

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Priksz Dániel

**A Protein Kináz G jelátviteli útvonal vizsgálata
ateroszklerózis és diabétesz mellitusz talaján kialakult
kardiális diszfunkcióban**

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A Protein Kináz G jelátviteli útvonal vizsgálata
ateroszklerózis és diabétesz mellitusz talaján kialakult
kardiális diszfunkcióban**

Dr. Priksz Dániel

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019**

You should always be learning.
If you're the smartest person in the room,
you're in the wrong place.

Erica Bearman

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	1
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1.	A kardiális diszfunkció és a szívelégtelenség etiológiája.....	4
2.1.1.	A diabéteszes kardiomiopátia.....	7
2.1.2.	Az ateroszklerózis talaján kialakuló szívelégtelenség.....	8
2.2.	A szívelégtelenség molekuláris patológiai háttere	11
2.3.	A szívelégtelenség diagnosztikája	17
2.3.1.	Alapvető és kiegészítő diagnosztikai módszerek.....	17
2.3.2.	Az echokardiográfia szerepe a diagnózisban	18
2.4.	A szívelégtelenség farmakoterápiája	26
2.4.1.	Konvencionális szerek és újabb gyógyszercsoportok.....	26
2.4.2.	Egyéb terápiás lehetőségek és az alapbetegségek kezelése	29
2.5.	A BGP-15 gyógyszerjelölt.....	31
2.6.	Állatmodellek a kardiális diszfunkció vizsgálatára	33
2.6.1.	A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell	35
2.6.2.	A hiperkoleszterinémias (HC) nyúl modell	35
2.7.	Célkitűzések.....	37
3.	Anyagok és módszerek.....	38
3.1.	Állatmodellek és kísérleti elrendezés	38
3.1.1.	A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell	38
3.1.2.	A Goto-Kakizaki patkánymodell-tanulmány kísérleti protokollja.....	38
3.1.3.	A hiperkoleszterinémias (HC) nyúl modell	39
3.1.4.	A nyúlmodell-tanulmány protokollja	39
3.2.	Felhasznált anyagok és vegyszerek	40
3.3.	Morfometria, vérvétel és metabolikus paraméterek meghatározása.....	41
3.4.	Echokardiográfia	43

3.5.	Vaszkuláris mérések	44
3.6.	Szövettani festések	45
3.7.	Western blot vizsgálatok	45
3.8.	Miokardiális cGMP-szint meghatározása immunoesszével	46
3.9.	Statisztikai számítások és ábrázolás	47
4.	Eredmények.....	48
4.1.	A Goto-Kakizaki patkánymodell-kísérletek eredményei	48
4.1.1.	Metabolikus paraméterek	48
4.1.2.	Endothel-függő vazorelaxáció.....	49
4.1.3.	Echokardiográfia, kardiális funkció	50
4.1.4.	Western blot vizsgálatok	53
4.1.5.	A patkánymodell-kísérletek eredményeinek összefoglalása	54
4.2.	A nyúlmodell-kísérletek eredményei.....	57
4.2.1.	Echokardiográfia	57
4.2.2.	Morfometria	59
4.2.3.	Szérum paraméterek	59
4.2.4.	Endothel-függő vazorelaxáció.....	60
4.2.5.	Szövettani festések	62
4.2.6.	Western blot és miokardiális cGMP-szint.....	63
4.2.7.	A nyúl modell eredményeinek összefoglalása	65
5.	Megbeszélés	67
6.	Összefoglalás/Summary	78
7.	Irodalomjegyzék.....	80
8.	Tárgyszavak	92
9.	Köszönetnyilvánítás	93
10.	Függelék	94

Rövidítések jegyzéke

1D, 2D, 3D „3R szabály”	1 dimenziós, 2 dimenziós, 3 dimenziós <i>Reduction, Refinement, Replacement</i> , csökkentés, finomítás, helyettesítés; az etikus állatkísérletek 3 elve
A hullám	<i>atrial wave</i> , késői (pitvari) mitrális beáramlási csúcshullám
ACC	<i>American College of Cardiology</i> , Amerikai Kardiológiai Kollégium
ACEI	<i>angiotensin-converting-enzyme inhibitor</i> , angiotenzin-konvertáz enzim gátló
AHA	<i>American Heart Association</i> , Amerikai Kardiológiai Társaság
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i> , pitvari natriuretikus peptid
ARB	<i>angiotensin receptor blocker</i> , angiotenzin II receptor blokkoló
ARNI	<i>angiotensin-receptor neprilysin inhibitor</i> , angiotenzin-receptor és neprilizin-gátló
ATP	<i>adenosin-triphosphate</i> , adenzin-trifoszfát
BGP-15	O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i> , B-típusú natriuretikus peptid
bpm	<i>beats/minute</i> , ütés/perc
CAD	<i>Coronary Artery Diseases</i> , koronária-artéria betegségek
cAMP	<i>cyclic adenosin monophosphate</i> , ciklikus adenzin-monofoszfát
CCB	<i>calcium-channel blocker</i> , kalcium-csatorna blokkoló
cGMP	<i>cyclic guanosin monophosphate</i> , ciklikus guanozin-monofoszfát
CO	<i>Cardiac Output</i> , perctérfogat
DecT	<i>deceleration time</i> , decelerációs idő
E hullám	<i>early wave</i> , korai mitrális beáramlási csúcshullám
EF	<i>Ejection Fraction</i> , ejekciós frakció
ESC	<i>European Society of Cardiology</i> , Európai Kardiológiai Társaság
ET	<i>Ejection Time</i> , ejekciós idő
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Amerikai Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal
FS	<i>Fractional Shortening</i> , frakcionált rövidülés
HFpEF	<i>Heart Failure with Preserved Ejection Fraction</i> , szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval
HFrfEF	<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i> , szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval
HLY	<i>Heathy Life Years</i> , egészségesen várható élettartam
HR	<i>Heart rate</i> , szívfrekvencia
ISZB	iszkémiás szívbetegségek
IVCT	<i>isovolumic contraction time</i> , izovolumetriás kontrakciós idő
IVRT	<i>isovolumic relaxation time</i> , izovolumetriás relaxációs idő
IVSd	<i>interventricular septum thickness in diastole</i> , interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolében
IVSs	<i>interventricular septum thickness in systole</i> , interventrikuláris szeptum vastagsága szisztolében

LVEDD	<i>left ventricular end-diastolic diameter</i> , bal kamrai végdiasztolés átmérő
LVEDV	<i>left ventricular end-diastolic volume</i> , bal kamrai végdiasztolés térfogat
LVESD	<i>left ventricular end-systolic diameter</i> , bal kamrai végszisztolés átmérő
LVESV	<i>left ventricular end-systolic volume</i> , bal kamrai végszisztolés térfogat
LVID	<i>left ventricle internal diameter</i> , bal kamrai belső átmérő
LVOT	<i>left ventricular outflow tract</i> , bal kamrai kiáramlási pálya
LVPW	<i>left ventricle posterior wall thickness</i> , bal kamrai hátsó fal vastagsága
MAPSE	<i>mitral anular plane systolic excursion</i> , mitrális anulus szisztolés csúcskitérése
maxPG	<i>maximal pressure gradient</i> , maximális nyomásgradiens
meanPG	<i>mean pressure gradient</i> , átlagos nyomásgradiens
MHz	megahertz
mN	millinewton
MPI	<i>Myocardial Performance Index</i> , miokardiális teljesítmény index
mtsai	munkatársai
NME	<i>New Molecular Entities</i> , újonnan létrehozott gyógyszermolekulák
NO	nitrogén-monoxid
NT-proBNP	N-terminális pro-B-típusú natriuretikus peptid
NYHA	<i>New York Heart Association</i> , New Yorki Kardiológiai Szövetség
PCSK9	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PDE	<i>phosphodiesterase enzyme</i> , foszfodiészteráz enzim
PGC1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i> , Protein Kináz A
PKG	<i>Protein Kinase G</i> , Protein Kináz G (cGMP-függő protein kináz I)
PLAX	<i>parasternal long axis</i> , paraszternális hosszmetset
SAX	<i>parasternal short axis</i> , rövidtengelyi metszet
Ser	<i>Serine</i> , szerin
SERCA2a	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i> , szarko/endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz 2a pumpa
sGC	<i>soluble guanyl cyclase</i> , szolubilis guanilát-cikláz enzim
SGLT-2	<i>sodium-dependent glucose co-transporter 2</i>
SV	<i>Stroke Volume</i> , verőtérfogat
TAPSE	<i>tricuspid anular plane systolic excursion</i> trikuszipidális anulus szisztolés csúcskitérése
TDI	<i>Tissue Doppler Imaging</i> , szöveti Doppler képalkotás
TTE	transztorakális echokardiográfia
ttkg	testtömegkilogramm
V _{max}	<i>maximal velocity</i> , maximális sebesség
V _{mean}	<i>mean velocity</i> , átlagsebesség

1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben az orvostudomány jelentős eredményeket ért el a kardiovaszkuláris mortalitás csökkentésében, ennek ellenére továbbra is folyamatos az igény a betegségek patomechanizmusának mélyebb megértésére, illetve hatékonyabb gyógyszerek és terápiás eljárások fejlesztésére [1]. A fenti állítás elsősorban Nyugat- és Közép-Európára érvényes, hiszen *globálisan* a szív-érrendszeri megbetegedések miatti halálozás továbbra is növekvő tendenciát mutat, melynek elsősorban demográfiai okai vannak: a népességszám általános növekedése, valamint a társadalmak elöregedése. Ezen befolyásoló tényezőket figyelembe véve sokkal helyesebb megállapításokat tehetünk, ha a statisztikai megfigyeléseket korrigáljuk az életkorra, illetve régiókra. Ekkor látható, hogy sajnos a világ jelentős részén a medicina fejlődési üteme nem tart lépést a fentebb említett demográfiai tényezőkkel. Az iszkémiás szívbetegségek miatti halálozás 1990 óta globálisan 41,7 %-kal nőtt, mely emelkedésért mintegy egynegyed-részt a népességnövekedés, 50 %-ban pedig a társadalmak elöregedése a felelős [2]. Egyedül a magas jövedelemmel rendelkező államokban nem figyelhető meg a fenti tendencia: Nyugat- és Közép-Európa országaiban, Kanadában és Japánban az életkor-specifikus szív-érrendszeri mortalitás stagnál, vagy kismértékben csökken, azonban a demográfiai húzóerőket ezekben az esetekben is sokkal inkább a prevenció fejlődése és az egészségtudatosabb életmódra való áttérés ellensúlyozza, semmint a gyógyító medicina ezen részterületének fejlődése. A megelőzés meghatározó elemei a dohányfüst-expozíció csökkenése, a tudatosabb táplálkozás, a kardio-metabolikus rizikótényezők sikeres csökkentése, valamint a fejlettebb diagnosztika, és a betegségek kombinatív kezelésében elért eredmények. Ugyanakkor azonban, a „klasszikus” értelemben vett gyógyszerkutatás- és törzskönyvezés kissé háttérbe szorult az elmúlt két évtizedben [2]. 2000 és 2009 között például 33 %-kal csökkent az FDA által engedélyezett kardiovaszkuláris terápiák száma az azt megelőző évtizedhez viszonyítva, és hasonló trend figyelhető meg az új, originális molekulák (NME: *new molecular entities*) felfedezésében is [3]. A korai fázisú gyógyszerfejlesztésben a szív-érrendszert célzó kutatások jelentős hátrányban vannak pl. az antineopláziás szerekhez képest, és ez a terápiás terület szenvedte a legnagyobb csökkenést az új évezredben.

Ennek okai között számos, igen különböző eredetű tényezőt sorolhatunk fel. Egyik ilyen ok az egyre magasabb fejlesztési költségek, a reguláció szigorítása, és a klinikai vizsgálatokban elvárt hatalmas betegszám miatt a kiadások növekedése, valamint a lassú megtérüléstől való félelem a befektetők és a fejlesztők részéről. Több új terápia nem is feltétlenül hatékonyságbeli

vagy biztonságossági problémák miatt akad el az engedélyeztetési folyamatban, hanem a költségek emelkedése és a megtérülés várható hiánya miatt, ugyanis a fejlett piaci előrejelzési módszereknek köszönhetően ezekben az esetekben a gyógyszeripari cégek - stratégiai okokból - lemondanak bizonyos gyógyszerjelöltekről [3].

További - e dolgozat témájához sokkal közelebb álló - okként pedig azt élettani sajátosságot említhetjük, mely szerint a kardiovaszkuláris megbetegedések többsége multifaktoriális meghatározottságú, ezen a terápiás területen sokkal nehezebb genetikai, vagy rendszerbiológiai megközelítést alkalmazni a molekuláris célpontok megtalálásához, összehasonlítva például a daganatos megbetegedésekkel. Amíg - szerencsére - az onkológiai kutatásokban folyamatosan sikerül egy-egy jól meghatározott génmutációhoz társítani egy adott betegséget, és azt specifikusan *targetálni*, a szív-érrendszeri kórképek patomechanizmusa gyakran több jelátviteli út zavarán és a rizikófaktorok együttes fennállásán alapul. Ez a sajátosság nehezíti új terápiás célpontok, jelátviteli mechanizmusok, enzimfehérjék célpontként való azonosítását, illetve a hipotézisek tesztelését. A fenti megállapítások számszerűsíthetők is: 2008-ban csupán egy, míg 2009-ben összesen két új szív-érrendszeri gyógyszermolekulát engedélyezett az FDA, míg daganat-ellenes szerből csak 2009-ben 7-et [4]. Míg 1990-ben a klinikai III. fázisba eljutott gyógyszerek 21 %-a kardiovaszkuláris gyógyszerjelölt volt, addig 2012-ben ez az arány 7 %-ra csökkent [5].

Az utóbbi évtized eredményeit tekintve természetesen néhány ellenpéldát is állíthatunk. A PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) enzim felfedezése és gátlószereinek kifejlesztése az „egy gén-egy terápiás célpont” elv kitűnő példája az anti-hiperlipidémiás terápiák területén, több, ilyen hatású gyógyszerjelölt jelenleg klinikai II-III fázisban tart [6]. A nátriuretikus peptid szignalizációs útvonal tagjai közül jelenleg a *neprilysin* enzim gátlása (*sacubitril*) kecsegtet klinikai sikerrel a szívelégtelenség kezelésében, ahogyan az a PARADIGM-HF vizsgálat eredményeiből látható [7]. Az *istaroxime* célpontja a SERCA2a (szarko/endoplazmatikus retikulum ATPáz) pumpa, melynek aktiválásával a vegyület javítja a szívizom relaxációját, így a jövőben szívelégtelenségre ható gyógyszerré fejleszthetik [8]. A szokatlan hatásmechanizmussal bíró, miozin-aktivátor *omecamtiv mecarbil* klinikai III. fázisban tart szisztolés elégtelenség indikációjában [9]. Más terápiás területekről átkerülő, pleiotróp hatású gyógyszerek alkalmazása is intenzív kutatás tárgya: az SGLT-2 gátló antidiabetikum, az *empagliflozin* csökkenti a szívelégtelenség miatt bekövetkező mortalitást (EMPA-REG OUTCOME vizsgálat), javítja a diasztolés funkciót, így ígéretes jelölt a - jelenleg specifikus terápia nélkül álló - diasztolés szívelégtelenség kezelésére [10].

Több, fent említett vizsgálathoz magyar kutatók is jelentősen hozzájárultak, hiszen hazánkban nagy hagyománya van az originális gyógyszerfejlesztésnek, illetve a kardiológiai témájú kutatásoknak is. Szomorú tény azonban, hogy a magyar lakosság – általános egészségi állapotát tekintve – sajnos rá is szorul a szív-érrendszeri megbetegedéseket célzó terápiás lehetőségekre. Ezen kórképek és szövődményeik a legjelentősebb életminőséget rontó nem-fertőző betegségek közé tartoznak, különösképpen az idősebb korosztályokban. Hazánk nem csak a születéskor várható élettartamban, hanem a 65 év felett várható egészséges életevek (HLY) számát tekintve jóval az európai átlag alatt teljesít, így – a daganatos megbetegedések mellett – a szív-érrendszeri betegségekkel kapcsolatos megelőző- és gyógyító tevékenységek kiemelt figyelmet érdemelnek [11].

A kardiovaszkuláris rendszert célzó terápiák fejlesztésével napjainkban talán nem is az élettartam meghosszabbítása lehet az elsődleges cél és előny, hanem az egészségesen, aktívan eltöltött évek arányának növelése, így hozzájárulva a társadalmi-gazdasági-, valamint a családi-gondozói tehervállalás csökkentéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A kardiális diszfunkció és a szívelégtelenség etiológiája

A szív egy autonóm, ingerképző- és vezető sejtekből, valamint kardiomiocitákból felépülő, fáradhatatlanul működni képes izompumpa. (Érdekességképpen: egy emberöltő alatt mintegy 3 000 000 000-szor húzódik össze, ezalatt 1 000 000 000 liternyi vért mozgat meg, és az általa kifejtett energiával ($3,6 \cdot 10^6$ kJ) 16 elefántot lehetne felemelni a Fuji csúcsára [12]). A szív szisztolés (pumpa-), vagy diasztolés (elernyedési) funkcióinak károsodása a szövetek perfúziójának elégtelenségét okozza, mely igen rossz prognózisú megbetegedéshez, a szívelégtelenséghez vezet.

A *szívelégtelenség* egy klinikai szindróma, melyet tipikusan olyan szubjektív tünetek mint a légszomj, fáradtság-érzés és lábdagadás, valamint olyan diagnosztikus jelek mint a megnövekedett juguláris vénás nyomás, perifériás ödéma és pulmonális zörejek jellemeznek [13]. A szívelégtelenség oka a szívizom strukturális/funkcionális abnormalitása, mely a kompenzáló mechanizmusok kimerülése után a perctérfogat csökkenéséhez, illetve emelkedett szívüregi nyomásokhoz vezet fizikai terhelés hatására, vagy akár nyugalomban is (kardiális dekompenzáció) [13]. Ez, a hatályos iránymutatások által használt definíció csak a klinikai tünetek fennállásakor alkalmazható, azonban már jóval a panaszok megjelenése előtt - szisztémásan még tünetmentes - kardiális funkciózavarok, vagy strukturális elváltozások jelenhetnek meg (diasztolés vagy szisztolés *kardiális diszfunkció*), melyek a szívelégtelenség prekursorai. A bal kamrai (BK) diszfunkció rossz prognózisú, de korai felismeréssel és beavatkozással szívelégtelenséggé alakulása, így közvetetten a mortalitása is jelentősen csökkenthető. Terminológiai szempontból tehát a szívelégtelenség maga a klinikai következményt jelenti, míg a kardiális diszfunkció a mögöttes funkcionális elváltozásra utal, mely már a szívelégtelenség tüneteinek megjelenése előtt fennáll [14]. A kamrai diszfunkción kívül billentyűbetegségek, ritmus-zavarok, illetve egyéb kórképek is okozhatnak klinikailag manifest szívelégtelenséget (1. táblázat).

A miokardium elváltozásai	
Iszkémiás szívbetegség	<u>Hegesedés</u> Miokardiális hibernáció Epicardiális koronária-betegség (CAD) Abnormális koronária mikrocirkuláció <u>Endothel-diszfunkció</u>
Toxikus ártalom	Rekreációs droghasználat Nehézfémek Gyógyszerek Sugárzás
Immun-mediált és gyulladásos ártalmak	Fertőzések Egyéb, nem-fertőzőes betegségek
Infiltráció	Malignus elváltozáshoz kapcsolódó Nem-malignus (pl. tárolási betegségek)
Metabolikus okok	Hormonális (<u>diabétesz</u> , Addison-kór, dtb.) Táplálkozás okok (malnutríció, obezitás)
Genetikai abnormalitások	Kardiomiopátiák, izomdisztrófiák
Abnormális telődés	
Hipertenzió	
Strukturális miokardium- és billentyűbetegség	Szerzett Veleszületett (szeptumdefektusok)
Perikardiális és endomiokardiális elváltozás	Perikardiális ok (perikarditisz, effúzió) Endomiokardiális okok
„High-output” Volumenterhelés	Pl. anémia, szepszis, fistula, terhesség Pl. veseelégtelenség
Aritmiák	
Tahiaritmiák	Pl. pitvari- vagy kamrai aritmiák
Bradiaritmiák	Pl. szinuszcsomó betegség, vezetési zavarok

1. táblázat. A szívelégtelenség etiológiája. Átvéve és lefordítva az ESC 2016 Guideline-jából [13]. Aláhúzva találhatók a leggyakoribb kiváltó okok.

