l-től 1 mmol/l-ig). Ezt mosás és 50 perc inkubáció követett. Ezután ismét bemértük az isoproterenol félhatásos koncentrációját, majd a hatás kialakulása és stabilizálódása után propranolol E/c görbét vettünk fel (10 nmol/l-től 0.1 mmol/l-ig).

II. Protokoll – Direkt hatás: A BGP-15 direkt hatásának vizsgálatához isoproterenol E/c görbét nem vettünk fel, itt a prestimuláció nélküli BGP-15 és propranolol hatásokra voltunk kíváncsiak. Ebben a kísérleti elrendezésben a harmadik adenzin E/c görbét követő 15 perces mosási periódust BGP-15 vagy propranolol E/c görbe követte. Sajnos a mintáink a nagyobb koncentrációk bemérése után nem tudtak regenerálódni, még hosszas pihentetést (50 perc) után sem, így mintánként váltogattuk a BGP-15, valamint a propranolol E/c görbéket.

### 3.1.3. Eredmények értékelése

A görbék kiértékelésekor a kontrakciós erőt a sűrűn egymás után regisztrált egyedi összehúzódások alsó és felső burkológörbéjének távolságaként (amplitúdó) értelmeztük.

Negatív inotróp hatás az adenzin, a BGP-15 és a propranolol esetén jelentkezett. Kiindulási kontrakciós erőnek a legkisebb koncentráció beadása előtti állapotot tekintettük. Az adott koncentráció hatására kialakult legkisebb kontrakciós erőt vettük alapul a hatás kiszámításához, melyet a kiindulási kontrakciós erő százalékos csökkenéseként definiáltunk:

Pozitív inotróp hatás isoproterenol beadása után alakult ki. Kiindulási kontrakciós erőnek itt is a legkisebb koncentráció beadása előtti állapotot vettük, az adott koncentrációra kialakuló hatás számításához pedig a beadás után kialakuló legnagyobb kontrakciós erőt használtuk fel. A hatást ebben az esetben a kiindulási kontrakciós erő százalékos növekedéseként definiáltuk.

## 3.2. BGP-15 kezelt nyulak vizsgálata

### 3.2.1. Állatmodell

Állatkísérletes munkánkat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által jóváhagyott protokoll alapján végeztük (az állatkísérleti engedély iránti kérelem nyilvántartási száma: 25/2013DEMÁB és 10/2018DEMÁB). A vizsgálat során felhasznált állatok a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló, Európai Parlament és Tanács 2010/63/EU irányelveinek megfelelő tartásban és gondozásban részültek.

Állatkísérleteink során hím New Zealand típusú nyulakat (2700-3200 g) alkalmaztunk (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA, USA). Az állatokat 12-12 órás nappal-éjszaka ciklusban tartottuk, a vizsgálatok megkezdése előtt 2 hetes adaptációs időt biztosítottunk. Az állatokat „aterogén” diétán tartottuk 4 héten át: a táp 1% hozzáadott koleszterint és 5% telített zsírt tartalmazott.

### 3.2.2. Protokoll

I. Protokoll: hiperkoleszterinémias (HC, n=10, magas koleszterintartalmú táp), illetve a korban azonos kontroll (n=6, standard táp) nyulakat alkalmaztunk. A hiperkoleszterinémias állatokat 16 héten keresztül 1%-os koleszterintartalmú aterogén táppal etettük, ezt követően vettük fel a kezdeti értékeket. Ketamin-xilazin altatás mellett regisztráltuk az echokardiográfiás kiindulási értékeket, majd az állatok 10 mg/ttkg BGP-15 i.v. bolust (fiziológiás sóoldatban oldva) kaptak fülvénán keresztül. A disztribúcióra 20 perc várakozási időt adtunk, majd újra echokardiográfiás vizsgálatnak vetettük alá az állatokat. A statisztikai elemzéshez az alábbi négy alcsoportot hoztuk létre: 1) Kontroll csoport kiindulási körülményekkel (Kontroll Pre); 2) Az előzővel megegyező Kontroll csoport BGP-15 kezeléssel (Kontroll Post BGP-15); 3) HC állatok kiindulási körülményekkel (HC Pre); 4) Az előzővel megegyező HC csoport BGP-15 kezeléssel (HC Post BGP-15).

II. Protokoll: vizsgálatainkat egy másik populáción végeztük. 3 csoportot alakítottunk ki: 1) Kontroll csoport (n=10): standard táp; 2) Hiperkoleszterinémias csoport (HC, n=10); 3) BGP-15 kezelt hiperkoleszterinémias csoport (HC+BGP-15, n=10).

Utóbbi két csoport 4 hónapon keresztül kapott aterogén tápot (1% koleszterinnel dúsítva). A HC+BGP-15 csoport napi 10 mg/ttkg orális BGP-15 kezelésben részesült (sóoldat formájában). A kísérlet végpontján echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk, melyet fülvénán keresztül történő vérvétel követett. Másnap az állatokat elaltattuk, thoracotomiát követően az aorta thoracicát további *ex vivo* vizsgálatokhoz eltávolítottuk. A szívet jéghideg (4°C-os) Ca<sup>2+</sup>-mentes Krebs oldatba helyeztük, valamint folyékony nitrogénben fagyasztott szövetmintákat gyűjtöttünk későbbi molekuláris biológiai és izolált kardiomiocita vizsgálatokhoz. Az egyes szervek (tüdő, vese) tömegét megmértük, meghatároztuk a tibia hosszát (n=5). 3 nyúl/csoport esetén a szívet és az aortagyököt 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz

### 3.2.3. Echokardiográfia

A transzthoracalis echokardiográfiát ketamin-xilazin (30/3 mg/ttkg i.m.) anesztézia mellett végeztük. Az állatok mellkasszórzetét eltávolítottuk, a vizsgálat során az adatgyűjtést az Amerikai Echokardiográfiai Társaság ajánlásai alapján végeztük. Vidid E9 típusú ultrahangos képalkotó eszközt használtunk, 12 S-D típusú transzdúcercel (GE Healthcare, New York, NY, USA). A felvételeket paraszternális hossz tengelyi és rövidtengelyi illetve csúcsi metszetben készítettük el. Az ejekciós frakciót (EF), fracionált rövidülés (fraction shortening, FS), miokardiális falvastagságot szisztolé és diasztolé esetén, bal pitvar (left atrial, LA) nagyságát, aortaátmérőt (Ao), mitrális- és trikuszipidális annulus szisztolés csúcskiterését (MAPSE,