A szívelégtelenség klasszifikációja és terminológiája folyamatosan alakul és fejlődik. A legtipikusabb osztályozás az ejekciós frakció (EF) mérésén alapul. Az EF 50% fölötti értékénél „megőrzött”, 40% alatt pedig „csökkent” ejekciós frakciójú szívelégtelenségről (HFpEF és HFrEF) beszélünk, a köztes zóna az ún. „mid-range” ejekciós frakciójú szívelégtelenség (HFmrEF). A csökkent EF-fel járó formát régebben szisztolés elégtelenségnek nevezték, míg a megőrzött ejekciós frakciójú, de a szívelégtelenség egyéb tüneteit mutató betegeket diasztolés szívelégtelenségnek tekintették, de ez a terminológia mára túlhaladott, hiszen szisztolés

elégtelenségben is fennállhat diasztolés funkciózavar, és vice versa. Időbeli lefolyás alapján használatosak voltak még az „akut és krónikus”, illetve a tünetek progressziójával a „dekompenzált és kongesztív” kifejezések is. A New York Heart Association (NYHA) a tünetek és a terheléses intolerancia alapján csoportosít, míg az American College of Cardiology/American Heart Association (ACCF/AHA) szervezetek iránymutatása a tünetek és a strukturális elváltozások alapján osztályozza a szívelégtelenség súlyosságát [14] (2. táblázat).

ACCF/AHA	NYHA
A: magas kockázat, strukturális elváltozások és tünetek nélkül	
B: strukturális szívbetegség, a szívelégtelenség tünetei nélkül	I: a fizikai aktivitás megtartott, a normál testmozgás nem okoz tüneteket
C: strukturális szívbetegség, a szívelégtelenség korábbi vagy jelenleg fennálló tüneteivel	<i>I: a fizikai aktivitás megtartott, a normál testmozgás nem okoz tüneteket</i>
	II: enyhén limitált fizikai aktivitás. Nyugalomban tünetmentes, de a szokásos terhelés a tünetek megjelenését okozza
	III: Csökkent fizikai aktivitás. Nyugalomban tünetmentes, de már kisebb fizikai aktivitás is a tünetek megjelenésével jár
	IV: Képtelen fizikai aktivitásra a szívelégtelenség tüneteinek megjelenése nélkül, vagy a szívelégtelenség tünete már nyugalomban is fennállnak
D: refrakter szívelégtelenség, mely speciális beavatkozást igényel	<i>IV: Képtelen fizikai aktivitásra a szívelégtelenség tüneteinek megjelenése nélkül, vagy a szívelégtelenség tünete már nyugalomban is fennállnak</i>

2. táblázat. A szívelégtelenség súlyosságának osztályozása az AHA és NYHA szervezetek szerint. Átvéve az ACC/AHA 2013 Guideline-jából [14].

A szívelégtelenség becsült prevalenciája a felnőtt populációban 1-2% körüli (~38 millió páciens), mortalitása igen magas, a 10 éves túlélés mindössze 10 % [15, 16]. A szívelégtelenség előfordulására vonatkozó becslések azonban kevésbé megbízhatóak, ugyanis az adatok többnyire a magas jövedelmű régiókból származnak, illetve függenek az alkalmazott diagnosztikai kritériumoktól is [15]. Bizonyos populációkban a szívelégtelenség prevalenciája stagnál, de ez elsősorban a primer prevenció fejlődésének köszönhető, az ateroszklerózis és iszkémiás szívbetegség mint legfőbb rizikófaktorok tekintetében. A szívelégtelenség

prognózisa nagyban függ a klinikai megjelenéstől, illetve a kiváltó okoktól, etiológiától. A dolgozat témája kapcsán a miokardiális károsodást és kardiális diszfunkciót kiváltó két kórállapotot, a diabéteszes kardiomiopátiát és az iszkémiás szívbetegséget részletesebben, külön fejezetben tárgyaljuk. Ez a két kórkép – a hipertónia mellett - a szívelégtelenség legfőbb rizikófaktorai és előidézője, így népegészségügyi jelentőségük hatalmas [13, 14].

2.1.1. A diabéteszes kardiomiopátia

A diabétesz mellitusz (DM, a továbbiakban: diabétesz) a szívelégtelenség kialakulásának meghatározó kockázati tényezője, függetlenül az életkortól, a fennálló hipertóniától és koronária-betegségtől [14]. A diabéteszes betegek (világszerte mintegy 420 millió) 50-70%-a végül valamilyen kardiovaszkuláris szövődmény miatt hal meg [17]. A diabétesz incidenciájának növekedésével a kardiovaszkuláris szövődmények előfordulása is világszerte növekvő tendenciát mutat [18]. Habár a megfelelő glükóz-kontroll csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót, a szív-érrendszeri megbetegedések előfordulása magasabb a diabéteszes populációban, és mintegy 2-5-szörös a szívelégtelenség kockázata [19, 20]. Az inzulin-rezisztencia önmagában, manifeszt diabétesz nélkül is rizikót jelent, a glikált hemoglobin (HbA1c) 10,5 % feletti értéke 4-szeres kockázatot hordoz a szívelégtelenség kialakulására. Definíció-szerűen a diabéteszes kardiomiopátia (DKM) olyan bal kamrai diszfunkció, mely az egyéb rizikófaktoroktól függetlenül alakul ki cukorbetegségben, és leggyakrabban diasztolés diszfunkcióval és szívizom-hipertrófiával jár, illetve előrehaladott állapotban szisztolés funkcióromlás is kíséri [21].

A DKM patofiziológiájához számos körülmény hozzájárul, úgymint metabolikus eltérések, autonóm idegrendszeri károsodás, inflammáció és oxidatív stressz. Az elérhető friss tanulmányok szerint a legfontosabb folyamatok a mitokondriális károsodás, az endoplazmatikus retikulumot ért stressz (ER-stressz) és kalcium-homeosztázis zavarok, melyeket a magas glükózterhelés miatt létrejövő reaktív oxigéngyökök (ROS) és ún. „késői fehérje glikációs végtermékek” (*advanced glycation endproducts*: AGE) okoznak. A glikációs végtermékek a glükóz mint redukáló cukor, és aminosavak reakciójával keletkeznek, az ún. Maillard-reakció során [22]. Ezek a glikációs végtermékek olyan károsodott és reaktív fehérjék, melyek egyrészt biokémiai tulajdonságaik és reakcióképességük miatt, másrészt pedig specifikus receptorok (RAGE-ek) közvetítésével fejtik ki hatásaikat a sejtfolyamtokra. A reaktív fehérje glikációs végtermékek abnormális protein-foldingot és poszt-transzlációs módosulásokat okoznak az endoplazmatikus retikulumban (ER), transzkripciós faktorok és pro-inflammatórikus gének aktiválásával [23]. A szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulumot

(SER) ért stressz a Ca^{2+} -ionokat a retikulumba visszajuttató SERCA2a pumpa aktivitását csökkenti. Ez a folyamat a kardiomiocitákban megnyúlt relaxációs időt okoz, amely globálisan diasztolés funkciózavarban nyilvánul meg, továbbá a miociták apoptózisához is hozzájárul [24]. A SERCA2a pumpa diszfunkcióját számos, diabéteszes állatmodellen végzett tanulmányban igazolták. Továbbá, kísérletes bizonyítékok mellett szólnak, hogy 1-es típusú diabéteszben (T1DM) a miociták apoptózisa és a szisztolés diszfunkció megjelenése prominensebb, míg 2-es típusú cukorbetegségben (T2DM) a patológiás változások hipertrófiában, kamrai merevségben és így diasztolés funkciózavarban nyilvánulnak meg [25]. A glikációs végtermékek az endothel károsításával az artériák falának merevebbé válását okozzák, a romló compliance növeli az ellenállást és az utóterhelést, hozzájárulva a kardiális diszfunkció progressziójához [26, 27].

Az elérhető ismeretek és terápiás ajánlások a diabéteszes, szívelégtelenségben szenvedő páciensek kezelésére vonatkozóan ellentmondásosak. Az iránymutatások szerint a hiperglikémia kontrollálása érdekében minden lehetséges terápiát alkalmazni kell, azonban klinikai evidenciával nincs megerősítve, hogy ez csökkentené a szívelégtelenség kialakulásának kockázatát [13]. A prospektív, randomizált vizsgálatokon alapuló ajánlások hiányának ellenére szakértői konszenzus alapján a hiperglikémia felismerése és befolyásolása esszenciális a szívelégtelenség kialakulásának késleltetésére [14]. A tiazolidén-dion típusú antidiabetikumokkal („glitazon-ok”) történő kezelést összefüggésbe hozták a folyadékretenció kialakulásával, ezért szívelégtelen páciensekben ezen hatóanyagok ellenjavalltak, de megjegyzendő, hogy az inzulin-kezelést is gyanúsítják ilyen hatással (nátrium-retenció következményeként) [28]. Az empagliflozin (SGLT-2 gátló) viszont - meglepetésre – csökkentette a hospitalizációk számát és a szívelégtelenséggel összefüggő mortalitást, ezért jelenleg intenzív kutatás tárgya, és az ajánlásokba is bekerülhet [13]. Egyéb antidiabetikumok mint a metformin (elsőként választandó szer), szulfanil-ureák és GLP-1-analógok (*glucagon-like peptid-1*) hatásosságának és biztonságosságának megítélése még várat magára, továbbá, jelenleg nem áll rendelkezésre specifikus gyógyszer sem a diabéteszes kardiomiopátia, sem a diasztolés funkcióromlás kezelésére [14]. Jelen dolgozatban bemutatásra kerülő egyik publikációnkkal ehhez a problémafelvetéshez is kívánunk csatlakozni.

2.1.2. Az ateroszklerózis talaján kialakuló szívelégtelenség

Az ateroszklerózis következtében kialakuló koronária-artéria betegség (CAD) és iszkémiás szívbetegség (ISZB) a szívelégtelenség leggyakoribb oka és legfőbb rizikófaktor, a

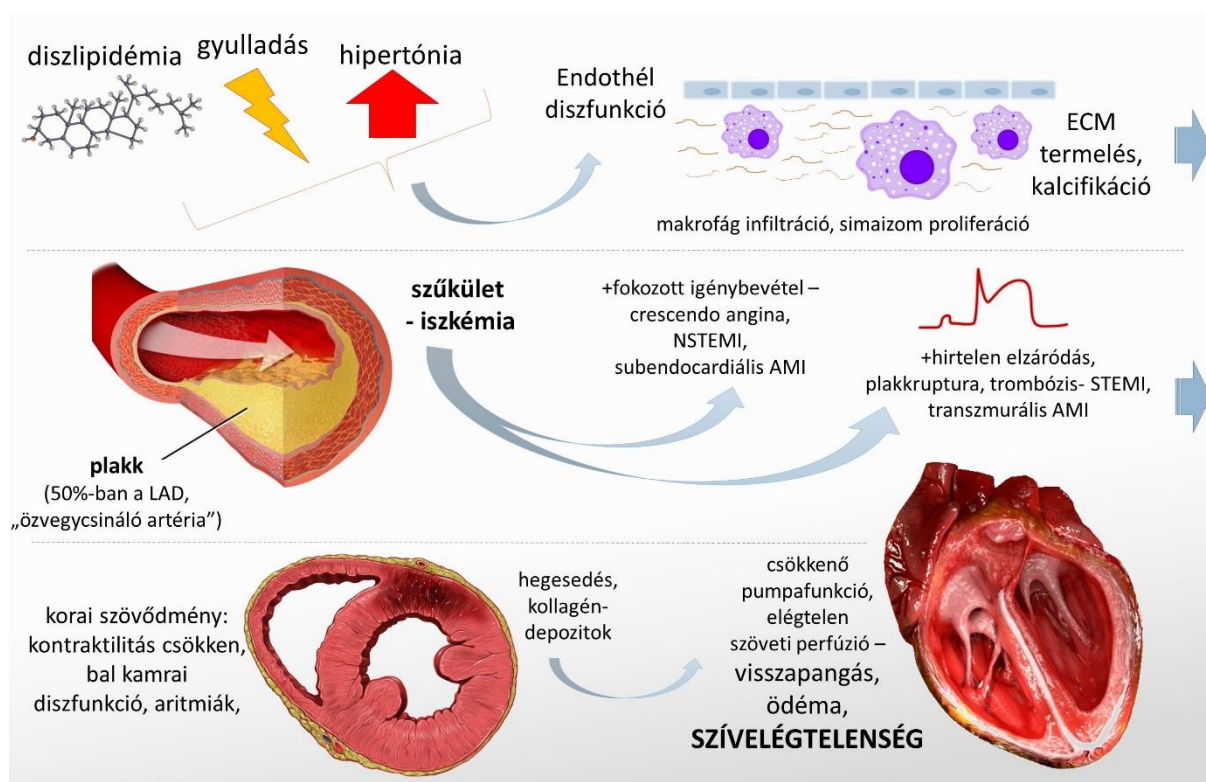
hipertónia mellett. Becslések szerint a szívelégtelenségben szenvedő páciensek 70%-ában koronária-betegség áll fenn, és az esetek legalább 50 %-ában a CAD a szívelégtelenség primer oka [16]. Számos klinikai tanulmány megmutatta, hogy az ateroszklerózis legfőbb rizikófaktorai a diszlipidémia és az emelkedett szérumszintű LDL-koleszterin szint, továbbá bizonyított, hogy a diszlipidémia a szívelégtelenség független kockázati tényezője is [29].

Az ateroszklerózis többféle mechanizmus útján járul hozzá a szívelégtelenség kialakulásához. Legegyértelműbb esetben – 90 %-ban ateroszklerózis által okozott - koronária-szűkület miatt tranziens, majd tartós iszkémia alakul ki az egyes miokardium-szegmensekben. A koronária-artériák krónikus hipoperfúziója már önmagában is megnövekedett kamrai merevséget és diszfunkciót okozhat [30]. A következményes angina pectoris, majd a lezajló akut miokardiális infarktus (AMI) a szívizom bizonyos részeinek nekrozisát okozza. Amennyiben a beteget sikeresen ellátják (stentelés, revaszkularizáció, a perfúzió helyreállítása), az elhalt, regenerálódni képtelen szívizomzat kiterjedésétől függően hegesedés, kardiális diszfunkció, aritmiák, majd – krónikusan - szívelégtelenség fejlődik ki, ugyanis a sérült részek akinetikussá válnak, így nem tudnak részt venni a pumpafunkció fenntartásában. A következményesen kialakuló perzisztáló ritmuszavarok, a kamrai disz-szinkronia, illetve remodeláció tovább súlyosbíthatják a szívelégtelenség progresszióját (1. ábra). Retrospektív analízisek szerint miokardiális infarktus után a páciensek 14-63 %-ában alakul ki valamilyen fokú szívelégtelenség [31, 32]. Paradox módon, az akut infarktus egyre eredményesebb terápiája, és így a túlélők számának növekedése a szívelégtelenség incidenciájának és prevalenciájának növekedését hozza magával [32]. A koronária-betegség következtében kialakult és lezajlott AMI tehát a szívelégtelenség egyik fő oka, azonban a diszlipidémia infarktus nélkül is összefüggésbe hozható a szívelégtelenség kialakulásával. A hosszú távú (1948 óta tartó) Framingham Heart Study adatait számtalan tanulmány elemzi, újabb és újabb bizonyítékokat szolgáltatva a hipertenzív és ateroszklerotikus kardiovaszkuláris betegségek epidemiológiájára vonatkozóan. A kohorsz egyik célzott elemzése alapján megmutatták, hogy a diszlipidémia önmagában, AMI indukálása nélkül is a szívelégtelenség kockázati tényezőjének tekinthető. Az emelkedett szérumszintű koleszterin szint közvetlenül is összefüggésbe hozható a hipertóniával, a megnövekedett érfali merevséggel, illetve az emelkedett bal kamrai tömeggel és falvastagsággal. Aterogén étrenden tartott állatmodellekből származó kísérletes bizonyítékok alapján pedig a hiperkoleszterinémia szisztolés és diasztolés diszfunkciót is okoz [33]. A krónikus iszkémiás szívbetegség vagy iszkémiás kardiomiopátia tulajdonképpen progresszív szívelégtelenség, melyet lokális vérrellátási zavar, infarktus utáni dekompenzáció,

bal kamrai hipertrófia és kamradilatáció jellemez, post-mortem szövettani képe pedig fibrózist, hegesedést és súlyos koronária-ateroszklerózist mutat [34].

A diszlipidémia és a következményes ateroszklerózis az érrendszer alkalmazkodóképességét és vegetatív idegrendszeri szabályozását is károsítja. Az ateroszklerózis és az artériák falának merevebbé válása (*stiffness*) kéz a kézben járó folyamatok. Az ateroszklerózis mellett az életkor, illetve genetikai faktorok is szignifikánsan hozzájárulnak az érfalak merevségének változásaihoz [35]. Az elastikus artériák falának merevebbé válásával csökken az érrendszer tágulékonyága, nő a szív utóterhelése (*afterload*). A érfalak merevsége így hozzájárul a szisztolés és diasztolés szívfunkciók romlásához, a megnövekedett *stiffness* pedig a kardiovaszkuláris történések, valamint a mortalitás prediktora [36, 37].

A patológiás folyamatok mélyebb felderítése az ateroszklerózis, diabétesz vagy egyéb okok által okozott endothel-diszfunkció, valamint a ciklikus guanozin-monofoszfát - Protein Kináz G (cGMP-PKG) rendszer jelentőségére mutatott rá, mely részletesen, a jelátviteli útvonalak bemutatásával külön fejezetben (2.2.) kerül tárgyalásra.



1. ábra. Az endothel-diszfunkció, az ateroszklerózis és a szívelégtelenség kapcsolata. (ECM: extracelluláris mátrix; LAD: bal elülső leszálló koronária; STEMI: ST-elevációval járó miokardiális infarktus; NSTEMI: nem-ST-elevációs miokardiális infarktus; AMI: akut miokardiális infarktus)

2.2. A szívelégtelenség molekuláris patológiai háttere

A szívelégtelenségben lejátszódó sejtbiológiai folyamatok molekuláris patológia okainak mélyebb megismerése intenzív kutatás tárgya. A legjobban felderített területek a (1) miokardiális hipertrófiáért és remodelációért felelős szignalizációs útvonalak, a (2) gyulladásos kaszkádok, valamint a (3) mitokondriális diszfunkció és a (4) sejthalál (apoptózis, nekrosis, autofágia) mechanizmusai. A kiváltó okok és ezáltal a lehetséges terápiás célpontok között az utóbbi 5-7 évben a fókusz a Protein Kináz G rendszerre helyeződött (5), mely a jól ismert endothel-funkciót szabályozó szerepén felül a szívelégtelenség patofiziológiájában is meghatározó tényező lehet [38].

Az utóbbi évtizedben közelebb kerültünk az adaptív, illetve a maladaptív *hipertrófia* mechanizmusainak megértéséhez, melyek extra- és intracelluláris faktorok széles tárházát felvonultatják. A kompenzáló mechanizmusok mögött rejlő, adaptív szívizom-hipertrófia összefüggésben áll az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (IGFR-1), interleukin-6 (IL-6) és egyéb citokinek, glikoproteinek expressziójával, ezen felül a biomechanikai, feszülést érzékelő receptorok jelátvitelével, továbbá a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) - protein kináz B (Akt) - glikogén-szintáz kináz 3 β (GSK3 β), valamint a *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3) transzkripciós faktor és az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) aktivitásával. Ezen jelátviteli útvonalak fokozott működése és túlexpresszáltága hozzájárul a kardiomiociták méretnövekedéséhez és a koncentrikus hipertrófia kialakulásához, de fibrózis nélkül, így pedig - mivel szisztolés funkció megőrzött marad – az adaptív hipertrófia válasz közvetítéséhez.

Ezzel szemben a maladaptív hipertrófia, melyet fibrózis és apoptózis kísér, inkább az angiotenzin II, a tumor-nekrosis faktor- α (TNF- α) és a katekolaminok által kiváltott, a c-JUN N-terminális kináz (JNK) és a p38 kináz által közvetített szignalizációhoz köthető [39]. Az ellentétes, protektív anti-hipertrófia jelátvitelben pedig a natriuretikus peptidek (NP-k) és nitrogén-monoxid (NO) által aktivált ciklikus guanozin-monofoszfát-Protein Kináz G (cGMP-PKG) útvonal szerepe bizonyított (ld. alább).

A *fibrózis* tulajdonképpen a gyulladás és az apoptózis eredő hatása miatt jön létre. A felszaporodó extracelluláris mátrix-alkotók, az I-es és III-mas típusú kollagén a szívüregek falainak növekedő merevségét okozzák, csökkentik az elaszticitást, rontják a diasztológiát, továbbá vezetési zavarokat is indukálhatnak. A mögöttes mechanizmusok között a mátrix metalloproteináz enzimek (MMP-k) fokozott aktivitása, ezek gátlóinak (*tissue inhibitors of metalloproteinase*, TIMP) csökkent működése, a profibrotikus *transforming growth factor- β*

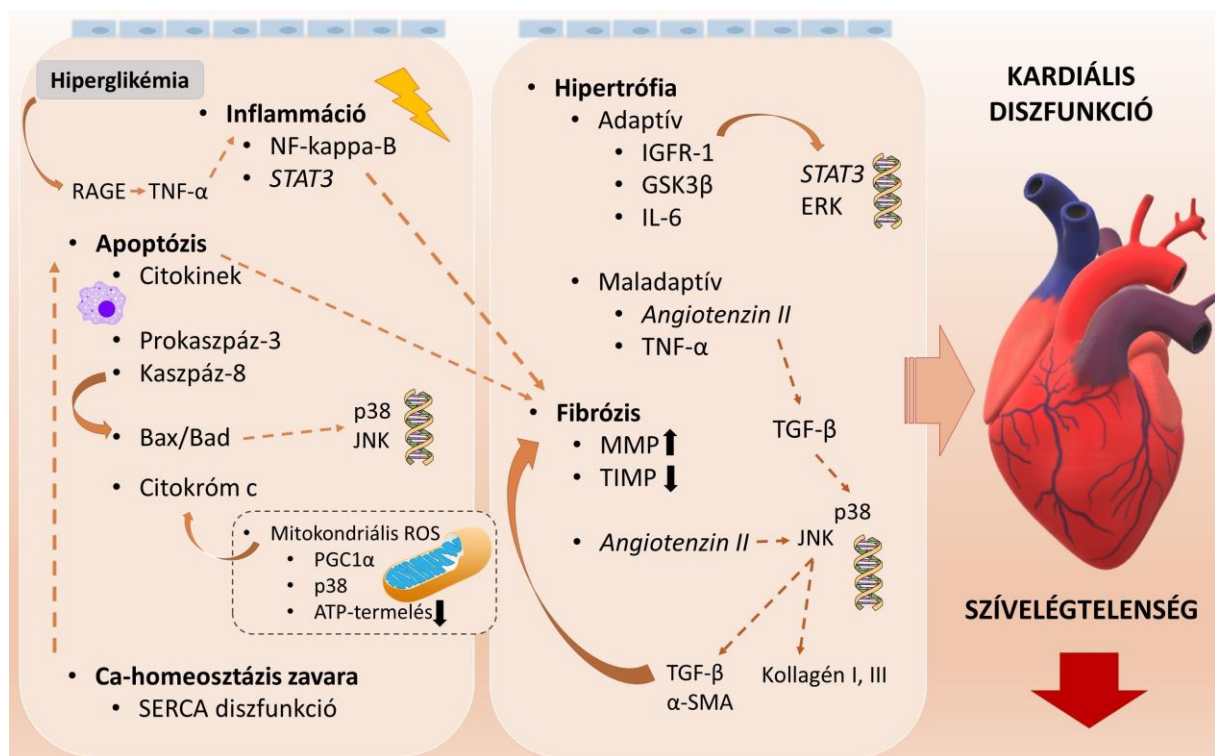
(TGF- β), alfa-simaizom-aktin (α -SMA), és vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) stimulációja, illetve különböző citokinek túlprodukciója említhető. Molekuláris szempontból a már említett renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) aktivációja (az AT II ismert profibrotikus mediátor), valamint JNK és p38 kinázok megnövekedett aktivitása áll a mátrix depozíció mögött [38]. A proinflammatorikus válasz az NF-kappa B transzkripció faktor, illetve a TNF-alfa és IL-1 β citokinek közreműködésével jön létre, melyek indukálásában nagy szerepe van a már említett RAGE receptoroknak, ez pedig részben magyarázza a diabétesz szívelégtelenséget indukáló hatását. Ezt a tényt kísérletesen egérmodellen is bizonyították, a RAGE receptorok delécióját követően csökkent az inflammáció, a fibrózis értéke, és javult a szisztolés funkció [40].

A szignalizációs útvonalak összefonódását (*cross-talk*) mutatja, hogy a hipertrófia mechanizmusainál megismert NF-kappa-B és STAT3 transzkripció faktorok játszanak központi szerepet a proinflammatorikus jelátvitelben és az *inflammációt* okozó mediátorok termelésében is. A krónikus gyulladás során felszabaduló citokinek (interleukinek: IL-6, IL-1 β) a SERCA2a pumpa expresszióját csökkentik a kardiomiocitákban, így közvetlenül is rontják a szívizom kontrakciós-relaxációs tulajdonságait pl. diabéteszes kardiomiopátiában [41, 42]. A gyulladás csökkenti a miociták ATP és foszfokreatin koncentrációját, és befolyásolja a mitokondriális metabolizmust.

A *mitokondriális* ROS felszaporodása (gyulladás, AT II, illetve csökkent p38 kináz expresszió miatt) sejtkárosodást okoz, így hozzájárul a fibrózis és a hipertrófia, valamint a bal kamrai dilatáció és remodeláció létrejöttéhez. Szívelégtelenség során mind a mitokondriumok biogenezeise, mind azok funkciója sérül, főképp a neurohormonális aktiváció, ROS-túlprodukció és a gyulladásos citokinek hatásai miatt. A mitokondriális funkció bifázikusan változik, először nő, majd, ahogyan az adaptív hipertrófia szívelégtelenséggé alakul, az energiatermelés is csökken. Ezt a mintázatot alátámasztja a mitokondriális biogenezis fő regulátorának, a PGC1 α expressziójának változása is. Ezt megerősíti az a kísérletes bizonyíték, hogy PGC1 α -hiányos egerekben sokkal korábban alakul ki a szívelégtelenség megnövelt utóterhelés hatására [43]. Az elektrontranszport-lánc tagjainak csökkenő expresszióját az oxidatív foszforiláció elégtelensége kíséri, a csökkent ATP-termelés pedig hozzájárul a szívizom energia-deficitjéhez és mechanikai diszfunkciójához [44]. Ez különösen igaz inzulin-rezisztencia esetén, ahol a szívizomsejtek továbbra is kénytelenek a zsírsavak béta-oxidációjával előállítani az energiát (nincs metabolikus *shift*), amely viszont több oxigént igényel, így ördögi kört hozva létre [45]. A kardiomiociták lassú, de perzisztáló *apoptózisát* (0,08-0,25%, az egészséges 0,001%-hoz képest) a ROS túlprodukció, citokin-hatás, illetve

mitokondriális károsodás válthatja ki [39]. A különböző sejtfelszíni „halálreceptorok” (Fas/FasL) a kaszpáz-8 és a prokaspáz-3 közvetítésével pro-apototikus effektor fehérjéket (Bax, Bad) aktiválnak, valamint citokróm c-t szabadítanak fel a mitokondriumokból, amely szintén apoptózis útvonalat iniciál [39]. A folyamatban G-protein kapcsolt receptorok is részt vesznek, melyek effektorai a már említett p38, JNK és PKC kinázok, valamint a CAMKII, amely összekötő elemként mind a ROS termelésben, mind a diszregulált kalcium-homeosztázisban részt vesz. A felborult kalcium-anyagcsere így mind az apoptózis, mind a fentebb leírt SERCA2a pumpa közvetítésével járul hozzá a diasztolés- és szisztolés funkciózavarokhoz (2. ábra) [38].

A diabéteszes kardiomiopátia patofiziológiáját tekintve, fentebb leírt folyamatok közül az inzulin-rezisztencia és a diabétesz elsősorban ROS (és AGE) túlprodukciót, oxidatív stresszt, valamint NF-kappa-B-mediált gyulladást okoznak, mely folyamatok endothel-károsodásban, fibrózisban, mitokondriális diszfunkcióban és a kalcium-homeosztázis zavarában (SERCA2a funkcióromlás) nyilvánulnak meg [41, 46].



2. ábra. A szívelégtelenség molekuláris patológiai hátterében álló folyamatok és jelátvivő anyagok kapcsolata. (A rövidítések magyarázata a szövegben található.)

A cGMP-PKG szignáltranszdukciós útvonal szerepe

Ahogy fentebb említésre került, az utóbbi évtized tanulmányai alapján az endothel-diszfunkció és a cGMP-PKG rendszer szerepe hangsúlyosnak tűnik a kardiális diszfunkció patomechanizmusában (3. ábra). A cGMP-PKG szignalizációs kaszkád kardioprotektív útvonalak aktivitását növeli, így farmakológiai befolyásolása terápiás lehetőségeket kínál [47]. A kulcsszerepet betöltő cGMP két különböző rendszeren keresztül generálódhat: (1) nitrogén-monoxid (NO) hatására a szolubilis guanilát-cikláz (sGC) útvonalon (endothel-sejtek); illetve (2) natriuretikus peptidek hatására a partikuláris guanilát-cikláz (pGC) enzim által [48].

Az egysejtrétegű vaszkuláris endothelium a betöltött barrier-funkcióján kívül egyben egy fontos, homeosztatikus regulációt végző szerv is (nagysága emberben kb. 3 m², tömege 1 kg), mely meghatározó szerepet tölt be a véralvadás, vese- és májműködés, immunrendszer és természetesen a kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában [49]. Az endothelben termelődő legfontosabb effektor molekula, a nitrogén-monoxid (NO) gáz-transzmitter az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) enzim által, L-argininből szintetizálódik. Az endothelben a NO gátolja fehérvérsejtek adhézióját, csökkenti a gyulladásos választ, ezáltal az ateroszklerózist (ennek korai fázisában legelőször az endothel-diszfunkció jelenik meg). Az érfal simaizom-sejtjeibe diffundálva a NO az sGC aktiválásával cGMP-t generál, mely a Protein Kináz G enzim (PKG, vagy más néven: cGMP-függő protein kináz I, cGKI) aktiválásával vazorelaxációt okoz. Ennek mechanizmusa, hogy a PKG egy specifikus fehérje foszforilálásával gátolja az endoplazmatikus retikulumból történő Ca²⁺-felszabadulást, ezáltal a miozin könnyű lánc kinázt (MLCK), így végül a vazokonstriktort. A NO bioelérhetőségének csökkenése (pl. ateroszklerózis, ROS-termelődés miatt) így protrombotikus, proinflammatorikus, és vazokonstriktor folyamatokban manifesztálódik, mely fenotípusos változásokat összefoglalóan gyakran „endothel-diszfunkció”-nak neveznek [50]. A szomszédos endothel-sejtekből a NO a kardiomiocitákba diffundálva a szívfunkciók modulálásában is részt vesz. Az ateroszklerózis, diabétesz és obesitas által generált gyulladásos folyamatok csökkent NO-szintézist és PKG-aktivitást okoznak, mely hozzájárul a miociták megnövekedett nyugalmi feszüléséhez és a kamrafal merevségéhez, valamint az intersticiális fibrózis, és végül a diasztolés diszfunkció kialakulásához [51].

A cGMP a kardiovaszkuláris rendszerben az eNOS útvonal mellett natriuretikus peptidek hatására is szintetizálódhat 5'-GTP-ből. A pitvari (ANP), B-típusú (BNP) és C-típusú (CNP) natriuretikus peptidek a partikuláris guanilát-cikláz-kapcsolt GC-A és GC-B receptorokon keresztül, a cGMP-szint emelésével fejtik ki hatásaikat. Az ANP és BNP nyomás-

vagy volumenterhelés hatására létrejövő mechanikai megnyúlás útján szabadulnak fel, míg a CNP-t az endothel szintetizálja [48]. A natriuretikus peptidek érfali simaizom-relaxációt, vazodilatációt, megnövekedett vaszkuláris permeabilitást, növekvő glomerulus-filtrációt, a RAAS-gátlást, valamint diurézist váltanak ki [52].

A fentiek alapján látható, hogy a cGMP-PKG rendszer bármelyik útvonalon (NO vagy NP) történő aktiválása vazodilatatív és vaszkulo-protektív hatásokat közvetít, amely már önmagában kedvező a szívimra mind iszkémiás, mind nyomás-vagy volumenterhelt állapotokban. E dolgozat szempontjából a legfontosabb tény azonban az, hogy a kedvező vaszkuláris hatások mellett az utóbbi évek kutatásai kiemelik és megerősítik a cGMP-PKG rendszer direkt miokardiális anti-remodellációs és diasztológiát befolyásoló szerepét [47, 53].

A PKG két izoformája (I és II) közül a kardiovaszkuláris rendszerben a PKGI (α és β splice-variáns) expresszálódik, főként a érfali simaizomsejtekben, az endothelben, fibroblasztokban és a kardiomiocitákban. Izolált sejteken, in vitro körülmények között a PKG stimulálása (NO-cGMP vagy NP-cGMP útján) gátolja a noradrenalin/angiotenzin II által kiváltott hipertrófiát és remodellációt. *In vivo* kísérletek során bizonyították, hogy a NOS deléciója hipertóniát, szívim hipertrófiát, apoptózist és fibrózist okoz [54]. Az oxidatív stressz, különösen nyomásterheléssel kombinálva hasonló hatásokat produkál. Ugyanez a helyzet, ha az útvonal másik kiindulópontját, a natriuretikus peptidek hatását közvetítő GC-A-t gátoljuk, ugyanis GC-A knockout egerekben hipertónia, bal kamrai hipertrófia és hirtelen szívhalál jelenik meg [55]. A mögöttes mechanizmusok olyan effektorok (főként transzkripciós faktorok) szerepét sugallják, mint a *transient receptor potential cation 6 channel* (TRPC6) és a *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) [53]. NO-donorokkal (*nitroprussid*), sGC-aktivátorokkal (*cinaciguat*), szintetikus NP-ekkel (*carperitide*, *nesiritide*), PDE-gátlókkal (*szildenafil*) és neprilysin-inhibitorokkal (*sacubitril*) végzett állatkísérletes és klinikai vizsgálatok megerősítik a cGMP-PKG rendszer anti-remodellációs hatását és terápiás kiaknázásának lehetőségét a szívelégtelenség különböző formáiban [53].

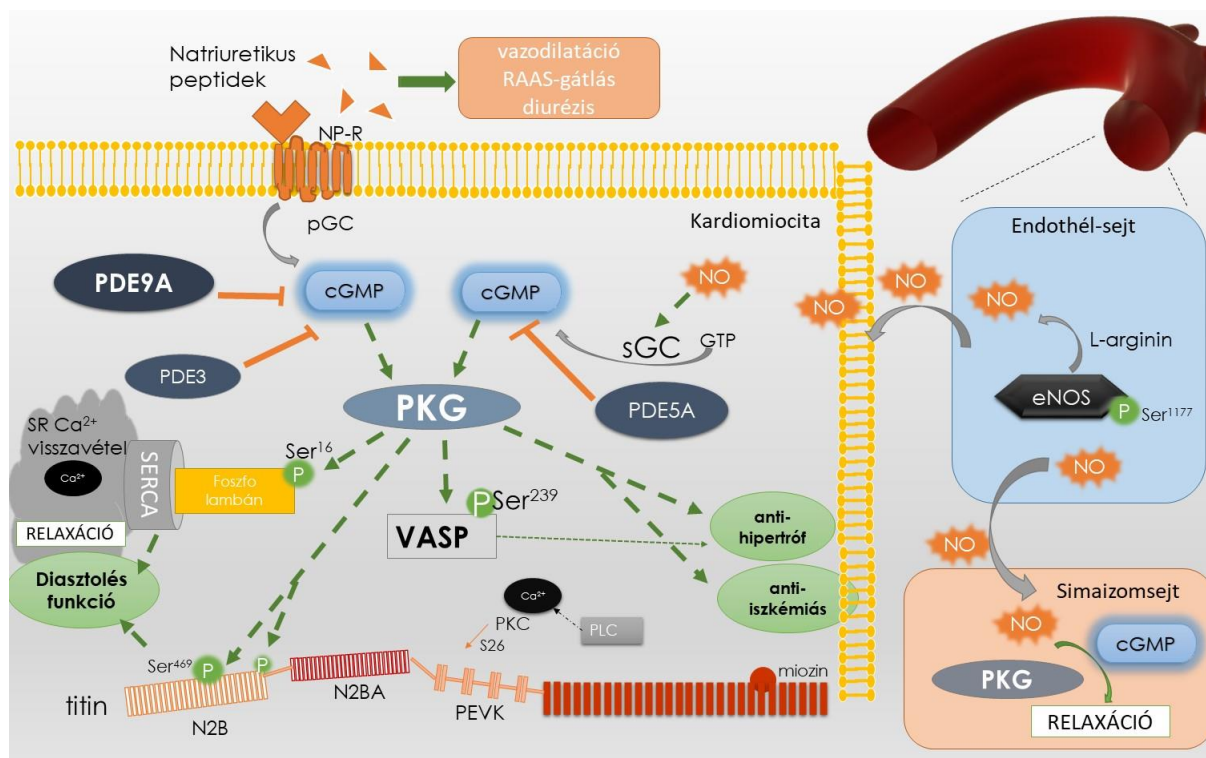
A PKG foszforilációs célpontjai a hipertrófia gátlásán kívül egyéb, főként a szívim *relaxációját* meghatározó folyamatokban is részt vesznek. A vazodilatátor-stimulált foszfoprotein (VASP) egy unikális PKG target, amely sejtmigrációban, sejt-sejt adhéziós kölcsönhatásokban és kamrai remodellációban is részt vesz; a protein hipo- és hiperaktivációja egyaránt patológiás változásokat okoz [56]. (Megjegyzés: a kísérletes farmakológiában a VASP fehérje jelentőségét az a tény adja, hogy a Ser239-es aminosav reziduumán a PKG foszforilálja, így a foszfo-VASP (pVASP) mennyiségéből indirekten a PKG enzim aktivitását lehet meghatározni [57]). A PKG diasztológiát befolyásoló hatásai közül kiemelendő a *titin*

óriásprotein (3000-3700 kDa) szerepe, mely „erőmérőként”, illetve, mintegy „rugóként” működve meghatározza a miociták passzív feszülését, relaxációját, ezáltal pedig a globális diasztolés funkciót is [58]. A titin „rugalmassága” kiemelt régióinak foszforilációs állapotától függ. A PKG a titin N2-bus régiójában található specifikus aminosavak foszforilálásával befolyásolja a fehérje elaszticitását, ezáltal csökkenti a miofibrillumok passzív feszülését, merevségét (*titin-based stiffness*) [59]. Igen rangos folyóirat hasábjain megjelent tanulmány bizonyította, hogy diasztolés szívelégtelen (HFpEF) páciensek miokardiumában csökkent a cGMP szintje és a PKG enzim aktivitása (a VASP foszforilációja), ezáltal pedig megnövekedett a humán betegekből izolált kardiomiociták passzív feszülése, merevsége [47].

Az elernyedési funkciók másik meghatározó tényezője a már több ízben említett SERCA2a pumpa, mely a Ca^{2+} ionokat juttatja vissza – óriási hatásfokkal - a szarkoplazmatikus retikulumba a diasztolés során [60]. A SERCA pumpa a foszfolambán (PLB) fehérje gátló hatása alatt áll; a szabályzás alapja pedig, hogy a PLB foszforilálódása annak leválását okozza a SERCA-ról, így szabaddá téve működését [61]. Evidencia, hogy béta-adrenerg stimuláció hatására a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP)-függő Protein Kináz A (PKA) aktivációja - a PLB foszforilálásával - megnöveli a SERCA pumpa funkcióját (pozitív luzitropia) [62]. Ugyanakkor bizonyított az is, hogy a cGMP-PKG rendszer aktiválása ugyanezt a mechanizmust indítja el, vagyis a PKG enzim is képes a PLB foszforilálására, így a SERCA pumpa működésének serkentésére, ezáltal hozzájárulva a kardiomiociták elernyedési funkciójához [63]. A tényt megerősítve Frantz és mtsai (2013, Eur Heart J) elegáns kísérletsorozatokkal megmutatták, hogy a PKG enzim kardiomiocita-specifikus delécióna a foszfolambán csökkent foszforilációjával jár (a Ser16-os helyen, mely a PKG specifikus célpontja), mely a SERCA csökkent aktivitásában és felborult Ca-homeosztázisban nyilvánul meg [64].

Az intracelluláris cAMP és cGMP szintjét a *foszfodiészteráz* enzimek (PDE-k) regulálják, melyek a cAMP-t 5'-AMP-vé, cGMP-t pedig 5'-GMP-vé bontják. A kardiovaszkuláris rendszerben eddig mintegy 9-féle PDE izoformát írtak le, melyek közül a PDE5, a PDE6 és a PDE9 cGMP-re specifikus [53]. A PDE -k gátlásával létrehozott cGMP-szint emelkedés kardioprotektív hatása terápiásan kiaknázható szívelégtelenségben és pulmonális hipertóniában. Ezt a hipotézist - a NO-útvonalon létrejövő cGMP-t hidrolizáló PDE5 izoenzim gátlása esetében (*szildenafil*) - mára több tanulmány bizonyította [65-67]. Meghatározóvá vált tanulmányukban Lee és munkatársai igazolták, hogy a PDE9A, mely elsősorban a natriuretikus peptid útvonalon létrejövő cGMP lebontásáért felelős, *up-regulálódik* a humán miokardiumban hipertrófia és szívelégtelenség fennállásakor. A PDE9A gátlása ugyanakkor visszafordította a nyomásnövekedés következtében kísérletesen kialakított

szívbetegséget, NO-független útvonalon [68]. Ez az eredmény azért is jelentős, mert a PDE5-gátlók hatásossága függ a NO-cGMP útvonal aktivitásától, mely szívbetegségekben gyakran csökkent lehet. Ezzel szemben a PDE9A enzim gátlása, ezáltal a natriuretikus peptid útvonalon generált cGMP-szint növelése potenciális terápiás utakat nyithat a szívelégtelenség kezelésében, mely hipotézissel e dolgozat alapját képező egyik közleményünkben kiterjedten foglalkozunk.