TAPSE) M módban állapítottuk meg. Meghatároztuk a szívfrekvenciát (heart rate, HR), a verőtérfogatot (stroke volume, SV), a perctérfogatot (cardiac output, CO) és a kalkulált bal kamra tömegét. Pulsed wave Doppler (PW) és szöveti Doppler (tissue Doppler imaging, TDI) echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk, mely alapján képet kaptunk a korai (E) és késői (A) mitrális beáramlási csúcshullámokról, ezek arányáról (E/A) és a decelerációs időről (deceleration time, DecT). A falmozgásokat a mitrális annulus szeptális részén TDI  $e'$  és  $a'$  hullámok, valamint ezek arányával ( $e'/a'$ ) kalkuláltuk, az E/ $e'$  érték mellett. Mindezeket túl meghatároztuk az ejekciós időt (ejection time ET), izovolumetriás kontrakciós és relaxációs időt (isovolumic contraction and relaxation time, IVCT, IVRT), valamint a Tei-indexet (miokardiális teljesítmény index, Myocardial Performance Index, MPI), utóbbit az IVRT+IVCT/ET képlet alapján. Az aorta billentyűk vizsgálatokor a bal kamrai kiáramlási traktus (left ventricle outflow tract, LVOT) nyomás- (pressure gradient, PG) és sebességértékeit (velocities, V) is meghatározhattuk. Speckle tracking echokardiográfiát offline, apikális pozícióból (apical long axis, APLAX) és négy kamrai nézetből EchoPAC PC software (ver. 112, GE Healthcare, New York, NY, USA) Q-analysis/2D Strain opcióban kivitelezte. A kamrai falszegmenseket manuálisan jelöltük ki, majd az izovolumetriás relaxációs periódus alatti strain rate (SR IVR), valamint a Globális Longitudinális Strain-t (GLS) és a kalkulált E/SRIVR arányt megállapítottuk.

#### 3.2.4. Szérum paraméterek és morfológia

A vérmintákat a kísérlet végpontján, 12 órás éhezést követően, fülvénából vettük. A szérum paramétereket a Roche Cobas Integrated felhasználásával határoztuk meg (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Az állatokon testsúlymérést követően, mély anesztézia mellett thoracotomiát hajtottunk végre. A szívet, tüdőt, májat és vesét eltávolítottuk (n=5/csoport), tömegüket analitikai mérlegen mértük meg. 5 állatból izoláltuk a bal kamrát, tömegét meghatároztuk és normalizáltuk a tibia hosszára. A bal kamrát 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz. A vesét, tüdőt és májat egy éjszakán keresztül 60°C-on hagytuk, majd a nedves/száraz szövet arányát kalkuláltuk. További 5 állat bal kamra mintáit a thoracotomiát követően azonnal kimetszettük, 4°C-os  $Ca^{2+}$ -mentes Krebs oldatba helyeztük, majd folyékony nitrogén segítségével gyorsfagyasztottuk és a molekuláris biológiai és az izolált miocita vizsgálatokig -80°-on tároltuk. Az aorta thoracicát kimetszettük, a disztális részét további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá, míg a proximális részt 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz.

### 3.2.5. Szövettan

A bal kamrai mintákon a kollagén rostok vizsgálatához Masson Trichome festési eljárást alkalmaztunk. A 4%-os formalin oldatban tárolt mintákat paraffinba ágyaztuk és 5 µm vastagságú szeleteket metszettünk. Deparaffinálást követően, a gyártói protokoll alapján végeztük el a Masson Trichome festést (sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). A festési eljárás az izomrostokat vörösre, míg a kollagén rostokat kékes-lilás színre festi. A fibrózis mértékét Scion Image for Windows software (ver. 4.0.2., Scion Corporation, USA) manuális terület-követési funkciójával határoztuk meg és a teljes vizsgálati mezőhöz viszonyítva, százalékos értékben adtuk meg (n=3/csoport, 3-5 metszet/állat).

Az aorta thoracica paraffinba ágyazott, 5 µm vastagságú szeleteit Movat-féle pentakróm festéssel festettük meg, láthatóvá téve így az ateroszklerotikus plakkokat (n=3/csoport, 3-5 metszet/állat). A gyártó által ajánlott festési protokollt követtük (Abcam Plc., Cambridge, UK), majd a megfestett szeleteket mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (40x vagy 100x nagyítás). Az intima és media vastagságát a Scion Image Windows software (ver. 4.0.2., Scion Corporation, USA) hosszúság-mérő funkciójával határoztuk meg, majd kiszámoltuk az intima/media arányt.

### 3.2.6. Izolált érgyűrű vizsgálata

Thoracotomiát követően az aorta thoracica disztális végéből egy 2 mm vastagságú szakaszt metszettünk ki, melyet azonnal 4 °C-os Krebs oldatba helyeztünk. Ezt követően a mintát preparálókádban megtisztítottuk, értartó drótok („vállfák”) segítségével teflon szervatartóra rögzítettük, majd 36°C-os Krebs oldatot tartalmazó szervkádba helyeztük (pH=7,4), 10 mN nyugalmi feszülés mellett. A minták oxigénellátását a pipán beáramló karbogén (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) biztosította. A minták kontrakciós értékeit transzdücer segítségével (SD-01; Experimetria Ltd., Hungary) mértük, illetve SPEL Advanced Isosys software (SOFT-02; MDE GmbH, Heidelberg, Germany) segítségével regisztráltuk és értékeltük. A mintákon három E/c görbét vettünk fel: noradrenalin (NA), acetilkolin (Ach) és adenzin-5'-trifoszfát (ATP) felhasználásával. Az Ach és ATP koncentráció-hatás görbék előtt az érgyűrűket prekontraháltuk a noradrenalin félmaximális (EC<sub>50</sub>) koncentrációjával, melyet az előzetesen regisztrált noradrenalin E/c görbe alapján határoztunk meg. A noradrenalin E/c görbe után egy 75 perces mosási periódust iktattunk be, a többi esetben 45 perceseket. Az azonos állatból származó minták értékeit átlagoltuk (4 gyűrű/állat).

Noradrenalin esetében a kontrakciós erő növekedését, ATP esetén a csökkenését (relaxáció) vettük válasznak. Ach esetében a relaxációt vettük figyelembe, ha az érgyűrű feszülése az adott

dózis bemérését követően kisebb, illetve kontrakcióval számoltunk (még hozzá a kontrakció maximális értékével), ha nagyobb értéken stabilizálódott.

### 3.2.7. Western blot

Minden fehérjeizoláláshoz 300 mg mély-fagyasztott miokardium mintát használtunk fel. A szövetet porítást követően a következő összetételű oldatban homogenizáltuk: 25 mM Tris-HCl, pH=8,25 NaCl, 4 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 nM okadaic-sav, 0,5 mM EDTA, 1mM PMSF, proteázinhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az összfehérje koncentrációt QuantiPro™ BCA Assay Kit segítségével határoztuk meg (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk elektro-blottolással (40 mA 120 perc). A 3%-os BSA blokkolást követően, a membránokat 4°C-on a következő primer antitestekkel inkubáltuk: anti-szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz 2a (SERCA2a; 1:2500), anti-hőshock fehérje 72 (Hsp72; 1:5000), anti-vazodilatátorral stimulált foszfoprotein (VASP; 1:1000), anti-foszfo(Ser239)- vazodilatátorral stimulált foszfoprotein (p-VASP; 1:1000), anti-foszfo diészteráz 9a (PDE9A; 1:2000), anti-foszfo diészteráz 5a (PDE5A; 1:1000), anti-foszfolambán (PLB; 1:2000), anti-foszfo(ser16)-foszfolambán (p-PLB; 1:2000), anti-gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, mint háztartási fehérje; 1:20000) (Sigma-Aldrich-Merck KGaA és Abcam Plc, Cambridge, UK). Az antitesteket a gyártói előírásoknak megfelelő hígításokban alkalmaztuk. Az előhíváshoz tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesteket, valamint kemilumineszcens reagenst használtunk (WesternBright™, ECL, Advansta Inc, Menlo Park, CA, USA). A detektálást és a kiértékelést Image Studio Digits ver. 5.2. software-rel (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) rendelkező C-Digit® blot scanner segítségével végeztük. Az adatokat három független vizsgálat alapján átlagoltuk (n=6 minta/csoport). A fehérje expressziót a kontroll csoporthoz viszonyítottan, a pixelsűrűség százalékos eltéréseként adtuk meg (a kontrollt tekintettük 100%-nak).