3. ábra. A Protein Kináz G jelátviteli útvonal szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben. (A rövidítések magyarázata a szövegben található.)

2.3. A szívelégtelenség diagnosztikája

2.3.1. Alapvető és kiegészítő diagnosztikai módszerek

A szívelégtelenség klinikai diagnózisa nem egységes, és a tünetek gyakran nem-specifikusak, illetve túlsúlyos vagy idős páciensekben többször nehézkes azokat azonosítani. A kórtörténet igen hasznos, különösen a lezajlott miokardiális infarktus vagy egyéb szívizom-ártalom esetén lehet szívelégtelenségre gyanakodni.

Az alapvető vizsgálatok közül könnyen elérhető a plazma natriuretikus-peptid (NP) koncentrációjának meghatározása. Normál NP szint esetén ritka a szívelégtelenség előfordulása. A B-típusú natriuretikus peptid határértéke emberben 35 pg/ml, a funkcióképtelen, diagnosztikus markerként használt előalak, az N-terminális pro-BNP (NT-

proBNP) határértéke pedig 125 pg/ml, HFrEF és HFpEF esetén is, habár HFpEF-ben értéke általában alacsonyabb [69, 70]. A NP szintjének nagyon magas a negatív prediktív értéke, azonban a pozitív prediktív érték alacsony, ezért a plazmaszint meghatározása a diagnózis kizárására ajánlott, nem pedig annak megerősítésére [13]. Veseelégtelenségben, vagy az életkorral például nő a NP plazmaszintje, obese páciensekben viszont éppen alacsonyabb lehet.

A NP plazmaszintek mellett a rutin elektrokardiogramm (EKG) felvétele is hasznos a szívelégtelenség diagnosztizálásában. Az abnormális EKG növeli a szívelégtelenség diagnózisának valószínűségét, bár a specificitása alacsony. A szívelégtelenség fennállása valószínűtlen teljesen normális EKG-t mutató pácienseknél, ezért a rutin EKG felvétele mindenképpen ajánlott.

A diagnózis felállításában és a terápiás stratégiák megtervezésében a legfontosabb eljárás az echokardiográfia. Egyéb tesztek (pl. koronária angiográfia) és képalkotó eljárások (MR, CT, SPECT) csak egyedi szituációkban, vagy értékelhetetlen echokardiográfiás felvételek esetén szükségesek [13]. Megjegyzendő, hogy a drágább és limitált elérhetőségű kardiális MR vizsgálat adja a legpontosabb eredményt a szívüregek térfogatára és az ejekciós frakcióra vonatkozóan [71]. Mind a klinikumban, mind a transzlációs kutatásokban és az itt bemutatásra kerülő tanulmányokban betöltött meghatározó szerepe miatt az echokardiográfiát külön fejezetben tárgyaljuk.

2.3.2. Az echokardiográfia szerepe a diagnózisban

A transztorakális echokardiográfia (TTE, a továbbiakban: echokardiográfia) non-invazív képalkotó eljárás, és pótolhatatlan szerepet tölt be a kardiovaszkuláris megbetegedések diagnosztizálása során.

Az ultrahangok visszaverődésének segítségével létrehozott leképezési technikákat eredetileg hadászati célokra fejlesztették ki (I. világháború: SONAR, II. világháború: RADAR). A francia André Denier ezek által inspirálva javasolta az ultrahangos technikák a belső szervek vizualizálására. Az echokardiográfia atyjának a svéd Inge Edler-t tartják, aki német fizikus, Hellmuth Hertz segítségével fektette le a mai ultrahangos képalkotás alapjait az 1950-es években (első „M-mód” felvétel: Siemens Ultrasound Reflectoscope, 1953) [72].

Az echokardiográf transzducerében elektromos impulzussal gerjesztett piezo-elektromos kristály található. Ez bocsájtja ki az ultrahangot, amelynek legnagyobb részét a test elnyeli, de a különböző denzitású szövetek határfelületekről kisebb hányada visszaverődik. A transzducer detektálja a visszatérő hullámot, és a késése alapján szoftver segítségével leképezi a szöveti struktúrát. A nagyobb frekvenciájú ultrahanghullámok használata növeli a felbontást,

de csökkenti a szöveti penetrációt (mélységi behatolást). Szoftver segítségével a létrehozott kép számos eljárással tovább elemezhető, bontható, a tárolt mozgóképek további analízisekkel vizsgálhatók, így különféle paraméterek, értékek mérhetők [73].

A szisztolés funkció értékelésére alkalmazott technikák

A szív szisztolés (pumpa-) funkciójáról legegyszerűbben a 2D és M-mód echokardiográfia segítségével kaphatunk képet. 2D módban valós időben láthatjuk a szív mozgását egy 2 dimenziós keresztmetszetben, és észlelhetjük az anatómiai változásokat, falmozgás-zavarokat. A leggyakrabban alkalmazott síkok a paraszternális hossz tengelyi (*parasternal long axis*, PLAX), rövidtengelyi (*short axis*, SAX), és csúcsi (apikális) metszetek. 2D módban az ultrahang-hullámok kibocsátása lineáris, így pásztázva végig egy adott síkot, amely 2 dimenziós képként látszik a megjelenítőn.

Az M-mód echokardiográfia 1D-s nézetet biztosít, időtengelyen láthatjuk a falak mozgását az adott síkban. Az M-mód jó időbeli és térbeli felbontást ad, mivel a fókusz csak a 2D-s metszet egyetlen síkján van (1 dimenzióban). M-módban a hullámok gyors egymásutánban emittálódnak, miközben a 2D-mód felvétel készül, hasonlóan ahhoz, mintha egy mozgókép készülné a visszaverődött ultrahang-hullámokból. A szövethatárok transzducerhez képesti mozgása képként rögzíthető, így például – megfelelő pozícióban – meghatározható a szív egy üregének vagy falának pontos keresztmetszeti mérete szisztolében és diasztolében.

A szisztolés funkció legegyszerűbben meghatározható paramétere a frakcionált rövidülés (Fractional Shortening, FS), amely megadja a bal kamra üregének méretcsökkenését. Az üreget a legnagyobb szélességénél, a papilláris izmok magasságában szükséges virtuálisan el metszeni az M-mód síkjával a végdiasztolés és végszisztolés átmérők pontos meghatározásához. Mivel a mechanikai szisztolé az elektromos szisztolé után esik, a legpontosabban úgy határozhatjuk meg a végdiasztolés átmérő (LVEDD, vagy LVIDd) helyzetét az időtengelyen, ha a kurzort az EKG QRS-komplexus R-hullámának csúcsára illesztve helyezzük el. A végszisztolés átmérő (LVESD, vagy LVIDs) az EKG T hullámának végződésénél mérendő. A FS a bal kamrai végdiasztolés átmérő (LVEDD) – végszisztolés átmérő (LVESD)/LVEDD * 100 képlettel számolható, normál értéke 28% fölötti [74]. A frakcionált rövidülés nem ad tájékoztatást a globális falmozgási zavarokról, hiszen csak 2 adott falrészlet mozgásáról nyújt információt egyetlen 1D-s síkban, és további limitációja, hogy a pre- és az afterload is jelentősen befolyásolják. A köbös (Cube) vagy a Teichholz-formulákkal az átmérőkből a kamrai térfogatokat, így az ejekciós frakciót (EF) is kalkulálni lehet, azonban

ezeket a meghatározási módszereket az újabb iránymutatások nem ajánlják [13]. A teljesség kedvéért itt megemlítsük a két módszer a kamrai térfogatok becslésére: EDV (végdiasztolés térfogat) = $LVEDD^3$ és ESV (végszisztolés térfogat) = $LVESD^3$ (Cube módszer); illetve, $EDV = 7/(2,4+EDD)*EDD^3$ és $ESV = 7/(2,4+ESD) * ESD^3$ (Teichholz-formula); és $EF = EDV-ESV/EDV*100$.

Az ejekciós frakció (EF) a legszélesebb körben használt paraméter a szisztolés kamrafunkció jellemzésére. Az EF a verőtérfogatot (stroke volume, SV) fejezi ki a végdiasztolés térfogat (EDV) arányában, vagyis $EF = SV/EDV*100$, ahol $SV = EDV-ESV$. A 2D-s felvételekből 3D-s térfogatot számolni számos matematikai formulával lehetséges, melyek különböző, az anatómiai viszonyokra mindinkább reflektáló geometriai modelleket használnak, és többségük klinikailag is validált volt, de csak fiziológiás kamrageometria esetében adtak pontos becslést (ld. a fentebb leírt Cube és Teichholz formulák). A területmérésen alapuló Simpson's-formula (*biplane method of multiple discs*) abnormális kamra-anatómia mellett is megbízható adatot szolgáltat, így a hatályos iránymutatások által jelenleg ajánlott módszer az EF számításához [74]. A méréshez az endocardiális határokat szükséges kijelölni végdiasztolés és végszisztolés, és a szoftver ezek alapján kalkulálja a pontos térfogatokat, majd az EF-t. A módszer hátránya, hogy csak jó felbontású felvételek esetén megbízható, valamint számos patológiás folyamat, pl. kamrai disz-szinkronia vagy artimiák megnehezíthetik az alkalmazását. Emberben az 55% fölötti ejekciós frakciót tekintjük fiziológiásnak, mely a szisztolés diszfunkció előrehaladtával egyre csökken (súlyos diszfunkcióban $EF < 30\%$) [74]. Az EF méréséhez meghatározott verőtérfogatból (SV) a perctérfogat (cardiac output, CO) is kalkulálható ($CO = SV * HR$).

A szisztolés funkció kiegészítő értékelésének céljából M-mód echokardiográfia segítségével a mitrális billentyű anulusának szisztolés kitérése (MAPSE, *mitral anular plane systolic excursion*) is meghatározható. A MAPSE az M-mód kurzor síkját a mitrális billentyű laterális anulusára pozicionálva, a hossz tengellyel párhuzamosan mérendő, és a maximális kitérést szükséges meghatározni (cm-ben). A MAPSE a bal kamra longitudinális szisztolés funkció megbízható markere, és könnyű reprodukálhatósága miatt klinikailag a globális szisztolés funkció meghatározására alkalmas. A jobb kamra szisztolés funkcióját hasonlóképpen, a trikuszipidális billentyű szisztolés kitéréseivel (TAPSE, *tricuspid annular plane systolic excursion*) jellemezhetjük.

A szisztolés tevékenység újabban a szöveti Doppler képalkotás (Tissue Doppler Imaging, TDI) segítségével is értékelhetővé vált. Mivel azonban a Doppler echokardiográfiának a klinikai rutinban jelenleg a diasztolés funkció értékelésében van

meghatározóbb szerepe, a technika részleteit ott ismertetjük. Röviden: a bal kamrai pumpafunkció kiegészítő értékelésére a PW Doppler (*pulsatile wave*) TDI-vel meghatározott mitrális anuláris mozgási sebességek alkalmasak. A laterális anulusra helyezve a mintavételi kaput, egy szív cikluson belül karakterisztikus sebesség-idő hullámok láthatóak, két negatív irányú (diasztolés: e' és a'), valamint két pozitív irányú (szisztolés: s_1 és s_2) komponenssel. Az s_1 a bal kamrai izovolumetriás kontrakció sebessége, az s_2 (vagy másképpen s') pedig a csúcs-szisztolés kontrakciós sebesség, mely jól korrelál a globális bal kamrai funkcióval, bár erősen preload-dependens. A részben hasonló elvek alapján működő, a későbbiekben szintén ismertetésre kerülő Strain Rate Imaging és Speckle Tracking Echocardiography azonban minden, előzőleg leírt módszernél megbízhatóbb és fejlettebb technika a szisztolés tevékenység értékelésére [74].

A diasztolés funkció értékelése

A bal kamra diasztolés funkcióját általánosan a mitrális beáramlási adatokkal értékeljük, mióta ezt a Doppler-effektus elvén működő Doppler echokardiográfia lehetővé teszi. A Doppler echokardiográfia a 1980-as évektől jelent meg, a *continous wave* (CW) és a *pulsed wave* (PW) Doppler technikák kifejlesztésével. A CW az ultrahang-hullám teljes hosszában méri a sebességet, míg a PW lokalizáltan, egy bizonyos mélységben is képes erre, így precízebb [75].

A Dopplerrel mért mitrális beáramlási görbe (*transmitral flow*) korai komponensének csúcssebessége az E hullám, ez a kamra passzív telődését jellemzi; míg a mitrális beáramlási görbe késői/pitvari komponensének csúcssebessége az A hullám, mely a pitvari kontrakció során a kamrába juttatott vér sebességét, így a diasztolés késői fázisát ábrázolja. A kettő hányadosa az E/A arány (definíció szerint a korai és késői mitrális beáramlási csúcssebességek hányadosa), mely normálisan 1-nél nagyobb, és szívelégtelenségben – stádiumtól függően - csökken, (pszeudo-)normalizálódik, majd nő. Az E/A arány nem elégséges a diasztolés diszfunkció (DD) értékelésére, nem korrelál jól a pulmonális éknyomással, illetve, közepes súlyos DD-ban látszólag normális arányt mutat (>1), vagyis pszeudonormális, így félrevezető lehet. Ennek az az oka, hogy bár ebben a stádiumban a kamrai relaxáció már elégtelen, viszont a megnövekedett merevség (*stiffness*) miatti emelkedett bal pitvari nyomás ennek hatását ellensúlyozza, vagyis kiegyenlíti a relaxációs zavar hatását a beáramlási görbe nyomásgradiensére és sebességére, így - látszólag - normalizálva az E/A arányt [75]. Az E/A arány diagnosztikus értékét számos további limitáció befolyásolja: függ a szívfrekvenciától, valamint a pre- és afterload mértékétől [76]. Élettani okok közül az életkor, edzettségi állapot, vérvolumen és a vegetatív idegrendszeri hatások is befolyásolják (pl. mivel az alacsonyabb HR

hosszabb diasztolét eredményez, csökkenti a pitvar hozzájárulását a telődéshez, ezért az élsportolóknál általános alacsonyabb pulzus részben az E/A növekedéséhez vezethet [77].

Az E/A hányados fentebbi korlátai miatt érdemes a szöveti Doppleres képalkotás (Tissue Doppler Imaging, TDI) által meghatározott paramétereket is figyelembe venni a diasztológia értékeléséhez. A TDI segítségével a miokardiális szöveti mozgási sebességek határozhatók meg, amely fejlett zajszűrési és frekvenciaszűrési eljárások által lehetséges. A pulzatilis Dopplerhez képest, amely a véráramlást méri, itt a szűrőket fordítottan állítják be, vagyis nem a kis energiájú, magas frekvenciájú és sebességű jeleket (vörösvértestek), hanem a nagy energiájú és amplitúdójú, de alacsony frekvenciájú jeleket (miokardiális szöveti mozgás) engedik át a detektorhoz. A pulzatilis TDI-görbéket (PW TDI) a csúcsi (4 üregű) metszetben a mitrális anulus laterális és szeptális oldalain határozzuk meg, ebben az üzemmódban a maximális sebességek mérhetők, míg szín-kódolt TDI-vel átlagsebességek határozhatók meg. Az újabb ajánlások a PW TDI-t részesítik előnyben [78]. A szöveti Dopplerrel meghatározott értékek már nem függenek a szívfrekvenciától, viszont a PW TDI technikai hátránya a beesési szögtől való függés, valamint az a tény, hogy a pulzatilis Doppler TDI nem tud különbséget tenni valóban aktívan mozgó miokardium szegmensek és a mellettük lévő, passzívan mozgatott akinetikus szövetrészek között [79, 80]. TDI mérések segítségével a bal kamrai diasztolés funkciót jellemezhetjük a mitrális anuláris korai (e') és késői (a') mozgási sebességekkel, valamint ezek egymáshoz viszonyított arányával (e'/a'), ezen kívül pedig a TDI e' hullámnak a mitrális beáramlási görbén mért korai sebességhez (E) viszonyított arányával (E/e'). Ezeket a méréseket elvégezhetjük a mitrális anulus szeptális (mediális), és laterális részén is. Mivel a laterális anulus kitérése fiziológiásan általában nagyobb sebességű, a kettő átlagának használata adja a legpontosabb eredményt.

A Dopplerrel mért E/e' hányados a relaxáció indexe, minden típusú diasztolés diszfunkcióban változik (nö), és jó korrelációt mutat a kapilláris éknyomással (PCWP), valamint a bal pitvari nyomással (LAP), ezért a klinikumban („*robust marker*”-ként) a bal kamrai töltőnyomás becslésére alkalmazzák. Az E/e' echokardiográfiás mérése az invazív katéteres nyomásméréssel összevethető információt szolgáltat, ezért igen hasznos paraméter, és elengedhetetlen a diasztolés diszfunkció fokának megítéléséhez, amelyet az ajánlások 4 stádiumba (Grade I-IV) osztanak [81]. A kóros E/e' arány 8-nál nagyobb, és az emelkedő E/e' növekedő töltőnyomást jelez, amely Grade I-ben még nem észlelhető (hiszen ekkor csak relaxációs zavar áll fenn, mely egyébként idősebb páciensekben általánosan megjelenik). Grade II-ben (pszeudonormális pattern) a töltőnyomás már emelkedett, az $E/e' = 8-15$; Grade III-IV-ben (restriktív telődés) az E/e' arány 15-nél nagyobb, a bal kamrai töltőnyomás tehát jelentősen

emelkedett. A teljesség kedvéért megjegyzendő, hogy a fiziológiás, egészséges diasztolés funkciót (ahol $E/A > 1$) a pszeudonormális funkciózavartól (ahol E/A szintén nagyobb, mint 1) - a fentebb bemutatott E/e' arány becslésén kívül - a Valsalva-manőver alkalmazásával is el lehet különíteni.

A mitrális beáramlási görbék értékelését, így a diasztolés diszfunkció osztályozását a szöveti Dopplerrel mért hullámokon kívül kiegészítheti a decelerációs idő (DecT vagy DT, ms) mérése is. A DecT az E hullám csúcsától annak az „x” időtengellyel való metszéspontjáig tart, értékének jelentősebb befolyásoló tényezői a kamrafal merevsége és a nyomásviszonyok. A DecT meghatározásának főleg a közepes és a súlyos fokú DD értékelésében van jelentősége, értéke korrelál a pulmonális kapilláris éknyomással [75]. Mivel a DecT fordítottan arányos a bal kamrai töltőnyomással, ideje egészséges egyénekben 160 ms fölötti, Grade I-ben 200 ms körüli (közel fiziológiás nyomást jelez, hiszen Grade I-ben még csak relaxációs zavar van). Pszeudonormális telődés esetén a DecT 160-200 ms között van, és az E/A normális, mert az emelkedő nyomást ($E/e' 8-15$) a növekvő kamrafali merevség éppen kiegyenlíti. Súlyosabb (restriktív, Grade III-IV) fokú diszfunkcióban a DecT ideje csökken (<160 ms), ezzel jelezve a vér beáramlásának gyorsaságát, így a kórosan megnövekedett töltőnyomást [82].

A szív ciklus során a kamrai szisztolé után a kamratelődés nem azonnal kezdődik el, hiszen először a kamrai nyomásnak a pitvari nyomás alá kell esnie. Ezt a rövid intervallumot izovolumetriás relaxációs szakasznak nevezzük, ekkor aorta- és mitrális billentyűk zártak. Az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) az ejekció vége és kamrai telődés kezdete között eltelt idő, másként az aorta billentyű záródásától a mitrális billentyű nyitásáig eltelt idő. Az IVRT elégtelen relaxáció (Grade I) során nyúlik, mivel a kamrafal lassabban relaxál az izovolumetriás szakaszban, és több időre van szükség ahhoz, hogy a pitvari nyomás eléggé megnőjön a töltés megkezdéséhez. Korai megváltozásával az IVRT így a legelső echokardiográfiás markere a diasztolés diszfunkció kialakulásának [83].

Súlyosabb fokú DD esetében, a restriktív fázisban az IVRT a bal pitvari nyomás (LAP) növekedésével megrövidül, hiszen ekkor kora-diasztolében a pitvar és a kamra közötti nyomásgradiens nagymértékben megnő, és ezzel az E hullám növekszik. Mivel a nyomás nagy, a beáramlás gyorsan megkezdődik (rövid IVRT, <70 ms) és hamar abbamarad (rövid DecT, <140 ms). Ha Valsalva-manőverrel a restriktív telődés pszeudonormálissá válik, a DD-t Grade III-ba soroljuk. (Ez a pattern hasonlít a sportolók „szupernormális telődéséhez, de azzal nem összekeverhető, hiszen a paciens általános állapota is segít a diagnózisban). Ha a Valsalva-manőverrel sem változik a transzmitrális beáramlási kép, a DD IV-es fokú, súlyos, irreverzibilisen restriktív. Ez igen súlyos szívelégtelenséget jelez, és belátható, hogy minél

nagyobb az E/A és rövidebb a DecT, annál nagyobb a töltőnyomás, és annál kevésbé valószínű, hogy a folyamat visszafordítható (4. ábra) [84].

Doppler echokardiográfia segítségével a bal kamrai kiáramlási traktus (LVOT) sebesség- és nyomásviszonyairól is képet kaphatunk. A vér kiáramlása negatív irányú hullámot alakít ki, ebből meghatározható a kiáramlás maximális és átlagos sebessége, nyomásgradiense, illetve a görbe alatti területből (LVOT VTI: subvalvular velocity time integral) és a kiáramlási traktus területéből (LVOTr2 π) a pulzusvolumen (Stroke Volume, SV = LVOT VTI* LVOTr2 π) és a perctérfogat (Cardiac Output, CO = SV*HR) is kalkulálható. Az LVOT megnövekedett sebesség- és nyomásgradiense aorta-szstenózisra utal [85].

	Normális diasztolés funkció	Grade I Relaxációs zavar	Grade II Pszeudo-normális	Grade III Restriktív (reverzibilis)	Grade IV Restriktív (fixált)
Mitrális beáramlás	 E/A: 1 - 1,5 DecT: > 160 ms	 E/A: < 1 DecT: > 200 ms	 E/A: 0,8 - 1,5 DecT: 160-200 ms	 E/A: > 2 DecT: < 160 ms	 E/A: > 2 DecT: < 160 ms
Mitrális anulus mozgása					
E/e'	E/e': < 8	E/e': < 8	E/e': 8-15	E/e': > 15	E/e' > 15
Bal pitvari nyomás	normális	normális ↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑↑

4. ábra. A diasztolés diszfunkció jelei és osztályozása a Doppler- és TDI echokardiográfias paraméterek segítségével. Az American Society of Echocardiography iránymutatásai alapján [78]. (A rövidítések magyarázata a szövegben található.)

Egyéb, származtatott paraméterek

Az alábbiakban 2 fontos, echokardiográfia alapján meghatározható index-szám ismertetése következik. A Myocardial Performance Index (MPI), vagy – megalkotója után - a Tei-index, a szisztolés és diasztolés funkciók együttes becslésére szolgál. Méréséhez a Doppler (vagy szöveti Doppler) echokardiográfiával meghatározott izovolumetriás kontrakciós idő

(IVRT) és izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) összegét szükséges elosztani az ejekció időtartamával (Ejection Time, ET), vagyis $MPI = (IVCT + IVRT)/ET$ [86]. Másik meghatározási módja: $(MCOT - ET)/ET$, ahol az MCOT a mitrális billentyű záródásától a nyitásáig eltelt idő (MCOT: *mitral valve closure to opening time*). Ez az egyszerűen meghatározható paraméter jól reprodukálható, információt nyújt a globális kamrafunkciókról, csak kismértékben függ a szívfrekvenciától és a preloadtól, továbbá az E/A aránynál és a DecT-nél is jobb korrelációt mutat a katéteresen meghatározható bal kamrai relaxációs konstanssal, *tau*-val [87]. A Tei-index értéke az IVCT és IVRT megnyúlása vagy az ET csökkenése miatt növekedhet, ez jelzi a globálisan kóros miokardiális teljesítményt [87].

Echokardiográfiás adatokból non-invazíven kalkulálhatjuk a bal kamra tömegét (*LV mass*), illetve a relatív falvastagságát (*relative wall thickness*, RWT), amelyek fontosak a remodeláció és hipertrófia mértékének megbecslésében. Bal kamrai tömeg meghatározása az alábbi egyenlettel történhet: $LVmass = 0.8(1,04((LVIDd + IVSd + LVPWd)^3 - LVIDd^3)) + 0.6$; ahol LVIDd: bal kamrai végdiasztolés átmérő, IVSd: interventrikuláris szeptum átmérője diasztolében, LVPWd: bal kamrai posterior fal vastagsága diasztolében.

A bal kamrai remodeláció geometriáját (koncentrikus vagy excentrikus remodelling) a relatív falvastagság (RWT index) számításával becsülhetjük meg: $RWT = 2(LVPWd)/LVIDd$; ahol a megnövekedett RWT ($> 0,42$) koncentrikus, míg a csökkent RWT ($\leq 0,42$) excentrikus remodelációt feltételez [78]. Koncentrikus hipertrófiában mind a bal kamrai tömeg, mind az RWT nő, míg remodeláció esetében csak az RWT [88].

A strain rate mérése, és a Speckle tracking echocardiography (STE)

Mind a szisztolés, mind a diasztolés funkció fentebb vázolt meghatározási módszereinek vannak korlátai (ilyenek pl. az ejekciós frakció pre- és afterloadtól való függése, kalkulációs és becslési pontatlanságai, a diasztolés csúchullámok magasságának függése az ultrahang sugárának beesési szögétől, stb.). A legmodernebb, funkcióvizsgálatokat kiegészítő echokardiográfiás módszer a Doppleren alapuló Strain Rate Imaging (SRI), valamint a miokardium-szegmensek mozgását egyedi markerekkel követő Speckle Tracking echokardiográfia (STE) technikák, melyek képesek a regionális kontraktilitási tulajdonságok meghatározására is [89]. A Strain Rate Imaging segítségével az egyes szívizom-szegmentumokban, és természetesen globálisan is meghatározható az egyes szövetrészek elmozdulása (displacement), sebessége (velocity) vagyis a falmozás, továbbá meghatározható a fal *deformálódása* is. A deformáció oka, hogy a különböző szövetrészek különböző helyre és sebességgel mozognak el egy szív ciklus során, így a szívizom alakja a tér 3 irányában

deformálódik. A szisztolé során az izomzat a hossz tengely mentén megrövidül és elcsavarodik, a rövid tengely mentén circumferenciálisan összetömörödik, miközben a falak radiálisan megvastagodnak; diasztolében pedig ezen elmozdulások ellentétei játszódnak le. Mindezen mozgások követhetőek a *strain* echokardiográfia segítségével [90]. A rostok összehúzódása a hossz tengely mentén (longitudinálisan) negatív irányú deformálódással, *strain*-nel jár, míg a távolodásuk, azaz a megnyúlás a pozitív *strain*. A *strain* meghatározható radiális (szisztolében pozitív), illetve circumferenciális (szisztolében negatív) irányokban is. A technika segítségével így a miokardium egyes szegmenseinek intrinszik mozgékonyaságáról is információt nyerhetünk. A deformálódás vagy *strain*, a kiindulási állapothoz képesti tömörödés vagy megnyúlás (L, %), ennek időbeli leképezésével pedig a *strain rate* számolható (1/s), mely paraméterek egyenesen arányosak a bal kamrai funkcióval. A szöveti Doppler technikán alapuló *strain* echokardiográfiával így 1D-ban határozható meg a miokardium deformálódása. Ugyanakkor a *strain* echokardiográfia limitációja az erős zajfüggőség, nagy interobszerver-variabilitás, illetve, hogy továbbra is függ az ultrahang inszonációs szögétől [91]. A jelenlegi legmodernebb technika Speckle Tracking echokardiográfia mindezekről a hibáktól mentes, és nagyon pontosan vizsgálhatóvá teszi a szívizomzat deformációs tulajdonságait. A STE a szívizomterületek mintázatából leképezett, 20-40 pixel nagyságú akusztikus markerek (*speckle*) alapján képes követni azok mozgását, így segítségével ugyanúgy meghatározható a globális *strain* és *strain rate*, valamint szegmentumos mérések is végezhetőek [92]. Mivel az STE módszer 2D-ban követi az egyes szövetrészek mozgását a falban, nem pedig az ultrahang-sugár irányában, így a beesési szögtől független, azonban nagyon jó képminőséget és felbontást igényel. Előnyei miatt várható, hogy alkalmazása az új ajánlásokba is bekerülhet.

A fentebb vázolt számos technikai lehetőség, a mérhető paraméterek széles tárháza, a non-invazivitás ténye, illetve a technika relatíve alacsony költsége tette az echokardiográfiát a kardiális funkció meghatározásának „arany standardjává”.

2.4. A szívelégtelenség farmakoterápiája

2.4.1. Konvencionális szerek és újabb gyógyszercsoportok

A szívelégtelenség klinikai evidenciákkal alátámasztott farmakoterápiája még a legújabb iránymutatásokban is a csökkent ejekciós frakcióval járó (HFrEF) formára vonatkozik, jelenleg sem egyértelmű ajánlás, sem specifikus gyógyszer nem érhető el a megőrzött ejekciós frakciójú (HFpEF) szívelégtelenség kezelésére [13, 93]. Ellenben HFrEF-ben az ajánlások egyértelmű útmutatást adnak az alkalmazandó gyógyszercsoportokra vonatkozóan, melyek

nagy, randomizált vizsgálatok alapján osztályozzák a bizonyítékok „erősségének”, megbízhatóságának mértékét.

Angiotenzin-konvertáz enzim inhibitorok (ACEI, ACE-gátlók)

Az ACE-gátlók (*kaptopril, enalapril, lizinopril, ramipril, trandolapril*) csökkentik a morbiditást és a mortalitást, valamint tünetmentes bal kamrai diszfunkció esetén csökkentik annak szívelégtelenséggé alakulását, ezért a maximálisan tolerálható dózisokig szükséges fel-titrálni az adagolásukat. Az ACE-gátlók a szívelégtelenség bázisterápiáját képezik, csökkentik mind az előterhelés, mind az utóterhelés mértékét, a só- és vízretenciót, továbbá antiproliferatív hatásuknak köszönhetően visszafogják a kóros remodelációt is. Farmakodinámiás hatásai az angiotenzin I – angiotenzin II (AT II) átalakulás gátlása, ezáltal mind a plazma-, mind a szöveti AT II szintjének csökkentése, továbbá a bradikinin lebontásának gátlása, prosztaglandinok szintjének növelése. Kontraindikációik a kétoldali veseartéria-szűkület és a terhesség, főbb mellékhatásuk a köhögés, illetve angioneurotikus ödéma kifejlődése [93].

Angiotenzin-receptor blokkolók (ARB)

Az ARB-k (*lozartán, valzartán, irbezartán, telmizartán*) szelektíven gátolják az AT1 receptorokat, ezáltal vazodilatatív hatásúak. A valzartán bizonyítottan csökkenti a szívelégtelenséggel összefüggő kórházi kezelések arányát. Az ARB-k ACEI-intolerancia esetén alkalmazandók, nem okoznak renin- és AT II-szint emelkedést, nem köhögtenek, viszont a veseereket sem tágítják. Várandósság és szoptatás alatt is ellenjavalltak [93].

Béta-blokkolók (BB)

A béta-blokkolókat (*metoprolol, bisoprolol, carvedilol*) – konszenzus alapján – az ACEI-kal együtt lehet adagolni klinikailag stabil pacienseknek, mivel csökkentik mind a morbiditást, mind a mortalitást [13]. A béta-blokkolók gátolják a reninfelszabadulást, csökkentik a RAAS aktivitását, illetve csökkentik a túlzott adrenerg kompenzatórikus választ is. Anti-iszkémiás hatásuk kifejezett, és – paradox módon - negatív inotróp hatásuk ritkán érvényesül (az EF még növekedhet is). Negatív kronotróp hatásuk miatt mérséklük a tachycardiát, növelik a diasztolében eltöltött időt, ezáltal javíthatják a szív anyagcseréjét, továbbá bizonyos mértékű anti-remodellációs hatással is rendelkeznek. Mellékhatásaik a fáradtság, hipoglikémia és bradycardia [93].

Mineralokortikoid/aldoszteron receptor antagonisták (MR antagonisták)

A spironolakton és eplerenon minden, a szívelégtelenség tüneteit mutató páciensben javallott 35 %-os EF alatt, ezek a hatóanyagok bizonyítottan csökkentik a mortalitást és a kórházi kezelések szükségességét [13]. A MR-antagonisták a disztális vesetubulusban szeroid-receptorhoz történő kötődés után fehérje-szintézisbeli változásokat okoznak, melyek eredménye a nátrium-ürítésének növekedése és a kálium visszaszívása, így az ödéma csökkenése. Az eplerenon különösen lezajlott AMI során kialakuló szívelégtelenség fennállásakor indikált. Veseelégtelenség és hiperkalémia esetén óvatosan adandók, illetve a szérum kálium szintet monitorozni szükséges a terápia alatt [93].

Diuretikumok

A diuretikumok (kacsdiauretikumok: *furosemid*, tiazidok: *hidroklórtiazid*, *indapamid*, kálium-megtakarítók: *amilorid*) a pangás és ödéma csökkentésére javallottak a szívelégtelenség minden formájában, ugyanakkor megjegyzendő, hogy randomizált vizsgálatok nem állnak rendelkezésre a mortalitás csökkentésének tekintetében [13]. A kacsdiauretikumok terápiaerezisztens ödémában, és csökkent vesefunkció esetén is alkalmazhatóak. A mellékhatások megjelenése miatt a diuretikumok a legkisebb, de még eurolémiát létrehozó dózisban használandók. A kálium-ürítő diuretikumok esetében a megfelelő ionpótlásról gondoskodni kell [93].

Digitálisz-glikozidok

A digitálisz-származékok (digoxin) lassan a perifériára szorulnak, mivel szűk terápiás szélességűek, és nem bizonyított, hogy csökkentenék a mortalitást, habár a kórházi kezelések számát csökkenthetik [13]. A pozitív inotróp hatásuk (Na/K ATP-áz részleges gátlása) ellenére nem tachycardizálnak, növelik a szisztolé erejét és a diaszológia is javul. A kamrai ritmus csökkentésére szívelégtelen, pitvarfibrilláló (AF) betegekben megfontolandó az alkalmazásuk, de csak szoros kontroll mellett. Aritmogének, látászavart, hányást, görcsöket okozhatnak [93].

I_f-csatorna inhibitorok („Funny-áram gátlók”)

Az *ivabradin* bizonyítottan csökkentette a mortalitás-kórházi kezelések kombinált végpontját klinikai tüneteket mutató szívelégtelen betegekben (EF≤35%). Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) engedélyezte az ivabradint 35% alatti EF és 75 bpm feletti szívfrekvencia esetén, ugyanis ebben a csoportban javítja a túlélést. Az ivabradin a szinusz-

csomó I_f-csatornáját gátolja, csökkenti a szívritmust, ezért csak normál szinusz-ritmusú pácienseknek adható [13].

Angiotenzin receptor-neprilysin inhibitor (ARNI)

A RAAS és a neutrális endopeptidázok kombinált gátlójaként egy új gyógyszer csoport került kifejlesztésre az utóbbi években, melyet angiotenzin receptor-neprilysin inhibitoroként (ARNI) jelölnek [13]. Az első szer ebben a csoportban a LCZ969, mely a valzartán és a sacubitril (neprilysin-inhibitor) 1:1 arányú komplexét tartalmazza. A neprilysin gátlásával a bradikinin és a natriuretikus peptidek lebontása gátlódik, nő az ANP és BNP plazmaszintje, ezáltal nő az intracelluláris cGMP-szint, továbbá gátlódik a renin- és aldoszteron-szekréció is. Valzartánnal kombinálva az eredő hatások a diurézis növekedése, az értónus csökkenése, miokardiális relaxáció javulása, illetve a remodeláció és szívizom-hipertrófia visszaszorulása. A nemrégiben lezajlott PARADIGM-HF tanulmány adatai alapján az LCZ969 az ACE-gátló enalaprillal összehasonlítva jobban csökkentette a szívelégtelenség progresszióját, valamint a kardiovaszkuláris- és teljes mortalitást, így ajánlott 35% -os ejekciós frakciójú, jó vesefunkciójú betegek esetében. A hipotenzió és angioödéma előfordulása továbbra is probléma, illetve, a hosszú távú mellékhatásokról még nem áll rendelkezésre elegendő információ [94].

Renin-gátlók

A renint a vese juxtaglomeruláris sejtjei termelik, a proteáz enzim az angiotenzinogén – angiotenzin átalakulást konvertálja [93]. Az *aliskiren* orálisan adagolható direkt renin-gátló, de mivel nem javította szignifikánsan a szívelégtelenség tüneteit és progresszióját, jelenleg nem képezi alternatíváját az ACEI kezelésnek, a hatályos iránymutatások szerint.

2.4.2. Egyéb terápiás lehetőségek és az alapbetegségek kezelése

n-3 poli-unszaturált zsírsavak (n-3 PUFA)

Az *eikozapenténsav* (EPA) és a *dokozahexénsav* (DHA) csak igen nagy dózisban hatásosak a szívelégtelenség progressziójának csökkentésére, és jelenleg az optimális terápia alatt álló betegek kiegészítő kezelésére szolgálnak [13].

Sztatinok

Habár a sztatinok (*atorvasztatin*, *rozuvasztatin*, *fluvasztatin*) egyértelműen csökkentik a mortalitást és a morbiditást ateroszklerózis fennállásakor, a manifeszt HFrEF prognózisát már

nem javítják, nincs terápiás előnyük. A már korábban sztatinnal állított, hiperlipidémiás, ateroszklerotikus betegek terápiájának folytatása azonban megfontolandó [13].

Orális antikoagulánsok

Jelenleg nincs arra bizonyíték, hogy az orális antikoagulánsok csökkentenék a morbiditást vagy a halálozást, sem HFrEF-ben, sem pedig HFpEF-ben. Indikációjukat így a pitvarfibrillációval (AF) együtt járó szenvedő szívelégtelenség fennállása jelenti, illetve, vénás tromboembólia kockázata esetén a megkezdett orális antikoaguláns-terápiát folytatni kell. Hasonló a helyzet a vérlemezke-aggregációt gátló szerekkel is (*aspirin*), vagyis nincs egyértelmű bizonyíték a terápiás haszonra vonatkozóan, és a mellékhatások megjelenése (vérzés) tovább korlátozza alkalmazásukat [13].

Kalcium-csatorna blokkolók (CCB)

A CCB-k (*verapamil, diltiazem*) egyértelműen nem indikáltak szisztolés szívelégtelenségben szenvedő páciensek számára, mivel nem biztonságosak. A dihidropiridin-típusú vegyületek (*amlodipin, lercanidipin, felodipin, nifedipin*) növelhetik a szimpatikus tónust, közülük csak a felodipin és amlodipin alkalmazható biztonsággal, de csak abban az esetben, ha szisztolés szívelégtelenségen kívül valamilyen egyéb fennálló társbetegség ezt megköveteli [13].

A diabétesz mellitusz kezelése szívelégtelenségben

A glükóz-háztartás zavara és a manifest diabétesz meglehetősen gyakori szívelégtelenségben, illetve kiváltó ok is lehet (ld. diabéteszes kardiomiopátia), valamint fennállása rontja a prognózist. Jelenleg nincs evidencia arra vonatkozóan, hogy a szoros glükóz-kontroll csökkentené a kardiovaszkuláris események előfordulását szívelégtelenségben, de szakértői konszenzus alapján a megfelelő glükózkontrollt implementálni kell a terápiába [13, 14].

A *metformin* biztonságos és hatékony szívelégtelenség fennállásakor is, illetve kedvező pleiotróp hatásokkal is bírhat, így a korábbi véleményekkel ellentétben elsőként választandó szer a diabétesz kezelésére, szívelégtelen pácienseknél is. A laktát-acidózis kockázata miatt azonban súlyos vese- vagy májelégtelenségben ellenjavallt. Az *inzulin* szükséges a T1DM kezelésére (illetve kimerült béta-sejtek esetén T2DM kezelésére is), azonban, mivel az inzulin nátrium- és vízvisszaszívást is okoz, a szívelégtelenség tüneteit rontja. A dipeptidil-peptidáz-4-gátlók

(DPP-4-gátlók: *szitagliptin, vildagliptin, linagliptin*) és a GLP-1 (*exenatid, liraglutid*) analógok inzulin az felszabadulását is stimulálják, illetve növelhetik a kardiovaszkuláris események előfordulási gyakoriságát, habár jelenleg nem áll rendelkezésre kontrollált tanulmány erre vonatkozóan. A szulfanil-urea-származékok (*glibenklamid, glimepirid, gliklazid*) alkalmazása szintén összefüggésben állhat a kardiális diszfunkció romlásával, így óvatossággal alkalmazandók. A tiazolidén-dionok (*pioglitazon*) nátrium- és vízretenciót, illetve testsúlynövekedést okoznak, így nem ajánlottak szívelégtelen páciensek kezelésére. Ezzel ellentétben a sodium-dependent glucose co-transporter-2-gátlók (SGLT-2-gátlók: *empagliflozin, dapagliflozin*) közül jelenleg az empagliflozin alkalmazása intenzív kutatás tárgya, ugyanis, ahogyan már fentebb említésre került, a glükózkontroll fokozása mellett szignifikánsan csökkentette a mortalitást és a kórházi kezelési arányát szívelégtelen pácienseknél (EMPA-REG OUTCOME tanulmány) [13].