### 3.2.8. A miokardium cGMP-tartalmának meghatározása

A bal kamrai cGMP kvantifikációjához direkt kompetitív immunoesszét alkalmaztunk (Abcam Plc., Cambridge, UK). A cGMP abszorbancia-koncentráció görbét követően, a mintákat (n=4/csoport, dupla mérés minden esetben) 0,1M HCl-ban homogenizáltuk. A vizsgálat során a gyártói protokollt követtük. A tormaperoxidáz-kapcsolt cGMP mennyiségét, egy G-fehérje bevont 96-os plate-hez kötöttük, majd az optikai sűrűség (450 nm, plate olvasó, FLUOstar

Optimam BMG Labtech. Ortenberg, Germany) alapján meghatároztuk a mennyiséget. A miokardiális minták cGMP mennyiségét a gyártói egyenlet felhasználásával kalkuláltuk, és pmol/mg szövet értéként fejeztük ki.

### 3.2.9. Titin esszé

A miokardium mintákat relaxáló pufferben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. A sávokat azonos mennyiségű fehérje és titin izoformával töltöttük fel, a vizsgálatot agarózzal megerősített 1,8%-os géleken SDS-PAGE módszerrel végeztük. A titin és az izoforma analízishez a géleket Coomassie kék fehérjefestékkel (Reanal Kft., Budapest, Mo.) festettük. Ezen túlmenően Western blot módszerrel azonosítottuk az össz foszfo titin (szerin, treonin aminosavak foszforilálása), valamint a PS4080 specifikus foszforiláció mértékét, melyeket a totál protein értékekre normalizáltunk. Utóbbi jelentőségét adja, hogy ebben a pozícióban található szerin PKG specifikusan foszforilálódik.

### 3.2.10. In vitro PDE1 gátlás

A BGP-15 PDE1 gátló képességét specifikus kolorimetriás vizsgálattal (Abcam Plc., Cambridge, UK) határoztuk meg. A vizsgálat alapja a cGMP hasítása PDE1 által 5'-GMP-vé, amelyet az 5'-nukleotidáz enzim tovább hasít GMP-vé és foszfáttá, és a foszfát mennyiségét Malachit Green reagenssel határozzák meg. A görbe elkészítése után (abszorbancia - 5'-GMP koncentráció) egy 96 lyukú plate-re loadoltuk a vizsgálati puffert, 0,5 mM cGMP szubsztrátot, 5'-nukleotidáz enzimet (5 kU/ml), PDE1 enzimet (4 mU/ $\mu$ l), és a tesztvegyületet (BGP-15). A BGP-15-öt 40, 100, 200 és 500  $\mu$ M koncentrációban vizsgáltuk. Az üres lyukak csak a vizsgálati puffert tartalmazták (a háttér kivonásához). Pozitív kontrollként 40  $\mu$ M izobutil-1-metil-xantint (IBMX, IC<sub>50</sub> PDE1 esetén = 25  $\mu$ M) alkalmaztunk. A negatív kontroll csak a reagens mixet tartalmazta, hatóanyagok nélkül. 50 perc, 37°C-os inkubációt követően módosított Malachit Green vizsgálati reagenst adtunk minden egyes lyukhoz. További 20 perc inkubáció után az abszorbanciát Varioskan LUX spektrométerrel (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mértük 620 nm-en, és kiszámítottuk a keletkezett 5'-GMP mennyiségét. A „teszt” lyukakban a PDE1 aktivitást a „kontroll” PDE1 aktivitásra normalizáltuk, amelyet 100%-osnak tekintettünk. Az adatokat egyutas ANOVA-val végeztük, Tukey utóteszttel.

## 3.3. Statisztikai elemzés

Az egyes csoportokra vonatkozó adatokat számtani közép  $\pm$  SEM (standard error of the mean) formában adtuk meg.

Az első kísérleti elrendezésben az adatok normalitását D'Agostino & Pearson omnibus és Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk.

Két csoport középértékeit kétmintás Student-féle t teszttel (normál eloszlás, homogén varianciák), kétmintás Welch-korrigált t teszttel (normál eloszlás, szignifikánsan különböző varianciák) vagy Mann-Whitney U teszttel (nem-normál eloszlás) hasonlítottuk össze. Kettőnél több csoport középértékeit egyutas ANOVA-val és az azt követő Tukey post hoc teszttel (normál eloszlás) vagy Kruskal-Wallis teszttel és Dunn post hoc teszttel (nem-normál eloszlás) hasonlítottuk össze. A középértékek eltérését  $p < 0.05$  értéknél tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat Microsoft Excel 2013 szoftver segítségével tároltuk és rendszereztük, az elemzést és az ábrák készítését GraphPad Prism 8.4.2. szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) végeztük.

A második kísérleti elrendezés I. Protokolljában az echokardiográfia alapértékeit és a 20 perccel a BGP-15 beadását követő értékeket hasonlítottuk össze, mind kontroll, mind hiperkoleszterinémias nyulak esetén. Két utas ismételt méréses ANOVA-t használtunk, mivel a módszer lehetővé teszi két végpont közötti, egymás mellett futó adatok összehasonlítását a két faktor (a BGP-15 kezelés és az aterogén táp) befolyásoló hatásának figyelembevételével. Emellett kalkuláltuk a két faktor közötti interakciós értéket.

A II. Protokoll esetén, a három csoport esetén a paraméterek végpontjainak gaussi eloszlását a Shapiro-Wilk normalizációs teszttel tudtuk megbecsülni. A statisztikához egyutas varianciaanalízist (ANOVA) követő Tukey post-hoc tesztet (normál eloszlás esetén), illetve Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn's post-hoc tesztet (nem normál eloszlás esetén) alkalmaztunk.