Az ateroszklerózis és az ISZB kezelése

Az ateroszklerózis és iszkémiás szívbetegségek kezelése gyakran nem választható el élesen a szívelégtelenség terápiájától, mivel ezek gyakran kiváltó okként szerepelnek. Ahogyan a sztatinoknál már említésre került, a diszlipidémia terápiájának folytatása megfontolandó szívelégtelenség kialakulása után is, de a sztatin-terápia - a jelenlegi ismeretek alapján - már nem javítja a prognózist. Az angina megelőzésére vagy enyhítésére a béta-blokkolók, illetve bizonyos páciensek esetében (csökkent EF, 75 bpm feletti szinusz-ritmus) az ivabradin megfelelőek, így a szívelégtelenség bázisterápiáját is képezik. Béta-blokkoló kezelés alatt álló páciensekben a *trimetazidin* kedvező hatást mutat az angina kontrolljára, illetve vannak bizonyítékok arra is, hogy javíthatja a terheléses toleranciát. A nitrátok (*glicerin-trinitrát*) biztonsággal alkalmazhatóak szisztolés elégtelenségben szenvedő pácienseknél [13].

Egyéb kezelési módok, műtéti technikák, antiaritmiás szerek, pacemaker-beültetés, reszinkronizációs terápia, vagy szívtranszplantációs eljárások tárgyalása jóval meghaladná a dolgozat kereteit.

2.5. A BGP-15 gyógyszerjelölt

A kismolekulájú BGP-15 jelű gyógyszerjelölt (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) magyar eredetű originális molekula. Már 1977-ben szintetizálták, de a 1990-es éveken vált intenzívebb kutatás tárgyává, majd a 2010-es években megint lendületet kapott vizsgálata, újabb indikációk felvetésével [95].

Elsőként poli-(ADP-ribóz)-polimeráz inhibitor (PARP-I) hatását feltételezték iszkémia/reperfúziós károsodás, illetve nefrotoxicitás (ciszpaltin) kivédésére (a PARP enzim a sejtprolifráció és az apoptózis egyik irányítója) [96, 97]. Később felmerült a hőshockfehérjék (hsp-k) funkciójára kifejtett indukáló hatása, elsősorban a hsp72 tekintetében. Ez több kórképben bizonyítást nyert, és mivel a hőshockfehérjék számtalan protektív és *repair*-mechanizmusban részt vesznek, a BGP-15 és egyéb hsp-inducerek a legkülönbözőbb patológiás állapotokban képezik intenzív kutatás tárgyát. A hsp-indukció alapján merült a vegyület fel inzulin-érzékenyítő hatása is, majd *proof-of-concept* vizsgálatok alapján megkezdődhetett vizsgálata humán pácienseken [98-101]. A BGP-15 ekkor - tökebefektetők bevonásával - humán klinikai fázisba került T2DM indikációjában, ahol klinikai II-es fázisig jutott el (a vizsgálatot végül a megfelelő támogatási összeg hiányában terminálták) [102]. Ezután került előtérbe a mitokondriális funkció befolyásolására kifejtett esetleges pozitív hatása. *Henstridge és mtsai* (2014) leírták a mitokondrium-számot növelő hatását, majd *Sümege és mtsai* (2017) megmutatták, hogy a mitokondriumokban felhalmozódva csökkenti a ROS-produkciót, sejtvonalon védő hatású a peroxid-stressz által okozott apoptózis és nekrozis, valamint az inflammáció-okozta mitokondriális membránkárosodás ellen is [103, 104]. Vázizmokban ROS-termelést csökkentő hatását, illetve a mitokondriumok viabilitásának javulását *Sorensen* (2017) *in vivo* egérmodellen is bizonyította [105]. Ez a hatása neuropátiában és érvényesül, ahol javítja a neurális mitokondrium-funkciót és csökkenti a neuronpusztulást, így a BGP-15 alkalmazása neurodegeneratív kórképekben is felmerülhet [104].

A BGP-15 jelenleg váz- és szívizom hatásai miatt tart számot a legnagyobb tudományos érdeklődésre, az utóbbi években ilyen témájú publikációk igen rangos folyóiratokban jelentek meg. Izomdisztrofiában szenvedő, *mdx* egereken *Gehrig és mtsai* (Nature, 2012) azt találták, hogy a BGP-15 kezelés javította az izomerőt és a kontraktilitást harántcsíkolt izmokon, csökkentette a kyphosist, továbbá megnövelte az állatok élettartamát, amelyet a hsp72 indukálásával és a SERCA pumpa funkciójának megőrzésével magyaráztak [106]. *Sapra és mtsai* (Nature Communications, 2014) transzgénikus, szívelégtelen-pitvarfibrilláló egérmodellt hoztak létre, melyen 4 hétig tartó (napi 15 mg/ttkg) BGP-15 kezelés csökkentette a pitvar megnagyobbodását, és szignifikánsan javította a szisztolés funkciót, csökkentette a kollagén-1 expressziót, továbbá megelőzte az aritmiák kialakulását [107]. Az eredeti feltételezést, miszerint a kedvező hatások a hsp72 indukációjával állnak összefüggésben, nem sikerült bizonyítaniuk, ezért úgy tűnik, hogy miokardiumban a BGP-15 nem a hsp72 aktiválásával fejti ki protektív hatásait. A tanulmány eredményei szerint a BGP-15 emeli az IGF1 foszforilációját és javítja a membrán-fluiditást, így javasolt további vizsgálata szívelégtelen

modelleken. A fenti két vizsgálat alapján *Kennedy és mtsai* megerősítették, hogy a BGP-15 protektív hatással bír mind a vázizom, mind a szívizom funkcióira, de eltérő, és csak kis részben felderített, vagy kontraverzális mechanizmusok által [108]. Újabban egyéb vázizmokon is leírták a vegyület kedvező hatásai, részben a már kimutatott, részben ismeretlen folyamatok által [109, 110]. A BGP-15 szívizomra gyakorolt hatása és a mögöttes hatásmechanizmus továbbra is kérdéses, illetve a fentiek alapján különféle betegség-modelleken eltérő lehet, így folyamatban lévő is vizsgálatok tárgya.

2.6. Állatmodellek a kardiális diszfunkció vizsgálatára

A kardiális diszfunkció, szívelégtelenség, illetve társbetegségeik (diszlipidémia, ISZB, diabétesz mellitusz) vizsgálatára számtalan állatmodell áll rendelkezésre. A szívelégtelenség komplex, több szervrendszer érintő mivolta, valamint multifaktoriális meghatározottsága miatt – sajnos – nehéz kiváltani az állatmodellek felhasználását az alapkutatásokban (a „3R-szabály” érvényesítésének nehézsége).

E dolgozat témaválasztása kapcsán is fontos tény, hogy állatmodellek esetében a szívelégtelenség szubjektív jelei, vagy klinikai tünetei nehezebben észlelhetők, és általában nagy kompromisszumot szükséges kötni a humán betegség modellezésében a transláció szempontjából. Ennek ellenére megjegyzendő, hogy léteznek elfogadott szívelégtelenség-modellek, melyeknél pl. a terheléses intolerancia vagy a perifériás ödéma is megjelenik, illetve a szívelégtelenség különböző típusaira (HFrEF, HFpEF) is rendelkezésre állnak megfelelő modellszervezetek. Azokban az esetekben, amikor a szívfunkció már egyértelműen károsodott, de pl. a csökkent terheléses tolerancia nem vizsgálható, vagy perifériás ödéma még nem észlelhető, helyesebb kardiális diszfunkcióról beszélni, mely a szívelégtelenség prekurzora. Ez - az AHA vonatkozó állásfoglalása szerint - a humán betegek a „B” stádiumának feleltethető meg [111].

Az indukált modellek közül jelentősebbek a rágsálók és kis laboratóriumi állatmodellek (egér, patkány, nyúl) felhasználásával létrehozott kísérletes patológiás állapotok. A koronária-ligatúra (bal leszálló koronária-ág sebészi elkötése, „LAD-lekötés”) a leggyakoribb procedúra a humán miokardiális infarktus és szövődményeinek modellezésére [112]. Experimentális aorta-szűkület létrehozása az aorta részleges elkötésével (*ascending* (AAC); vagy *transverse* (TAC) *aortic constriction*) nyomásterhelést okoz, mely végül hipertrófiában és diasztolés elégtelenségben manifesztálódik. A gyors pitvari ingerlés (*rapid atrial pacing, pacing-induced tachycardia*) technika segítségével dilatatív kardiomiopátiát és

diasztolés diszfunkciót lehet létrehozni (nyúl, kutya). Hipertónia-indukálta szívelégtelenséget deoxikortikoszteron-acetát (DOCA), sótartalmú diéta és nefrektómia segítségével lehet létrehozni, melyek magas vérnyomást, fibrózist, hipertrófiát, és restriktív diasztolés diszfunkciót okoznak. A doxorubicin (DOX) kardiotoxikus mellékhatással bíró daganatellenes gyógyszer a szisztolés szívelégtelenség modellezésére alkalmas. A monokrotalin alkaloid a tüdőartériák roncsolásával jobb kamrai elégtelenséget okoz [113].

Az állatkísérletes tudományok és a molekuláris biológia fejlődésével lehetővé vált spontán mutációt hordozó beltenyésztett modellek, később transzgénikus rágsáló-modellek létrehozása is. A renin gén egy polimorfizmusát hordozó Dahl só-szenzitív patkányok magas vérnyomásban és progresszív bal-kamra hipertrófiában szenvednek. A szelektív beltenyésztéssel létrehozott spontán hipertenzív (SHR) patkányok szíve először hipertrófiát mutat, majd dilatatív miopátia és diasztolés diszfunkció alakul ki [114]. Az egér eredetű renin gént hordozó mRen2 patkányok hipertóniások és szívizom-szövetük hipertrófiázal. A Zucker Diabetic Fatty – spontán hipertenzív szívelégtelen F1 hibrid (ZSF1) patkányok a ZDF és SHR törzsek keresztezésével jöttek létre - ezek az obesez, diabéteszes állatok hipertenzívek, bal kamrai hipertrófiában, diasztolés diszfunkcióban (HFpEF), tüdőpangásban és proteinuriában szenvednek. A *Spontaneous Watanabe Heritable Hyperlipidemic-Myocardial Infarction* (WHHL-MI) nyulak diszlipidémiások, ateroszklerózisok, továbbá a koronária-okklúzió miatt spontán miokardiális infarktusz és szívelégtelenség alakul ki bennük, ugyanakkor - habár a nyúl miokardium nagyobb hasonlóságot mutat a humán szívizomszövettel, mint a kis rágsálóké - ez a modell magas ára miatt kevésbé terjedt el [112].

A diabéteszes kardiomiopátia modellezésére alkalmas a streptozotocin (STZ)-indukálta T1DM patkány, mely hiperglikémiás, megnövekedett bal kamrai merevséget, diasztolés diszfunkciót és hipertrófiát mutat, titin-izofорма változásokkal [115]. A transzgénikus, vagy mutációt hordozó rágsálók közül az ob/ob leptin-rezisztens és a db/db leptin-receptor-deficiens egerek hiperglikémiások, szívizom-hipertrófiában és diasztolés funkciózavarban szenvednek [116]. Az *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) patkány spontán diabéteszes és diasztolés diszfunkcióban szenved. A *Zucker Diabetic Fatty* patkány (ZDF) leptin receptora mutáns, következésképpen az állat obesez, inzulin-rezisztens, valamint bal kamrai hipertrófiát, diasztolés- és enyhe szisztolés funkciózavart mutat [112].

A dolgozat témája szempontjából fontos, kardiális diszfunkcióban szenvedő („AHA Stage B”) hiperkoleszterinémiás nyúl modellel és a Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodellel a következőkben részletesebben foglalkozunk.

2.6.1. *A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell*

A Goto-Kakizaki (GotoK) patkányokat glükóz-intoleráns Wistar állatok szelektív beltenyésztésével hozták létre japán kutatók [117]. Azóta ez az altörzs az egyik leggyakrabban és legsokoldalúbban alkalmazott poligén 2-es típusú diabétesz-moddé vált, számos előnyös tulajdonsága miatt. Ezek az állatok inzulin-rezisztensek, csökkent bétasejt-állománnyal rendelkeznek, emiatt enyhe glükóz intoleranciában szenvednek, de normotenzívek és non-obezek maradnak, ellentétben pl. a ZDF törzzsel, amely a 2-es típusú diabétesz kifejlődése mellett jelentősen hízik is [118, 119]. A GotoK altörzs pontos genetikai feltérképezése még folyamatban van, de eddig több tucat olyan génmutációját azonosították, melyek pl. az inzulin- és adipocitokin-szignalizációval, PPAR- és T-sejt jelátvitellel, valamint glicerolipid-metabolizmussal vannak kapcsolatban, hozzájárulva a manifest T2DM kialakulásához, annak kardiovaszkuláris szövődményeivel együtt. A GotoK patkányokban metabolikus és kardiális eltérések észlelhetők: a glükóz-oxidáció csökkenése, a zsírsavak felhasználásának növekedése, a szabad-zsírsavak és LDL-koleszterin szérum szintjének növekedése. Az oxidatív stressz hatására mitokondriális diszfunkció és a Ca-homeosztázis zavara áll fenn, az állatok diasztolés funkciója nagy mértékben, a szisztolés diszfunkció enyhén károsodott, továbbá hipertrofia és fibrózis (emelkedett TGF β , fibronectin és kollagén-1 expresszióval) jelenik meg a miokardium-szövetben [120-123].

Az inzulin-rezisztens humán páciensek gyakran obezek, mely a GotoK modell hátrányára is utalhatna, ugyanakkor azonban segítségével az egyéb befolyásoló tényezők (elhízás, diszlipidémia, hipertónia) fennállása nélkül lehetséges a – pusztán hiperglikémia által okozott – diabéteszes kardiomiopátia patomechanizmusát vizsgálni [124].

2.6.2. *A hiperkoleszterinémias (HC) nyúl modell*

Az alimentáris koleszterin-bevitel növelése a nyulakban mint növényevő állatokban rövid idő alatt hiperkoleszterinémiát és ateroszklerózist okoz, annak kardiális következményeivel együtt [125]. A modell transzlációs értékéről – ateroszklerózis tekintetében – pro és kontra érvek egyaránt felsorakoztathatók. Habár a nyúl evolúciósan nincsen felkészülve a exogén koleszterin kiürítésére (extrém magas értékek is elérhetőek), a koleszterin-háztartásért felelős transzporterek és apolipoproteinek nagy homológiát mutatnak az emberével [125]. A kardiális hatások tekintetében a helyzet egyértelműbb, a nyúl miokardium struktúrája, a szív ciklus, az ingerképzésért és vezetésért felelős ioncsatornák szerkezete sokkal közelebb állnak az emberéhez, mint a kis rágcsálóké. További hasonlóság, hogy β -miozin nehéz lánc

domináns a felnőtt állatok miokardiumában, valamint hogy a Ca^{2+} -eliminációért diasztolében 70%-ban a SERCA, 30%-ban a $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger felel, csakúgy, mint emberben [113]. Megjegyzendő, hogy a rezerv-kapacitás azonban kicsi, így terheléses tolerancia nyúlón kevésbé vizsgálható.

Számos tanulmány foglalkozik a különböző koncentrációban és különböző ideig alkalmazott aterogén étrend hatásaival. Már egészen kevés, 0,15-0,25 % koleszterint és hozzáadott trigliceridet tartalmazó étrend szignifikáns változásokat indukál (az aortaívben és a torakális aortában makrofág-eredetű habos sejteket tartalmazó plakkok intimális megvastagodással, koronária-ateroszklerózis simaizomsejt-proliferációval, habos sejtekkel és nektrotikus részekkel) [126]. A hiperkoleszterinémia az endothel-függő vazorelaxációt károsítja, csökkenti a NO-bioelérhetőségét, növeli a ROS-produkciót is [48]. A másik véglet a magas, 2% koleszterint tartalmazó táp több hónapos alkalmazása, mely előrehaladott léziókat, igen súlyos ateroszklerózist, miokardiális infarktust, sztrókot, szisztolés elégtelenséget okoz [127]. A köztes kezelési módok közül leggyakoribb a 0,5-1% koleszterint tartalmazó diéta alkalmazása, 8-20 héten keresztül, az idő előrehaladtával a kardiovaszkuláris károsodás progrediál. Ekkor az ateroszklerózis már manifeszt, átmeneti iszkémia alakulhat ki, ugyanakkor szisztolés funkciók nem, vagy csak kevésbé károsodottak, a diasztolés diszfunkció viszont már kifejezett (relaxációs zavar és töltőnyomás-emelkedés), továbbá hipertrófia jelentkezik [128, 129]. A hiperkoleszterinémia mind emberben, mind állatmodellekben aorta-sztenózissal is együtt jár. Nyúl modellen a kísérletes ateroszklerózis az aortabillentyű súlyos sztenózisát okozza (megvastagodás, makrofág infiltráció és mineralizáció is megjelenik) [130]. Ez a szívizomra ható utóterhelés mértékét jelentősen fokozza, nagyban hozzájárulva a kardiális diszfunkció és hipertrófia kialakulásához [111]. Így a HC nyúl modell az ateroszklerózis és ISZB vizsgálatán kívül a következményes kardiális diszfunkció vizsgálatára is alkalmazható, természetesen a limitációk és korlátok figyelembevételével.

2.7. Célkitűzések

A fentiek alapján munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A 2-es típusú diabétesz mellitusz során kifejlődő kardiális diszfunkció értékelése Goto-Kakizaki patkánymodellen, valamint a BGP-15 gyógyszerjelölt kardiovaszkuláris hatásainak összehasonlítása ismert, pleiotróp hatású antidiabetikumokkal.

A modellválasztás alapja, hogy a Goto-Kakizaki non-obez patkánymodellen a diabétesz kardiális hatásai az egyéb befolyásoló rizikótényezők nélkül vizsgálhatóak. Kísérleteinkhez Wistar kontroll, diabéteszes GotoK, valamint BGP-15-, metformin- és pioglitazon-kezelt GotoK állatokat alkalmaztunk; echokardiográfiával vizsgáltuk a szisztolés és diasztolés paramétereket, értékeltük az endothel-függő vazorelaxációt, illetve monitoroztuk a PKG útvonal aktivitását a VASP protein foszforilációján keresztül, továbbá meghatároztuk a SERCA2a, foszfolambán és PDE9A proteinek expresszióját.

2. Az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció részletes echokardiográfiás leírása hiperkoleszterinémiás CAL-NZW nyúl modellen, az endothel-függő vazorelaxáció és a cGMP-PKG-PDE9A jelátviteli útvonal vizsgálatával.

A modellválasztás alapja, hogy a nyúl modell szívének élettani sajátosságai a kis rágcsálókénál jobb hasonlóságot mutatnak az emberével, továbbá, nyúlban a kísérletes hiperkoleszterinémia igen gyorsan manifest ateroszklerózist és kardiális diszfunkciót indukál. A vizsgálatokhoz egészséges kontroll és aterogén étrenden tartott (HC) nyulakat használtunk fel, majd hagyományos-, Doppler- és STE echokardiográfiával értékeltük a szívfunkciót, meghatároztuk az endothel-függő vazorelaxációt, vérvételt és szövettani festéseket végeztünk, továbbá monitoroztuk a cGMP-PKG jelátviteli útvonal aktivitását, végül a VASP és PDE9A fehérjék expresszióját.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Állatmodellek és kísérleti elrendezés

3.1.1. A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell

A patkánymodelleken végzett vizsgálatokhoz Goto-Kakizaki altörzsből származó diabéteszes állatokat, kontrollként pedig ennek háttéréből, a Wistar törzsből származó egészséges patkányokat használtunk. A patkányokat a Charles River Laboratories Inc. disztribútortól, az AnimaLab Kft-től szereztük be (Vác, Magyarország). Az állatok beérkezésükkor 12 hetesek voltak, mindegyikük hím. A kezelések megkezdése előtt 2 hét akklimatizációs időt biztosítottunk. A patkányokat a hatályos előírásoknak megfelelően forgáccsal naponta almozott, környezetgazdagított ketrecekben helyeztük el, egy ketrecben 3-4 állatot tartva. Az állatházban állandó hőmérsékletet és 12-12 órás sötét-világos periódusokat biztosítottunk, az állatoknak szabad hozzáférésük volt a standard rágszálótáphoz és ivóvízhez. Az Európai Unió 2010/63/EU azonosítószámú előírásának megfelelően minden állat humánus bánásmódban részesült, kezelésüket és a kísérleti procedúrákat megfelelő szakképesítéssel rendelkező személyzet végezte, a tanulmányt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága 25/2013 DEMÁB számmal vette nyilvántartásba, valamint a Hajdú-Bihar Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte.