Az analízist GraphPad Prism 8.4.2. szoftverrel végeztük (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), a különbséget  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1. Izolált trabecula vizsgálata

#### 4.1.1. Jobb pitvari minták kontrakciós ereje

A direkt (n=10) és indirekt (n=16) minták homogénnek bizonyultak a nyugalmi kontrakciós erő tekintetében. A direkt csoport (melyben a mintákat nem kezeltük isoproterenollal) két alcsoportjában (BGP-15: n=6 és propranolol: n=4) szintén nem volt különbség a nyugalmi kontrakciós értékek között. Azon minták esetén, melyek isoproterenol kezelésben részesültek, az ISO-ra adott válasz alapján négy típust különítettünk el: konzekvensen negatív inotróp választ adó (n=2), gyenge pozitív inotróp választ adó (n=5), erős pozitív inotróp választ adó (n=7), valamint extrém erős pozitív választ adó (n=2). A továbbiakban a gyenge és erős pozitív inotróp választ adó alcsoportokat indirekt csoporttá vontuk össze (n=12), így az indirekt csoportba olyan minták tartoztak, melyek pozitív inotróp válasza 0%-nál nagyobb, ugyanakkor 100%-nál nem volt nagyobb. Maga a nyugalmi kontrakciós erő a gyenge alcsoportban nagyobb volt az erős alcsoporttal összehasonlítva, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. Összefoglalva, a jelen vizsgálatban a minták nyugalmi kontrakciós ereje hasonló volt (leszámítva az isoproterenol kezelésre extrém erős választ adó két mintáét, melyek a negatív választ adókkal együtt kizárásra kerültek).

#### 4.1.2. Adenozinra adott válasz

A minták adenozinra adott válaszait a 3. adenozin E/c görbe alapján értékeltük. Az adenozin direkt negatív inotróp hatása minden csoportban hasonló volt, mutatva a minták homogenitását, hiszen az adenozin E/c görbéig minden minta azonos beavatkozásokon ment keresztül.

#### 4.1.3. Isoproterenolra adott válasz

Az isoproterenolra a minták (kettő kivételével) pozitív inotróp választ adtak. A pozitív válaszokat erősségük alapján osztályoztuk: gyenge válasz: ha a válasz maximuma nem érte el az 50%-ot (azaz a nyugalmi kontrakció kevesebb, mint 50%-kal emelkedett); erős válasz: ha a maximum 50-100% között volt; extrém erős válasz: ha a maximum nagyobb volt, mint 100%. Az előzőekben leírtaknak megfelelően a negatív inotróp és extrém erős pozitív inotróp választ adó mintákat kizártuk a további elemzésből. Szinte minden isoproterenolra adott válasz esetén szignifikáns volt a különbség az erős és a gyenge csoportok között. Mindkét csoport esetén az

isoproterenol hatásának fő jellemzői (a maximális válasz és a félhatásos koncentráció) negatív korrelációt mutattak a nyugalmi kontrakciós erővel, ami nem volt szignifikáns (Pearson  $r=0.41$ ,  $p=0.19$ ; Spearman  $r=0.32$ ,  $p=0.31$ ).

#### 4.1.4. Propranololra és BGP-15-re adott válasz

Mind a propranolol, mind a BGP-15 erőteljes, koncentráció-függő negatív inotróp hatást fejtett ki az ingerelt mintáinkra, direkt és indirekt protokoll esetén egyaránt. Ez a két hatás több hasonlóságot is mutatott (például a hatás maximumát tekintve), azonban néhány fontos különbség is megfigyelhető a propranolol és a BGP-15 hatása között. A legnagyobb különbséget a két vegyület potenciáljában tapasztaltuk: a BGP-15 kevésbé bizonyult potensnek a propranolollal összehasonlítva (mind a direkt, mind az indirekt hatás tekintetében). Ugyanakkor a BGP-15 erőteljesebb direkt negatív inotróp hatást fejtett ki, míg propranolol esetén jelentősebb az indirekt negatív inotróp hatás, ami főleg a nagyobb koncentrációknál figyelhető meg. Emellett a BGP-15 indirekt negatív inotróp hatása közepes és nagyobb koncentrációk esetén kifejezettebb volt azokon a mintákon, melyek isoproterenolra is erőteljesebb választ adtak. Ezzel ellentétben a propranolol esetén nem volt szignifikáns különbség az isoproterenolra adott válaszok alapján kialakított két csoport között (egy ilyen tendencia azonban megfigyelhető).

A diabétesz mellitus BGP-15-re gyakorolt hatásának megismeréséhez kettébontottuk az indirekt csoport adenzin, ISO és BGP-15 görbéit a betegek anamnézisében szereplő diabéteszes állapot szerint. Az eredmények nagymértékben egybevágtak a korábbi megfigyeléseinkkel, mely alapján a Gyenge és Erős alcsoportot létrehoztunk. Az ISO és a BGP-15 szignifikánsan nagyobb hatást fejtett ki diabéteszes minták esetén összehasonlítva a nem diabéteszes mintákkal. Ennek oka minden jel szerint a nagy átfedés az indirekt csoport Erős alcsoportja és a diabéteszes csoport között. Az indirekt csoport 12 mintájából 7 adott erős választ az isoproterenolra, ebből a 7 erős választ adóból pedig 4 anamnézisében szerepelt a diabétesz. Ezzel ellentétben az ISO-ra gyenge választ adó csoport 5 mintájából egyik sem bizonyult diabéteszesnek. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a diabétesz mellitus az egyik fő (ha nem a legfőbb) oka a minták emelkedett ISO érzékenységének. Sajnálatos módon az alacsony mintaszám nem teszi lehetővé annak differenciálást, hogy az 1. vagy a 2. típusú diabétesz mellitus (esetleg mindkettő) felelős-e a leírt jelenségért. Ugyanakkor az általunk felhasznált mintákban a 2. típusú diabétesz mellitus túlsúlyát tapasztalhatjuk: 7/9/22 (2. típusú diabétesz mellitus/minden diabéteszes beteg/minden

beteg; a direkt és az indirekt csoportokban összesen), illetve 3/4/12 (csak az indirekt csoport esetén).

#### 4.1.5. A betegadatok és a minták viselkedésének kapcsolata

Mintagyűjtés során 30 beteget vontunk be (7 nő és 23 férfi, életkorunk 29 és 78 év közötti:  $59,5 \pm 12,4$ ), amiből 27 volt technikailag megfelelő. A 27 mintából 10-et (3 nő és 7 férfi, életkoruk 40 és 70 év közötti:  $58,7 \pm 9$ ) véletlenszerűen a direkt csoportba osztottunk, míg a 16 minta (2 nő és 14 férfi, életkoruk 29 és 76 év közötti:  $57,9 \pm 13,5$ ) mindegyike kapott isoproterenolt. Ezen vizsgálati elrendezésben az a 12 beteg (1 nő és 11 férfi, életkoruk 29 és 76 év közötti:  $58,7 \pm 15,4$ ), akiknek a pitvarmintái az ISO kezelésre nem adtak szokatlan választ, alkották az indirekt csoportot.

Mindegyik mintaadónk több súlyos betegségben is szenvedett és számos gyógyszert szedett. Ezen tényezők közül a nitrátok (NO donorok) és a trimetazidin gyakoroltak jótékony hatást a minták kontrakciós erejére. A diabétesz mellitus és a hipertónia emelték, a protonpumpa gátlók viszont csökkentették az ISO-ra adott választ. Ezek közül egyik összefüggés sem bizonyult szignifikánsnak.