3.1.2. A Goto-Kakizaki patkánymodell-tanulmány kísérleti protokollja

A 12 hetes GotoK és Wistar patkányokat beérkeztetésük után 2 héttel random módon 5 alcsoportra osztottuk ($n=6$ /csoport): (I) *egészséges* Wistar (Kontroll) csoport, vivőanyag-kezelés; (II) GotoK *diabéteszes* csoport, vivőanyag-kezelés („*hatóanyaggal* *kezeletlen csoport*”); (III), GotoK+BGP15 csoport, napi 10 mg/ttkg perorális BGP-15-kezelés; (IV) GotoK+MET csoport, napi 100 mg/ttkg perorális metformin-kezelés; (V) GotoK+PIO csoport, napi 10 mg/ttkg perorális pioglitazon-kezelés. A kezelések megkezdése előtt az állatok farokvénájából vért vettünk a szérum glükóz- és inzulin-szintek meghatározásához. Az állatok súlyát minden héten lemértük a pontos hatóanyag-dózisok kiszámításához. A kezeléseket orális szondázással („gavage”) végeztük, minden reggel, 12 héten keresztül. A végpontban vért gyűjtöttünk a farokvénából, majd echokardiográfiás vizsgálatot végeztünk. Ezután mély (100/10 mg/ttkg) ketamin-xylazin anesztézia alatt thoracotomiát végeztünk, a szívet kimetszettük, Ca^{2+} -mentes Krebs-oldatban feldaraboltuk, majd a pitvarokat és kamrákat

azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80 °C-on eltároltuk. A kimetszett aorta thoracicát jéghideg Krebs-oldatban szállítva rögtön felhasználtuk az *ex vivo* endothel-függő vazorelaxáció vizsgálatához. A protokollt az 5. ábra felső panelje szemlélteti.

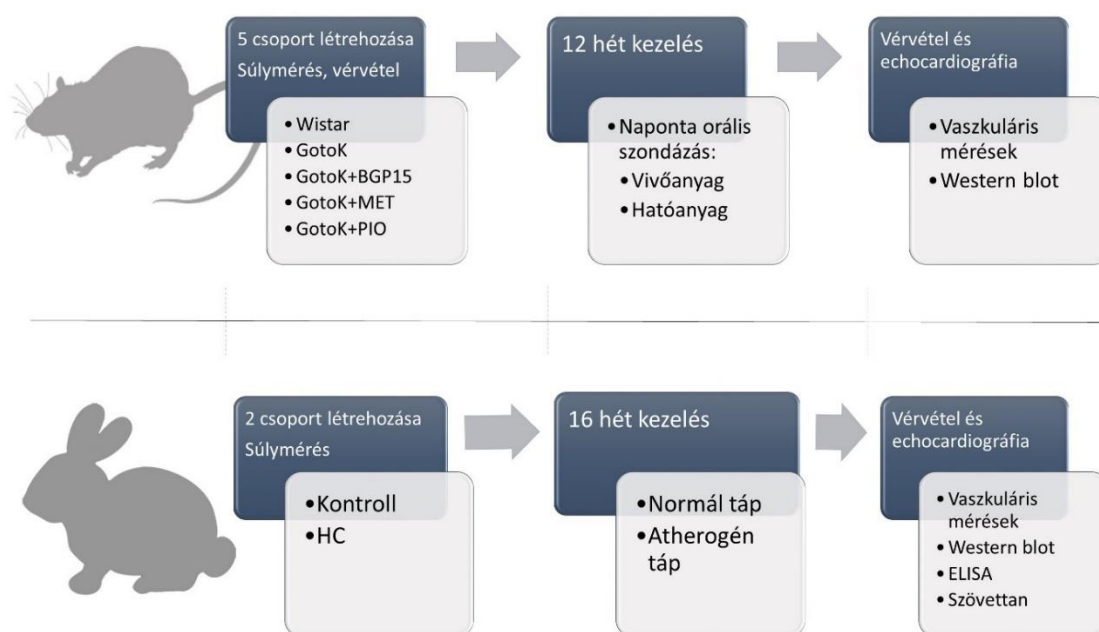
3.1.3. A hiperkoleszterinémias (HC) nyúl modell

A kísérletek második fázisához 2700-3000 g súlyú, 20 hetes hím nyulakat használtunk fel, melyeket a Juráskó Kft-től (Debrecen) szereztünk be. Az általunk felhasznált nyulak a New-Zealand fehér (NZW) és a Kaliforniai (CAL) fajták keresztezéséből származtak, emiatt a szokásosan használt New-Zealand fajtához képest eleve nagyobb testzsírszázalékkal rendelkeznek, illetve hízekonyabbak [131]. Mivel a kísérleteinknél elsődleges cél volt a koleszterin-értékek emelése, feltételeztük, hogy ezen nyúlfajta használata előnyösebb lehet, mint a hagyományosan használt New-Zealand állatok bevonása. A nyulakat standardizált körülmények között, előírt méretű és kialakítású ketrecekben tartottuk, 12-12 órás világos-sötét periódusokkal, és a mérések megkezdése előtt 2 hét akklimatizációs időszakot biztosítottunk számukra, amely alatt normál rágcsálótápot és csapvizet kaptak *ad libitum*. A Kontroll csoport normál rágcsálótápot kapott (összetétele: 15,51 % fehérje, 3,9 % zsír, 17,51 % élelmi rost, 0,90 % kalcium, 0,66 % foszfát, 25,02 mg/kg A-vitamin, 0,18 % só), míg a hiperkoleszterinémias (HC) csoportot „aterogén” diétára állítottuk. Az ún. aterogén rágcsálótáp a normál táphoz képest 1 % hozzáadott koleszterint és 1 % hozzáadott telített zsírt tartalmazott, melyet a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológiai tanszékének kisüzemében állítottunk elő, a normál dúsításával és táp re-granulálásával. Az egyes egyedeket a fül belső oldalára a tenyésztő által tetovált egyedi azonosítószám alapján tudtuk megkülönböztetni. A laboratóriumi állatok humánus bánásmódban részesültek, továbbá az összes kísérletet a 2010/63/EU irányelvvel, valamint a „Principles of Laboratory Animal Care” előírásaival összhangban végeztük, és azokat a Hajdú-Bihar Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte (25/2013 DEMÁB; 2014 január 29.).

3.1.4. A nyúlmodell-tanulmány protokollja

Az állatokat a beérkezésük után 2 héttel (akklimatizáció), véletlenszerűen 2 csoportra osztottuk: A Kontroll (I) csoport (n=9) normál rágcsálótápot kapott; a HC (II) csoport (n=9) pedig aterogén tápot, 4 hónapon keresztül. Az állatok súlyát a kezdeti- és a végpontban is regisztráltuk (0. és 16. hét). A végpontban vérvétel történt az állatok marginális fülvénájából, majd echokardiográfiás vizsgálatot végeztünk. Ezután „mély” anesztézia alatt (ketamin-

xylazin, 100/10 mg/ttkg) thoracotomiát végeztünk, majd szervmintákat izoláltunk Ca^{2+} -mentes Krebs-oldatban (szív, bal kamra, aorta thoracica, vese, tüdő), morфомetriai vizsgálatokhoz. Az aorta thoracicát kimetszettük, a felső szakaszát 4%-os formalin-oldatban eltároltuk, az alsóbb szakaszt pedig jéghideg Krebs-oldatba helyeztük, majd azonnal felhasználtuk az *ex vivo* vaszkuláris mérésekhez. A bal kamrát folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk a későbbi molekuláris biológiai mérésekhez. A protokollt az 5. ábra alsó panelje szemlélteti.



5. ábra: Kísérleti elrendezések. A diabéteszes patkányokon végzett tanulmány során 5 kezelési csoportot hoztunk létre, 12 hét után végeztük a végponti vizsgálatokat (felső panel). A nyúlmodell-kísérlet során 2 kezelési csoportot alkottunk, és 16 hét elteltével végeztük el a végponti méréseket (alsó panel).

3.2. Felhasznált anyagok és vegyszerek

Minden reagens, alapanyag, antitest, só és pufferoldat, melyeket a Western blot vizsgálatok, szövettani festések és assay-k során használtunk, a Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Németország) vagy az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) beszállítóktól érkezett.

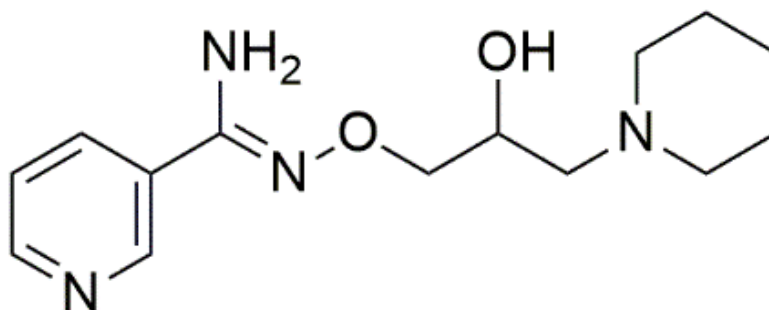
Az *ex vivo* vaszkuláris vizsgálatokhoz norepinefrin-hidrokloridot (Arterenol®), acetil-kolin-kloridot és adenzin 5'-trifoszfát-hidrátot, valamint módosított Krebs-puffert

használtunk. A Krebs-oldat összetétele: 118 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l NaH₂PO₄, 1,2 mmol/l MgCl₂, 24,9 mmol/l NaHCO₃, 11,5 mmol/l glükóz, és 0,1 mmol/l aszkorbinsav; bidesztillált vízben oldva és karbogén gázzal szellőztetve. A vaszkuláris vizsgálatokhoz használt gyógyszerhatóanyagokat ebben a pufferben oldottuk fel vagy hígítottuk ki.

A szervmintákat (aorta, szívizom, vese, máj) CaCl₂-mentes Krebs-pufferben izoláltuk a további felhasználáshoz.

A Goto-Kakizaki állatok kezeléséhez felhasznált metformin-hidrokloridot és pioglitazon-hidrokloridot, valamint a BGP-15-öt (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim, vagy IUPAC szerint: N-[2-Hydroxy-3-(1-piperidinyl)propoxy]-3-pyridine- carboximidamide dihydrochloride) Sigma-Aldrich-Merck Kft-től (Darmstadt, Németország) szereztük be (6. ábra). A Az orális szondázáshoz („gavage” technika) a hatóanyagokat hidroxietil-cellulóz nyák és desztillált víz 1:5 elegyében oldottuk fel, minden kezelés előtt, frissen.

A fehérje-izoláláshoz és Western blothoz, valamint az egyéb technikákhoz felhasznált vegyszerek, pufferoldatok és antitestek a megfelelő módszerhez tartozó fejezetekben kerülnek ismertetésre.



6. ábra. A hidroximsav-származék BGP-15 szerkezeti képlete (saját ábra; készült: ChemDraw Ultra ver.12. szoftver, CambridgeSoft, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, U.S.). A bázis 2 mol sósavval kristályosodik (* 2 HCl, az ábrán nincs feltüntetve).

3.3. Morfometria, vérvétel és metabolikus paraméterek meghatározása

A patkányok súlyát hetente lemértük, a pontos hatóanyag-dózisok kiszámítása végett (0.-12. hét). A kezdeti- és végpontban, egy éjszakán át tartó éheztetés után a farokvénából vérvétel történt, majd a szérum glükózt Accu-Chek vércukormérővel (Roche Diagnostics, Risch, Svájc)

határoztuk meg. A maradék mintát 4 °C-on, 2 percig 10000 rpm-en centrifugáltuk, a plazmát lefagyasztottuk és -80 °C-on eltároltuk. A plazma inzulin szintet radioimmunoassay (RIA) kittel határoztuk meg (RK-400CT, Magyar Tudományos Akadémia Izotópkutató Intézet). A HOMA-IR indexet (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) az alábbi képlettel határoztuk meg: $\text{HOMA-IR} = \text{éhomizulin } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{éhomiglükóz } (\text{mmol/ml}) / 22,5$; míg bétasejt funkciót (HOMA-B index) a következő formulával: $\text{HOMA-B} = 20 \times \text{éhomizulin } (\mu\text{IU/ml}) / \text{éhomiglükóz } (\text{mmol/ml}) - 3,5$ [132].

A másik kísérletsorozatban a nyulak súlymérését a kezdeti és a végpontban végeztük el (0., 16. hét.). A 16. hét leteltével egy éjszakán át tartó éheztetés után vért vettünk a marginális fülvénából Vacutainer Plast SSTII csövekbe (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A szérumban lipid- és inzulin-szintek, májenzimek és egyéb markerek meghatározása a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetének jóvoltából történt. Az inzulin szintet Liaison XL DiaSorin platformon (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA) határozták meg. A többi „rutin” paramétert Roche Cobas Integrated Platform (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) rendszer segítségével mérték. A meghatározott lipidparaméterek: összkoleszterin (TChol), low-density lipoprotein (LDLc), high-density lipoprotein (HDLc), apolipoprotein A és B (ApoA és ApoB), valamint triglicerid (TG). Májenzimek: aszpartát-transzamináz (AST) és alanin-transzamináz (ALT). Egyéb markerek: kreatinin, troponin T, kreatin-kináz MB izoforma (CK-MB) és C-reaktív protein (CRP). Az aterogén-index (összkoleszterin/HDLc) és ApoB/ApoA arány kiszámítását is elvégeztük. A szérumban NT-pro-BNP-t „sandwich electrochemiluminescence immunoassay” (ECLIA) módszerrel határozták meg, Roche Cobas Integrated Platform segítségével.

A nyúl-kísérlet végpontjában mély anesztézia alatt (ketamin/xylazin, 75/5 mg/ttkg) végzett thoracotomia után a szívet izoláltuk, tömegét lemértük, majd a papilláris izmok magasságában elmetsettük, az apikális részt 4%-os formalin-oldatba helyeztük, a bal kamra egy darabját (mindig ugyanazon régióból) pedig azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és -80 °C-on eltároltuk a későbbi molekuláris biológiai technikákhoz. A vese- és tüdőminták tömegét lemértük (nedves tömeg), majd szárítószekrényben 60 °C-on egy éjszakán át teljesen kiszáritottuk, és a tömegüket újra lemértük (száraz tömeg). Az aorta thoracica felsőbb harmadát 4 %-os formalinba helyeztük a későbbi szövettani festésekhez. A jobb tibia kimetszettük, megtisztítottuk, majd a hosszát (cm) lemértük, így az egyes szervek tömegét – a testtömeg mellett - tibia-hosszra is tudtuk normalizálni.

3.4. Echokardiográfia

Az transztorakális echokardiográfias képalkotást (TTE) GE Vivid E9 ultrahang-készülékkel végeztük (GE Healthcare, New York, USA) mindkét állatmodell esetében, azonban más-más transzducerrel és beállításokkal. A patkánymodell vizsgálatához i13L típusú, ún. lineáris transzducert használtunk, 14 MHz frekvencián. A patkányokat előzetesen elbódítottuk ketamin-xylazin kombinációval (i.m., 50/5 mg/ttkg), majd a mellkasi szőrzetet elektromos szőrníróval eltávolítottuk, és az állatokat háton fekvő helyzetbe pozícionáltuk. A nyúl modell esetében 12S-D „szektor” típusú transzducert használtunk 12 MHz frekvencián. Az anesztéziát ketamin-xylazin kombinációval végeztük (i.m., 35/3 mg/ttkg), a sternalis szőrzetet eltávolítottuk, és az állatokat oldalt fekvő helyzetbe helyeztük. Ettől a ponttól a két állatmodellen ugyanazt a képalkotási protokollt követtük, összhangban az American Society of Echocardiography ajánlásával [78, 133]. Elsőként parasternalis hossz tengelyi metszetben (PLAX) 2D és M-mód echokardiográfiával vizualizáltuk az aortát és a bal kamrát, valamint a pitvart. A papilláris izmok magasságában M-mód felvételt készítettünk a falvastagságok és a bal kamra üregének meghatározásához szisztolében és diasztolében (bal kamrai hátsó fal vastagsága, interventrikuláris szeptum vastagsága, bal kamra belső átmérője, frakcionált rövidülés és ejekciós frakció meghatározása). Az aortagyök fölött lementük az aorta átmérőjét, majd a pitvart a legnagyobb szélességénél. Ugyanezeket a felvételeket rövid tengelyi nézetből (SAX) is elkészítettük a pontosabb meghatározás végett. Ezután apikális 4 üregű metszetből lementük a mitrális billentyű szisztolés kitérését (mitral annular plane systolic excursion: MAPSE), majd Doppler módban (pulsatile wave: PW) a mitrális beáramlási sebességgörbét. Ebből a metszetből szöveti Doppler technikával (tissue Doppler imaging: TDI) meghatároztuk a laterális és a szeptális anulusok mozgási sebességét is a diasztolés funkció értékelésére. A bal kamrai kiáramlási traktus (left ventricle outflow tract, LVOT) sebesség- és nyomásgradienseit is meghatároztuk a Doppler technika alkalmazásával. A nyúl modell esetében apikális metszetekből 5 szívciklusnyi mozgóképet rögzítettünk a megfelelő *frame rate*-en, majd offline, az STE technika alkalmazásával *Globális Longitudinális Strain*-t (GLS) határoztunk meg, a kamrafal szegmenseinek manuális kijelölése után.

Az adatokat merevlemezen eltároltuk, majd EchoPAC PC szoftver (ver. 112, GE Healthcare, New York, USA) segítségével elemeztük. Néhány paramétert utólagos számítások segítségével származtattunk. TDI felvételekből nyert adatokból Tei-indexet számítottunk a következő képlettel: $Tei\ index = IVRT + IVCT / ET$; amely a bal kamrai globális teljesítményt jellemzi [134]. A bal kamra tömegét az alábbi egyenlet segítségével kalkuláltuk: $LV_{mass} =$

$0.8(1,04((LVIDd + IVSd + LVPWd)^3 * LVIDd^3))) + 0.6$; ahol LVIDd: bal kamrai végdiasztolés átmérő, IVSd: interventrikuláris szeptum átmérője diasztolében, LVPWd: bal kamrai posterior fal vastagsága diasztolében. A bal kamrai remodeláció geometriáját a relatív falvastagság (relative wall thickness, RWT) számításával becsültük meg: $RWT = 2(LVPWd)/LVIDd$; ahol a megnövekedett RWT koncentrikus remodelációt feltételez [78]. Az eredményeket táblázatos összefoglalás után statisztikai program segítségével értékeltük.

3.5. Vaszkuláris mérések

A vaszkuláris funkciós méréseket thoracotomiát követően végeztük el mindkét állatmodell esetében. A kísérletek végpontjában az állatokat i.m. ketamin-xylazin kombinációval (patkány: 100/10 mg/ttkg; nyúl: 75/5 mg/ttkg) mély anesztézia alá helyeztük, majd a mellkast feltártuk (3.1. fejezet). A szív kimetszése után az abdominális aorta proximális részét azonnal jéghideg Krebs-oldatba helyeztük, majd 2 mm vastagságú gyűrűket készítettünk (minden állat esetében 4 gyűrűt). Az érgyűrű preparátumokat 10 mN előfeszítéssel egy rugós erőmérő műszerhez kötöttük egy 10 ml-es, Krebs-puffert tartalmazó szervkádban (Experimetria TSZ-04, Experimetria Kft, Budapest), melyet karbogén gázzal szellőztettünk (95% O₂ és 5% CO₂ elegye, 36 °C; 7,4-es pH-n). Az érgyűrű izomkötegeinek izometrikus kontraktilis erejét transzducer (Experimetria SD-01) és rugós erőmérő (Experimetria SG-01D) segítségével mértük, és poligráfon (Medicor R-61 6CH Recorder, Budapest) regisztráltuk.

Egy 60 perces inkubációs periódust követően noradrenalin (NA) koncentráció-hatás görbét vettünk fel (0,1 nmol/l – 1 μmol/l-ig), és meghatároztuk a félhatásos koncentrációt (EC₅₀). Ezt követően egy 60 perces mosási periódus következett, majd újra noradrenalint adtunk a rendszerhez, éppen a félhatásos koncentrációban. Miután a kontraktilis erő stabilizálódott (pre-kontrahált állapot), acetyl-kolin (ACh) koncentráció-hatás görbét vettünk fel (0,1 nmol/l – 1 mmol/l-ig), az endothel-függő vazorelaxáció mértékének meghatározásához (az eljárás élettani alapja, hogy acetyl-kolin az eNOS aktiválásával NO-t szabadít fel az endotheliumból). Mosás után újra noradrenalin-prekontrakció következett, majd ATP koncentráció hatás-görbét (0,1-100 μmol/l) is föl vettünk (csak a nyúlmodell esetében).

Az egyes állatokból származó érgyűrűk adatait átlagoltuk. A noradrenalin hatását a kontraktilis erő növekedésében mértük (az 10 mN előfeszítéshez képest). Az ACh és ATP hatását az eredeti feszülés (NA prekontrakció) százalékos változásában fejeztük ki és ábrázoltuk.