## 4.2. BGP-15 kezelt nyulak vizsgálata

### 4.2.1. Diasztolés funkció

Az egyszeri, i.v. BGP-15 dózis echokardiográfiás hatásainak vizsgálatához 16 hétig aterogén tápon tartott, illetve az azonos korú kontroll állatokat vizsgáltuk. Az kiindulási (gyógyszermentes) értékeket mind a két csoport esetén két utas, ismételt méréses ANOVA teszttel hasonlítottuk össze a BGP-15 beadását követően kapott értékekkel. Ahogyan várható volt, a két csoport értékei eltérést mutattak. Az E/A és e'/a' arányokban csökkenést tapasztaltunk a 16 hetes aterogén kezelés hatására. Az E/e' arány és a Tei-index értékei emelkedtek a HC csoportban a kontrollhoz képest, ugyanakkor az ejekciós frakció csökkenést mutatott a II. protokoll és a korábbi tapasztalatainkkal összhangban. Az ejekciós frakció változatlan maradt a BGP-15 injekciót követően. Ugyanakkor a BGP-15 szignifikánsan csökkentette a szívfrekvenciát ( $p=0,0142$ ), illetve HC nyulak esetén szignifikánsan növelte az E/A arányt ( $p=0,0008$ ) a kiindulási értékekhez képest. Mivel a transzmitrális E/A arány függ a szívfrekvenciától, a diasztolés funkciót több standard paraméter segítségével vizsgáltuk. Szöveti Doppler e' hullám sebessége és az e'/a' aránya szignifikánsan megnövekedett a BGP-

15 beadását követően mind a két csoport esetén, de a változások még erőteljesebbek voltak a HC állatoknál (e' esetén  $p=0,0004$ ; e'/a' esetén  $p=0,0012$ ). Az E/e' aránya (mely a bal kamra telődés alatti nyomását jellemzi) csökkent a BGP-15 bolust követően mindkét csoportban, de nagyobb eltérés mutatkozott ebben az esetben is a HC állatok kezdeti és végpont értékei között ( $p=0,003$ ). A Tei-index jelentősen lecsökkent a gyógyszerbeadást követően ( $p=0,028$ ). Noha a HC csoport echokardiográfiás paramétereit a BGP-15 injekció jelentősen befolyásolta, azonban a kontroll állatok értékei közel változatlanok maradtak.

A hosszú távú BGP-15 kezelés (II. Protokoll, 10 mg/ttkg BGP-15 per os 16 héten át) során az echokardiográfiás változások hasonlóságot mutattak az egyszeri dózisos vizsgálatainkhoz. A 16 hetes kezelést követően a bal pitvar átmérője és az aortagyök átmérőjének arányaként definiált, bal pitvari megnagyobbodást tapasztaltunk a HC csoportban a kontroll csoporttal összehasonlítva ( $p<0,0001$ ), melyet ellensúlyozott a 16 hetes BGP-15 kezelés ( $p=0,0478$  HC+BGP-15 vs. HC). A szisztolés és diasztolés falvastagság akárcsak a MAPSE és TAPSE értékek a csoportok között változatlanok voltak. Ugyanakkor kiemelkedő változást tapasztaltunk a diasztolés funkció tekintetében: az E/A és szöveti e'/a' arány szignifikánsan csökkent a HC csoportban a kontrollhoz képest ( $p<0,0001$  és  $p=0,0013$ ), A decelerációs idő pedig megnyúlt ( $p=0,0008$ ), miközben a BGP-15-kezelt állatok a kontrollhoz hasonló eredményeket produkáltak, a HC értékekhez képest mindenképp javulást tapasztaltunk ( $p=0,0993$ ,  $p=0,0002$  és  $p=0,0125$ ). A bal kamra telődési nyomását jellemző E/e' arány drámaian megemelkedett a HC csoportban ( $p<0,0001$  vs. kontroll) és szignifikánsan csökkent a HC+BGP-15 kezelésben ( $p=0,0048$  vs. HC). Hasonló mintát figyelhetünk meg az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT:  $p<0,0001$  HC vs. kontroll;  $p=0,003$  HC+BGP-15 vs. HC) és a Tei-index ( $p<0,0001$  HC vs. kontroll;  $p<0,0001$  HC+BGP15 vs. HC) tekintetében is.

Összegezve, mind az egyszeri, mind a krónikus BGP-15 kezelés szignifikánsan javította az echokardiográfiás paramétereket, különösen a diasztolés funkció állapotának indikáló értékeket a csak aterogén kezelésben (HC csoport) részesülő nyulakhoz viszonyítva.

A hosszú távú kezelést követően nem találtunk különbséget a morfometriás paraméterek tekintetében. A HC és HC+BGP-15 csoport állatainak súlygyarapodása az aterogén táppal magyarázható. Noha a HC+BGP-15 csoportban a szív tömege növekedett, a bal kamra mérete teljes szívhez viszonyítva csökkent. Az echokardiográfiából eredő morfometriás paraméterek, mint a bal kamrai szívizomtömeg index (left ventricle mass index, LVMi), bal kamrai végdiasztolés volumenindex (left ventricle end-diastolic volume index, LVEDVi) és relatív falvastagság (relative wall thickness, RWT%) között csupán tendencia látható a HC és a HC+BGP-15 csoportok között. A nedves-száraz szövetek aránya nem különbözött az egyes

csoportok esetén. A Masson Trichome festési eljárás enyhe fibrotikus átrendeződést mutatott mind a HC mind a HC+BGP-15 csoportokban, ugyanakkor a fibrózis mértéke (mely a fibrózisos terület és a teljes vizsgálati mező százalékos aránya) enyhe csökkenést mutatott a BGP-15 kezelés hatására.

#### 4.2.2. Szérum lipid paraméterek

A II. protokollban 16 héten át alkalmazott aterogén táp következményeként hiperkoleszterinémia és diszlipidémia alakult ki. Emelkedett az összkoleszterin, LDL, HDL, ApoA és ApoB szintek mind a HC mind a HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollhoz képest. A BGP-15 kezelés nem tudta szignifikánsan csökkenteni a szérum lipid paramétereket, májenzim értékeket vagy a CK és CK-MB szinteket. Az oszteokalcin, mely egy kevésbé ismert, az ateroszklerózissal és koronária megbetegedésekkel negatívan korreláló marker, szintén csökkenést mutatott a HC és HC+BGP-15 csoportokban a kontroll csoporttal szemben.

#### 4.2.3. Endotélium-függő vazorelaxáció

A II. protokoll során vizsgált izolált aortagyűrűk noradrenalin E/c görbéi tekintetében szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és a HC csoportok között 10 és 100 nmol/l koncentrációk esetén. A BGP-15 kezelés nem volt hatással az aterogén táp hatására megváltozott noradrenalin érzékenységre. Az Ach minden csoport esetén kezdetben vazorelaxációt váltott ki ( $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ ), nagyobb koncentrációknál viszont már vazokonstriktiót tapasztaltunk ( $> 1 \mu\text{mol/l}$ ). Az aterogén táppal kezelt csoport acetilkolinnal szembeni relaxációs készsége szignifikánsan elmaradt a kontroll csoportéhoz képest. A kialakult endotél diszfunkción a BGP-15 kezelés nem tudott javítani. Az ATP mind a három csoport esetén vazorelaxációt okozott, ami a kontroll csoport esetén volt a legerőteljesebb. A BGP-15 az Ach-hoz hasonlóan ATP esetén sem enyhítette az aterogén táp endotél-funkcióra kifejtett károsító hatását.

A Movat-fél pentakróm festéssel sikerült feltárni a HC és a HC+BGP-15 kezelt állatok intima felszínének súlyos ateroszklerotikus plakkosodását. A kontroll csoport intima felszíne elváltozásoktól mentes maradt. Az intima/media arány a kontrollhoz képest jelentősen nőtt a HC csoportban, míg a BGP-15 kezelés enyhén csökkentette ezt az arányt, ám utóbbi csoport aortagyök metszete is súlyos plakkosodást mutatott. A két vizsgálat eredményeként megállapíthatjuk, a BGP-15 nem tudta megóvni modellünk vaszkuláris állapotát.

#### 4.2.4. cGMP szint

Az egyes csoportok esetén speciális assay segítségével határoztuk meg a cGMP szinteket (n=4/csoport). A kontroll és HC állatok cGMP szintje nem különbözött jelentősen (10,49±1,584 vs. 12,94±2,301 pmol/mg), ugyanakkor a BGP-15 csoport állatai esetén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk (33,89±5,271 pmol/mg) a HC csoport állataival összevetve (p=0,0052).

#### 4.2.5. In vitro PDE1 gátlás

A BGP-15 enzimgátló képességének felmérésére foszfodiészteráz aktivitási vizsgálatot végeztünk. Gátlás nélkül (kontroll) 20 mU PDE enzim 2 nmol 5'GMP-t generált 200 µM cGMP-ből 37 °C-on 60 perc alatt. Egy nem specifikus PDE-inhibitor, az IBMX (3-izobutil-1-metil-xantin; 40 µM) szignifikánsan, 67%-ra csökkentette a PDE aktivitást (a kontrollhoz képest). A BGP-15 dózisfüggően gátolta a PDE aktivitást, ami szignifikáns volt (a kontrollhoz képest) 100 µM és 200 µM koncentrációkban.

#### 4.2.6. PKG-tengely

Western blot analízis segítségével derült fény a PKG útvonal sérülésére HC állatok bal kamrai miokardiumában. A hosszú távú BGP-15 fokozta a cGMP-PKG útvonal egyes kulcsmediátorainak expresszióját. A PKG expresszió szignifikánsan emelkedett mind HC, mind HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollhoz képest (p=0,0228). A cGMP/PKG arányt a kontroll csoport szintjére normalizálva (100%), HC csoport esetén a kontrollhoz képest jelentős csökkenést (n=4, p=0,0052), míg HC+BGP-15 csoport esetén a HC állatokhoz viszonyítva emelkedést (p=0,0117) figyeltünk meg. A p-(Ser239)-VASP/VASP (PKG enzimaktivitás jelzője) ugyanezt a mintát mutatta kontroll vs. HC (p=0,0471), illetve a HC+BGP-15 vs. HC csoportok esetén (p=0,0173). Noha a SERCA inhibitor foszfolambán (PLB) szignifikáns csökkenést mutatott a HC+ BGP-15 csoportban a HC állatokkal összehasonlítva (p=0,0284), a SERCA vagy a PLB/SERCA arány nem mutatott különbséget a két csoport között. Ezzel ellentétben, a Ser16 aminosavon foszforilált PLB (az összfoszfolambán szinthez viszonyítva) szignifikáns emelkedést mutatott a HC+BGP-15 csoportokban a HC csoporthoz képest (p=0,0274). A PDE9A szintje emelkedett mind a HC, mind a HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollal összevetve (p=0,0283 és p=0,0035). Ugyanakkor a PDE5 expressziója (mely ugyancsak egy kardiális cGMP-specifikus foszfodiészteráz) emelkedett a HC (p=0,056 vs. kontroll), de a HC-hoz viszonyítva csökkent a HC+BGP-15 csoportok esetén (p=0,025). A

Hsp72 szintje nem mutatott jelentős különbséget az egyes kezelések esetén. Minden analízis esetén a sávokat GAPDH-ra mint háztartási fehérjére normalizáltuk, a jelintenzitást a kontrollhoz viszonyított százalékos értékben adtuk meg (melyet 100%-nak tekintettünk).

## 5. Megbeszélés

Legjobb tudomásunk szerint a jelen értekezésben tárgyalt humán kutatás volt az első, ami a BGP-15 inotróp hatását vizsgálta és hasonlította össze a nem kardioszelektív  $\beta$ -adrenerg antagonisták prototípusával, a szerkezetileg rokon propranolol inotróp hatásával. Az összehasonlítás alapját a két vegyület strukturális hasonlósága adja, melynek alapján feltételeztük, hogy a BGP-15 is rendelkezhet  $\beta$ -blokkoló aktivitással. Ezt a mechanizmust az alkalmazott vizsgálati módszerünkkel sem megerősíteni sem megcáfolni nem áll módunkban, a vizsgálat célja a kontrakciós erőre gyakorolt hatás összehasonlítása volt. Az általunk alkalmazott izolált, ingerelt humán pitvari trabecula modellen a kontraktilitás megbízhatóan, a kronotrópia befolyásoló hatásának kizárásával vizsgálható. Kísérleteink alapján kis koncentrációban ( $\leq 10 \mu\text{mol/l}$ ) alkalmazva a BGP-15 negatív inotróp hatása elhanyagolható volt, ugyanakkor a koncentráció növelésével ( $\geq 1 \text{mmol/l}$ ) erőteljessé vált. Felnőtt betegek esetén a BGP-15 inzulinérzékenyítő hatását 2-3 mg/kg/nap dózisban már kifejtette, ami mikromólos mennyiségnek felelhet meg a szervezetben. Ezt a megfigyelést kiegészítve azzal a tapasztalatunkkal, hogy a BGP-15 negatív inotrópia szempontjából gyakorlatilag hatástalan  $10 \mu\text{mol/l}$  koncentrációig, arra következtethetünk, hogy a BGP-15 már kialakuló jótékony metabolikus hatását ebben a koncentrációtartományban még nem kíséri a kontraktilitás számottevő csökkenése.

Közepes koncentrációk esetén ( $10 \mu\text{mol/l}$  és  $1 \text{mmol/l}$  között) a BGP-15 indirekt negatív inotróp hatása a pitvar ISO érzékenységtől függött: csak azon a minták esetén fejtett ki a BGP-15 erőteljes negatív inotróp hatás, melyek az ISO-ra erőteljes pozitív inotróp választ adtak. A leírt jelenség a BGP-15 esetében kedvező lehet, hiszen a túlzott szimpatikus tónus alatt álló szív működését visszafoghatja a nyugalmi kontraktilitás érdemi befolyásolása nélkül, így csupán akkor van hatása, amikor éppen szükség van rá a szimpatikus túlsúly miatt. Ez bizonyos hasonlóságot mutat az antiaritmiás szerek (lidokain) negatív kronotóp hatásával, melyek hatékonyan tudják a szívet lassítani tachicardia esetén, bradikardiában viszont hatástalanok (kialakítva ezzel az ún. use-dependent hatást).

Megvizsgálva a pitvari minták funkciója (a kontrakciós erő és az ISO-ra adott válasz), valamint a páciensek állapota (nem, betegségek, alkalmazott gyógyszeres terápia) közötti összefüggéseket arra jutottunk, hogy az ISO-ra adott válasz kapcsolatban áll a hipertóniával és a diabétesz mellitusszal. Az ISO-ra erős választ adók többsége a (főként 2-es típusú) diabéteszes betegcsoportból került ki. Érdekes megfigyelés, hogy az ISO válaszkészség fordított

összefüggést mutat a pitvari miokardium állapotával. Ezt a következtetést megerősítette, hogy minden vizsgált kóros állapot fokozta az ISO válaszkészséget.

A diabéteszes és nem diabéteszes betegek mintáinak viselkedése és az ISO-ra adott válasz alapján végzett összehasonlítás nagymértékű hasonlóságot mutatott. A BGP-15 szignifikánsan nagyobb indirekt negatív inotróp hatást gyakorolt a diabéteszes betegek mintáira a nem diabéteszekéhez képest. Ez a megfigyelés egybevág azon eredményekkel, melyek szerint az inzulin rezisztencia növekedésével (tehát az inzulin hatásának csökkenésével) nő a szív  $\beta$ -adrenerg stimulált állapota. Ez a kapcsolat az inzulin és a  $\beta$ -adrenerg agonisták kölcsönösen egymás ellen dolgozó jelátviteléből származhat, ami hozzájárulhat az új típusú  $\beta$ -blokkolók inzulinrezisztenciát enyhítő hatásához a szívben.

A jelen disszertációt megalapozó munkánk második részében, a BGP-15 akut és krónikus alkalmazását vizsgálva, a kardiális funkciók javulását tapasztalhattuk ateroszklerózisban szenvedő nyulak esetén. A BGP-15 megtartotta a diasztolés funkció értékeit, helyreállította a PKG aktivitást, fokozta a titin foszforilációját, mely miofilamentum fehérje felelős a diasztolés nyomásért. Fontos megjegyezni, hogy ez a hatás független volt a vaszkuláris státusztól, lipidszintektől és ateroszklerózistól.

Az echokardiográfiai eredményeink alapján mind az egyszeri bolus, mind a hosszú távú orális BGP-15 kezelés megtartotta a szív diasztolés állapotát. A szöveti  $e'/a'$  arány (mely független a szívfrekvenciától) szignifikánsan megemelkedett a BGP-15 injekciót követően, sugallva a BGP-15 direkt miokardiális relaxáló hatását. Noha egyszeri kezelés nem volt hatással az ejekciós frakció értékeire, hosszú távú kezelés esetén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a BGP-15 kezelt állatokban a HC csoport egyedeivel összehasonlítva, mely feltételezhetően a javuló diasztolés teljesítmény és alacsonyabb szívfrekvencia eredménye lehet. Mivel szakirodalmi adatok alapján a diasztolés diszfunkció alapvető molekuláris hátterét a miokardiális szövet PKG szignalizációs útvonalának romlása adja, a BGP-15 jótékony hatásának feltárásához a cGMP-PKG kaszkádot vizsgáltuk. Vizsgálatunk egyik fő eredménye, hogy a BGP-15 kezelés emelte a cGMP szintet, ezáltal fokozta a HC állatok sérült miokardiumának PKG aktivitását. A HC nyulak bal kamrájában a cGMP-re nagyfokú szelektivitást mutató PDE9A és PDE5A emelkedett expresszióját tapasztaltuk, utóbbi a BGP-15 kezelésre szignifikáns csökkenést mutatott. Ezen túlmenően a PDE1 gátlást (mely szintje jelentősen emelkedik károsodott szívizomban) in vitro kolorimetriás PDE kit segítségével is igazoltuk. A PKG szubsztrátok közül Western blot technikával vizsgáltuk a foszfolambán (PLB) expressziót, mely a SERCA pumpa gátlásával a miociták relaxációs idejének megnyúlását okozza, így a kardiális relaxáció szabályozásában kulcsszerepet játszik. A PKG

vagy PKA által, Ser16 (vagy PKA által Thr17) pozícióban foszforilált PLB SERCA pumpát gátló hatása megszűnik. A BGP-15 kezelés hatására az össz PLB expresszió csökkent, valamint a Ser16 PLB aránya a PLB-hez viszonyítva megemelkedett. Ezen eredményeink korrelálnak az *in vivo* tapasztalatainkkal, ahol a megnyúlt IVRT a BGP-15 kezelés hatására normalizálódott. A  $Ca^{2+}$  homeosztázis rendellenességei mellett a diasztolés funkciót szintén befolyásolja a miofilamentum fehérjék és az extracelluláris mátrix változásai. Masson's trichome festéssel fibrotikus átrendeződést mutattunk ki a HC csoport egyedeinek szívmintáiból, melynek mértéke a bal kamrában csökkent a BGP-15-kezelte csoport esetén. Mindezek mellett a molekuláris vizsgálatok alapján a BGP-15 kedvezően befolyásolta a titin foszforilációját és izofomáját. A HC csoport állataiban a titin N2BA/N2B expresszió aránya szignifikánsan eltolódott az N2B irányába, emellett a titin N2-Bus foszforiláció csökkent, következményesen a kardiomiociták passzív merevsége emelkedett. Legjobb tudomásunk szerint a szakirodalomban ez a vizsgálat volt az első, melyben HC nyulakon ki tudtuk mutatni a titin izoformák változását. Kutatásunk egyik fő eredménye, hogy a megtartott funkcionális értékek és a miociták passzív csökkenő merevsége mellett, a BGP-15 kezelt állatokban a titin izoformák összetétele és az N2-Bus foszforiláció helyreállt. Összességében, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a BGP-15 kezelés diasztolés diszfunkciót ellensúlyozó hatása részben magyarázható a megtartott miofilamentum funkcióval, melynek háttérében a titin megnövekedett foszforilációja áll.

Második kísérleti elrendezésünkben tehát sikerült igazolni mind egyszeri intravénás, mind hosszú távú orális kezelés mellett a BGP-15 diasztolés diszfunkciót javító hatását ateroszklerózisos nyúlmodellen, mely hatás a vaszkuláris állapottól függetlennek mutatkozott. Sikerült igazolni a PDE5A expresszió csökkenését hosszú távú kezelés mellett, *in vitro* pedig a PDE1 gátló hatást, valamint a titin izoformák esetén az N2-Bus foszforiláció helyreállítását.

Eredményeink alapján a BGP-15 számos protektív hatásával egy potenciális kardiológiai gyógyszerjelölt, hatásmechanizmusának teljes feltérképezése azonban további vizsgálatokat igényel. Kutatásaink során igazoltuk a diasztolés diszfunkciót mérséklő, valamint diabéteszes betegcsoporton kifejtett erőteljesebb hatását, melyek alapján a BGP-15 a metabolikus szindróma, valamint a diabéteszes szívelégtelenség hiánypótló farmakonjává válhat.

## 6. Összefoglalás

A metabolikus szindróma egy súlyos, életet veszélyeztető betegség, melynek kezelése az egész életet végigkísérheti. A jelenleg rendelkezésre álló terápia mind hatóanyagok, mind a hatásosság tekintetében limitált. Kutatásaink során a BGP-15, II. klinikai fázison túljutott hatóanyag jelöltet vizsgáltuk, mely számos jótékony hatása nyert igazolást a korábbiakban. Első kísérleti elrendezésünkben nyitott szívműtétekből származó humán trabeculán igazoltuk a molekula negatív inotróp hatását, mely hatás nagymértékben függött az előzetes isoproterenol prekontrakciótól (indirekt), csak nagyobb dózis esetén volt attól független. Jelentős eredményünk, hogy a BGP-15 negatív inotróp hatása összefüggést mutatott a diabéteszes állapot meglétével. Azon mintadonorok, akik diabétesz mellitusban szenvedtek, szignifikánsan erőteljesebben reagáltak az isoproterenol pozitív inotróp hatására, valamint a BGP-15 jelentősebb negatív inotróp hatást fejtett ki ezeken a mintákon. Második kísérleti elrendezésünkben hiperkoleszterinémiás nyúlmodellt alkalmazva vizsgáltuk a BGP-15 rövid (egyszeri i.v. bolus) és hosszú távú (p.o. 16 hetén át) hatását a kardiális funkciókra. Tapasztalataink alapján a BGP-15 javította a diasztolés diszfunkció paramétereit, ugyanakkor nem befolyásolta a vaszkuláris NO felszabadulást. Kardiális hatásait funkcionális vizsgálatokkal igazoltuk, a lezajló folyamatok megértéséhez pedig molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink alapján a BGP-15 javította a titin izoformák, illetve növelte a Ser16 foszfolambán arányát, mely fehérje foszforilálatlan állapotban a SERCA pumpa gátlásán keresztül részt vesz a szív relaxáló folyamataiban. Csökkentette az össz foszfolambán, emelte a cGMP szintet, mely a PKG útvonalon keresztül szerepet játszik a szívelégtelenség patofiziológiájában. *In vivo* bizonyítottuk a PDE5A, *in vitro* pedig a PDE1 gátló hatását. Kutatásainkkal igazoltuk, hogy a BGP-15 a szívelégtelenség több diasztolés paraméterét képes javítani, illetve, hogy hatásai erőteljesebben jelentkeznek diabéteszes szív esetén. Szem előtt tartva a metabolikus szindróma mint betegségeggyüttes súlyosságát, illetve a rendelkezésre álló gyógymódok korlátjait, megfontolandó a BGP-15 gyógyszerjelöltet a további kutatások középpontjába helyezni.

## 7. Publikációk



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/527/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lampé Nóra  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Priksz, D., **Lampé, N.**, Kovács, Á., Herwig, M., Bombicz, M., Varga, B., Willisicz, T., Szilvássy, J., Pósa, A., Kiss, R., Gesztelyi, R., Ráduly, A. P., Szekeres, R., Sieme, M., Papp, Z., Tóth, A., Hamdani, N., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy.  
*Br. J. Pharmacol. [Epub ahead of print], 2021.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15749>  
IF: 8.739 (2020)
2. **Lampé, N.**, Priksz, D., Erdei, T. D., Bombicz, M., Kiss, R., Varga, B., Zsuga, J., Szerafin, T., Csanádi, Z., Balla, G., Balla, J., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Negative Inotropic Effect of BGP-15 on the Human Right Atrial Myocardium.  
*J. Clin. Med. 9 (5), 1-18, 2020.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9051434>  
IF: 4.241

### További közlemények

3. Viczján, G., Erdei, T. D., Óvári, I., **Lampé, N.**, Szekeres, R., Bombicz, M., Takács, B., Szilágyi, A., Zsuga, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: A Body of Circumstantial Evidence for the Irreversible Ectonucleotidase Inhibitory Action of FSCPX, an Agent Known as a Selective Irreversible A1 Adenosine Receptor Antagonist So Far.  
*Int. J. Mol. Sci. 22 (18), 1-21, 2021.*  
IF: 5.923 (2020)
4. Szabó, K., Gesztelyi, R., **Lampé, N.**, Kiss, R., Gálné Remenyik, J., Pesti-Asbóth, G., Priksz, D., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) Seed Flour and Diosgenin Preserve Endothelium-Dependent Arterial Relaxation in a Rat Model of Early Stage Metabolic Syndrome.  
*Int. J. Mol. Sci. 19 (3), 1-21, 2018.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030798>  
IF: 4.183





5. Erdei, T. D., Szabó, A. M., **Lampé, N.**, Szabó, K., Kiss, R., Zsuga, J., Papp, C., Pintér, Á., Szentmiklósi, J. A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Gesztelyi, R.: FSCPX, a chemical widely used as an irreversible A1 adenosine receptor antagonist, modifies the effect of NBTI, a nucleoside transport inhibitor, by reducing the interstitial adenosine level in the guinea pig atrium. *Molecules*. 23 (9), 1-17, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23092186>  
IF: 3.06
6. Zsuga, J., Erdei, T. D., Szabó, K., **Lampé, N.**, Papp, C., Pintér, Á., Szentmiklósi, J. A., Juhász, B., Szilvássy, Z., Gesztelyi, R.: Methodical Challenges and a Possible Resolution in the Assessment of Receptor Reserve for Adenosine, an Agonist with Short Half-Life. *Molecules*. 22 (5), 1-17, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22050839>  
IF: 3.098
7. Varga, B., Priksz, D., **Lampé, N.**, Bombicz, M., Kurucz, A., Szabó, A. M., Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Protective Effect of Prunus Cerasus (Sour Cherry) Seed Extract on the Recovery of Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Damage in Zucker Diabetic Fatty Rat. *Molecules*. 22 (10), [1-12], 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>  
IF: 3.098

**A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 32,342**

**A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
12,98**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.12.15.



## **8. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Juhász Béla egyetemi docensnek belém vetett hitéért, hogy PhD hallgatójává fogadott, munkám során folyamatosan biztatott, értékes tanácsaival látott el.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Szilvássy Zoltán Intézetvezetőnek a lehetőséget, hogy PhD munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetnél végezhettem.

Végtelenül hálás vagyok Dr. Gesztelyi Rudolf egyetemi docensnek, aki szakmai támogatása mellett barátságával is megajándékozott.

Külön köszönöm Dr. Erdei Tamás Dániel kutatótársamnak a humán vizsgálatok során, valamint Dr. Priksz Dánielnek az állatkísérletekben nyújtott hatalmas segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Szerafín Tamás egyetemi docensnek, a Szívsebészeti Tanszék vezetőjének a támogatását a humán vizsgálatokban.

Köszönöm Dr. Kozma Mariannak a western blot vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Hálás vagyok a 3. emeleti kutatócsoport valamennyi tagjának, akik megédesítették a kutatással töltött napokat.

Köszönöm Dr. Kurucz Andrea és Szabó Katalin biztatását, barátságát.

Hálásan köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának, kollaborációs partnerének, aki hozzájárult jelen munka megszületéséhez.

Óriási hálával adózom férjem, szüleim, testvéreim előtt, akik kimeríthetetlen szeretetükkel támogattak egész életem során.

*Jelen értekezést a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART) és a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.*

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében.

A TKP2021-EGA-18 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.