3.6. Szövettani festések

Szövettani festéseket a hiperkoleszterinémiás nyúl modell kísérletek során végeztünk. A 4%-os formalin-oldatban fixált aorta-mintákból paraffinba ágyazás után 7 μm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk a HE-festéshez. Deparaffinálás után (xilol, majd alkohol-sor), 15 másodperce hematoxin-oldatba helyeztük a metszeteket, majd differenciálás (10 perc csapvizet mosás) után 0,1%-os eozinoldattal és 1 csepp 2%-os ecetsavval 4 percig inkubáltuk. 96%-os etanolos öblítés után a metszeteket víztelenítettük abszolút alkoholban, majd fedőlemezrel lefedtük. Az intima és media vastagságának fénymikroszkóp (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország), illetve morfolometriás szoftver (Scion Corp., Torrance, CA, USA) segítségével történő meghatározása után intima/media arányt határoztunk meg.

A fibrotikus szövetek kimutatásához a miokardium-mintákon Masson's trichrome festést alkalmaztunk, a gyártó (Sigma-Aldrich) protokollja szerint. Röviden: deparaffinálás után (xilol, majd alkohol-sor) után Bouin's oldatban refixáltuk a metszeteket (7 μm), majd 10 perces csapvizet mosás következett, ezután vas-hematoxilinnal 10 perces inkubálás és újra csapvizet mosás. Ezt követően 10 percig Biebirch (savas fukszin) festékben 10 perc inkubálás, mosás, majd differenciálás következett egy speciális savban (foszfor-molibdén/foszfor-wolfrám-sav). A kollagén kék színét ezután anilin-kék festék és 1%-os ecetsav hozzáadásával érték el. Végül a metszeteket víztelenítettük abszolút alkoholban, majd lefedtük.

3.7. Western blot vizsgálatok

A Western blot analízist mindkét állatmodell esetében bal kamrai miokardiumból izolált fehérje-mintákon (300 mg) végeztük el, továbbá – a nyúlmodell esetében – aorta thoracica mintákat (100 mg) is felhasználtunk (csak a PDE9A expressziójának méréséhez). A fehérje-izoláláshoz a mélyfagyasztott szövetekből késsel homogenizátor (T10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) és proteáz-inhibitor tartalmú standard homogenizáló puffer segítségével fehérje-homogenizátumot készítettünk. A minták teljes fehérjekoncentrációját spektrofotométer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével, BCA-módszerrel határoztuk meg, miután ismert koncentrációjú BSA-fehérjéből hígítási sor készítettünk és abszorbancia-koncentráció standard egyenest vettünk fel. A homogenizátumokból Laemmli-puffer hozzáadásával készítettük el a végleges, vizsgálandó izolátumokat. A mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel szeparáltuk (120 V, 70-90 perc), majd a géleket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V, 90 perc). A

membránok szabad kötőhelyeit 120 percig TBS-T (tris-buffered saline: Trisz(hidroximetil)-aminometán hidroklorid sója (Tris-HCl), NaCl és Tween®-20 elegye) puffében feloldott 5%-os BSA-ban blokkoltuk, majd a kérdéses fehérjének megfelelő primer antitestekkel 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A primer antitesteket (egérben, vagy nyúlban termeltetett) a Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Németország) és az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) gyártóktól szereztük be. A primer antitestek a következő fehérjékre voltak specifikusak: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), foszfodiészteráz 9A (PDE9A), Protein Kináz G (PKG), vazodilatátor-stimulált foszfoprotein (VASP), ^{Ser239}foszfo-vazodilatátor-stimulált foszfoprotein 16C2 klón (pVASP), szarko/endoplazmatikus retikulum ATPáz 2a (SERCA2a), foszfolambán (PLB), ^{Ser16}foszfo-foszfolambán (pPLB). A foszforilált fehérjéket detektáló primer antitestekből azokat választottuk, melyeknél a gyártó garantálta, hogy kizárólag az adott aminosavon foszforilált fehérjét ismeri fel, a teljes, foszforilálatlan formát nem. Az antitesteket a beszállító által javasolt koncentrációkban, tipikusan 1:1000 – 1:5000 hígításban alkalmaztuk. A protokoll második napján 3*15 perc TBS-T mosás után a membránokat a megfelelő (anti-egér, vagy anti-nyúl) szekunder, HRP-konjugált (*horse-raddish peroxidase*, tormaperoxidáz enzim-kapcsolt) antitestekkel (1:10 000) inkubáltuk 90 percig, 3% BSA-t is tartalmazó TBS-T pufferben. Mosást követően 3 ml ECL-szubsztrátot (Enhanced Chemiluminescent Substrate) csepegtettünk a membránokra (2 percig), mely a tormaperoxidáz hatására fényt emittál, így az egyes jelölt proteinek detektálhatóvá váltak C-Digit® blot szkennerek és Image Studio Digits ver. 5.2. szoftver (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) segítségével. Az egyes fehérjék expressziós szintjét a detektált fény intenzitásából származó pixel-denzitás jelezte. Denzitometriás analízis után a keresett fehérjék képének pixel-sűrűségét minden minta esetében a megfelelő, azonos mintából származó háztartási-fehérje, a GAPDH pixel-denzitására normalizáltuk. Az adatokat 3 megismételt kísérletből átlagoltuk, majd statisztikailag elemeztük és ábráztuk.

3.8. Miokardiális cGMP-szint meghatározása immunoesszéval

A miokardiális cGMP-szintet a nyúl modell esetében tudtuk meghatározni, bal kamrai mintákból, direkt kompetitív immunoesszé segítségével (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). A módszerhez a gyártó által biztosított standard cGMP-ből hígítási sort készítettünk, és a miokardium-mintákat 0,1 M-os sósavban homogenizáltuk. A méréseket G-proteinnel bevont (antitestet kötő), speciális 96-üregű *plate*-en, spektrofotométer segítségével végeztük. A módszer kompetíción alapul, a mintában található ismeretlen mennyiségű cGMP verseng a hozzáadott standard HRP-konjugált cGMP-vel, a cGMP-specifikus antitest szabad

kötőhelyeiért. Kimosás és HRP-szubsztrát hozzáadása után az optikai denzitást 450 nm-en leolvastva (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország), az abszorbancia fordítottan arányos a minta cGMP-koncentrációjával. A méréseket $n=6$ /csoport mintán, duplikálva végeztük el, majd az adatokat átlagoltuk, és a gyártó által megadott egyenlet segítségével „pmol/mg szövet”-ben fejeztük ki.

3.9. Statisztikai számítások és ábrázolás

A táblázatokban és az ábrákon a leolvasható adatokat $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ -ben (*standard error of the mean*) adtuk meg. Az adatokat elsőként normalitás-vizsgálatnak vetettük alá (D’Agostino-Pearson omnibus normalitás-teszt). Ha csak 2 csoportot hasonlítottunk össze (nyúlmodell-kísérletek) kétmintás, páratlan t -próbát (*Student’s t-test*) alkalmaztunk, illetve, ha az adatok nem normál-eloszlást követtek, Mann-Whitney tesztet használtunk a különbségek megállapítására. A több csoport összehasonlítását igénylő statisztikai elemzésekhez (patkánymodell-kísérletek) a kis elemszám ($n = 6$) miatt Kruskal-Wallis tesztet használtunk, Dunn’s post-hoc analízissel. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke 0,05-nél kisebb, továbbá, a *-ok számával jeleztük a szignifikancia szintjét a kontrollhoz képest (illetve #-tel a kezeletlen beteg csoporthoz képest), ahol: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; és ****: $p < 0.0001$. (A jelölési módok magyarázata az egyes ábrák fülszövegében is megtalálható.)

4. Eredmények

4.1. A Goto-Kakizaki patkánymodell-kísérletek eredményei

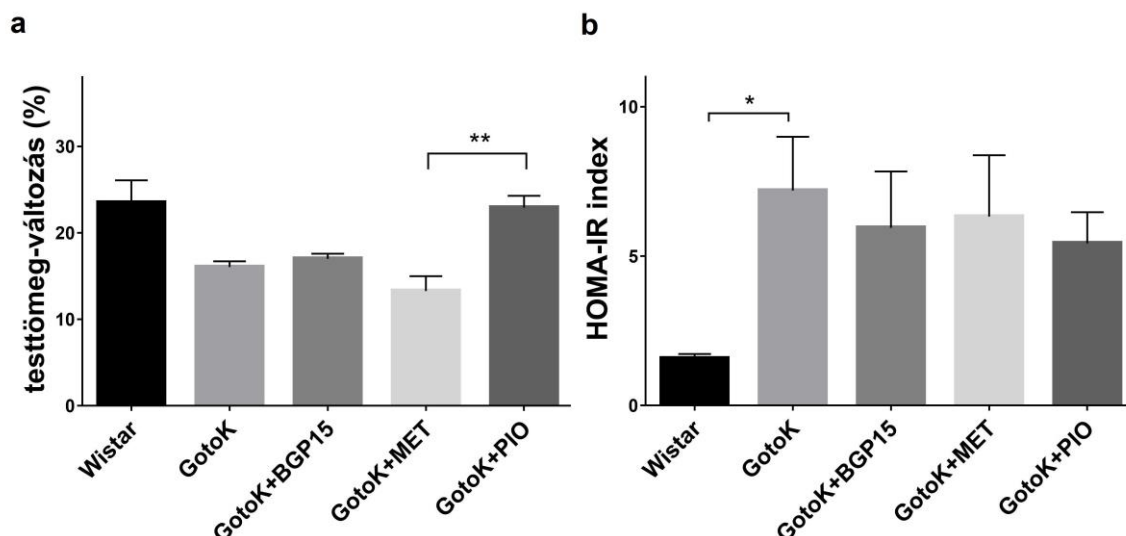
4.1.1. Metabolikus paraméterek

A kontrollként használt Wistar, és a diabéteszes Goto-Kakizaki patkányok testsúly-változása, az éhomi glükóz- és inzulin szintek¹, továbbá az inzulin-rezisztencia meghatározására szolgáló HOMA-IR index az 3. táblázatban és a 7. ábrán láthatóak. A véletlenszerű csoportbaosztás ellenére a GotoK állatok (különösen a GotoK+MET csoport) kezdeti testtömege alacsonyabb volt a korban illesztett Wistar kontroll állatokénál, az irodalmi adatokkal egyezően [135]. A metformin-kezelt állatok testsúlya gyarapodott a legkisebb mértékben a kezelések végére (12. hét), míg a pioglitazon-kezelt patkányok súlya nőtt leginkább, így a végpontra ezen két csoport állatainak tömege szignifikánsan eltért (7. ábra). Az éhomi plazma-glükóz minden GotoK állatban emelkedett volt a Wistar kontrollhoz képest, továbbá, habár minden antidiabetikum csökkentette a glükóz-szintet, csak a pioglitazon-kezelt állatok értékei mutatkoztak szignifikánsan alacsonyabbnak a GotoK csoportéhoz viszonyítva. A GotoK állatok HOMA-IR indexe szignifikánsan nőtt a Wistar kontroll csoport HOMA-IR értékéhez képest, mely inzulin-rezisztenciát jelez.

	Éhomi glükóz (mmol/l)	Éhomi inzulin (μIU/ml)	Kezdeti testtömeg (g)	Végponti testtömeg (g)
Wistar	6,280±0,4283	5,850±0,1323	407,8±3,798	539,8±22,45
GotoK	13,62±0,6256*	12,53±3,292	313,8±4,070*	374,0±6,266*
GotoK+BGP15	10,92±0,5607	12,30±3,793	318,3±5,566	383,8±9,024
GotoK+MET	11,20±1,002	12,82±4,104	312,7±5,655*	361,7±12,27*
GotoK+PIO	7,880±0,3121#	14,83±2,768	316,3±3,658	411,3±10,40

3. táblázat. A Wistar és a GotoK patkányok testsúlya és éhomi glükóz- és inzulin plazmaszintjei. A GotoK diabéteszes állatok plazma glükóz szintje emelkedett volt, a pioglitazon-kezelt állatok glükóz értékei szignifikánsan csökkentek a kezelések végére. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc teszttel. *: vs. Wistar; #: vs. GotoK ($p < 0,05$)

¹ Az inzulin-szint és HOMA-IR meghatározása társszerzők (N.J., B.M.) munkája, a többi adat saját eredmény

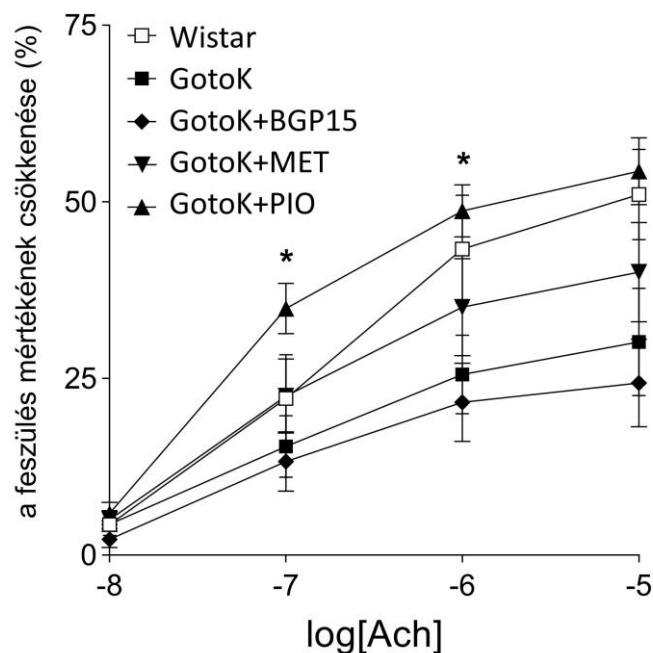


7. ábra. Metabolikus paraméterek. Az „a” panel az állatok testsúlyának változását szemlélteti a kezdeti- és végpont (0. és 12. hét) között. A pioglitazon-kezelt patkányok testtömege gyarapodott a legnagyobb mértékben. A „b” panel a HOMA-IR indexet szemlélteti, jól látható, hogy a GotoK állatok inzulinrezisztensek voltak. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, $n=6$ /csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn’s post-hoc teszttel. A *-ok szignifikancia szintjét jelölik (vs. Wistar); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.1.2. Endothel-függő vazorelaxáció

Az izolált aortákon végzett kísérletek eredményei a 8. ábrán láthatóak². A Wistar állatok esetében 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú acetil-kolin az eredeti, 10 nmol/l noradrenalinral kiváltott előfeszülés mértékében mintegy 50 %-os csökkenést okozott. A GotoK csoport állataiban csökkent az acetil-kolin által előidézett vazorelaxáció (mintegy 25 %) a Wistar állatokhoz viszonyítva, de ez nem érte el a szignifikancia szintjét az alkalmazott koncentráció-tartományban (valószínűleg a kis elemszám miatti statisztikai próba szigorúsága miatt). A BGP-15- és metformin-kezelések nem okoztak szignifikáns változást az endothel-függő relaxáció mértékében (a metformin-kezelés esetében tendencia megfigyelhető), ezzel ellentétben a pioglitazon-kezelés szignifikánsan növelte az Ach-ra adott választ a kezeletlen GotoK csoporthoz viszonyítva, 100 nmol/l és 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációkban.

² Az izolált aortán végzett kísérlet társszerző (G.R.) munkája, az eredmények értékelése részben saját munka



8. ábra. Endothel-függő vazorelaxáció. Az acetil-kolin egyre növekvő koncentrációkon csökkenti az érgyűrű feszülését. A kezeletlen GotoK állatokban az Ach-ra adott válasz kismértékben csökkenni látszott, ellenben a pioglitazon-kezelt csoportban a vazorelaxáció szignifikánsan magasabb a GotoK-hoz viszonyítva. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, egyutas variancia-analízis, Geisser-Greenhouse korrekcióval és Tukey poszt-tesztel. *: GotoK+PIO vs. GotoK, $p < 0,05$.

4.1.3. Echokardiográfia, kardiális funkció

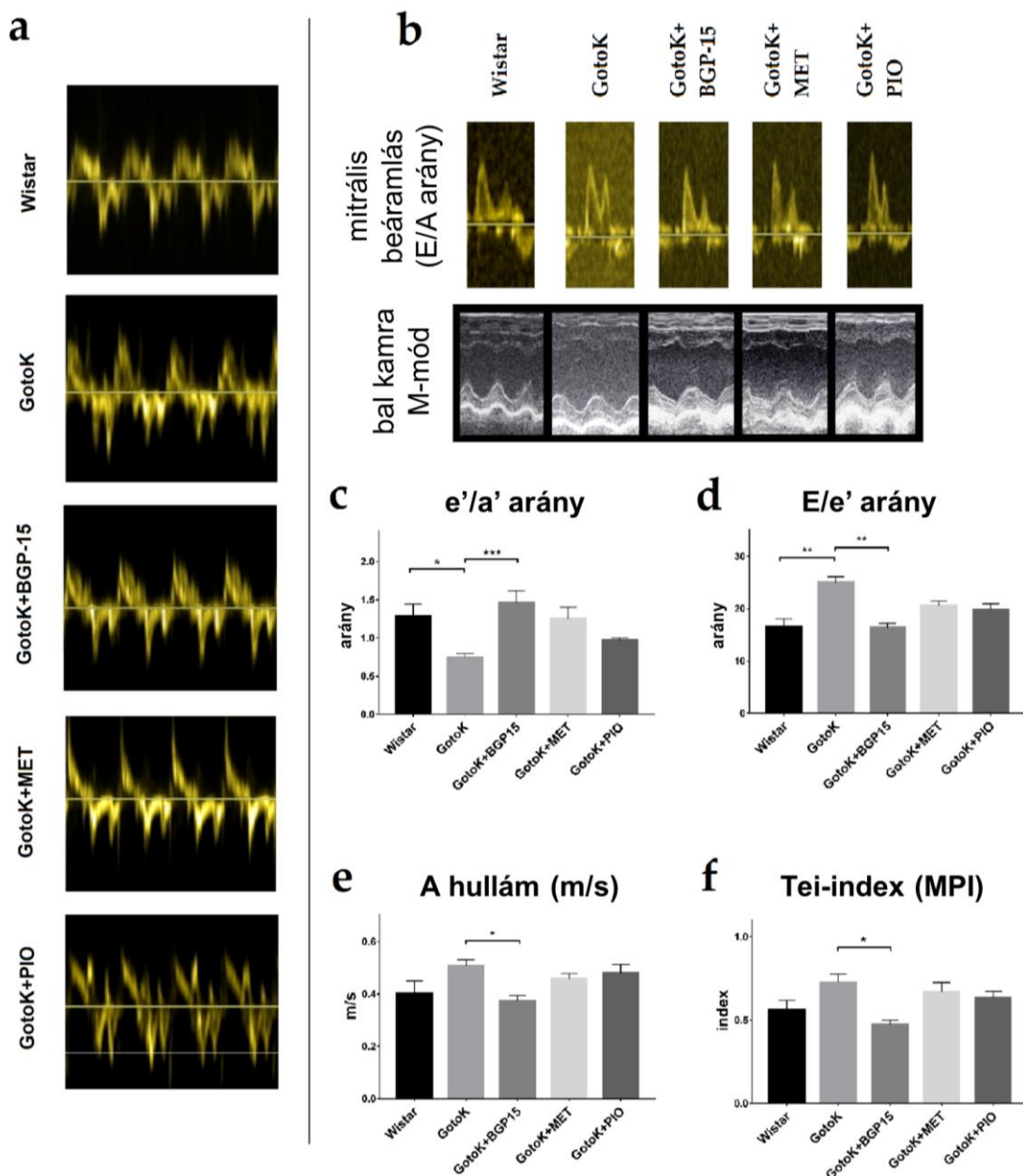
A 12. hét végére az echokardiográfiával értékelt diasztolés szívfunkció szignifikánsan romlott a GotoK csoportban a Wistar kontrollhoz képest (4. táblázat és 9. ábra)³. A diasztolés diszfunkciót jelzi a TDI-vel mért e'/a' arány megfordulása a GotoK csoportban ($p = 0,0386$ vs. Wistar), amely a kamrafal csökkent passzív elernyedési képességére utal. Ezt megerősíti az E hullám, valamint az E/e' arány szignifikáns növekedése ($p = 0,002$ és $p = 0,0045$ vs. Wistar), mely a megnövekedett kamrai töltőnyomást jelzi. Az ejekció időtartama (ET) jelentősen megrövidült a GotoK csoportban ($p = 0,05$ vs. Wistar), továbbá a kiáramlási pályán mért sebesség is emelkedett (LVOT Vmax). A fentebb leírt paraméterek mindegyike szignifikánsan változott a BGP-15-kezelt csoportban. Az e'/a' arány nőtt ($p = 0,0023$ vs. GotoK), az E és A

³ Az echokardiográfia kivitelezése és értékelése saját munka (témavezető jelenlétével)

hullámok magassága lecsökkent (a Wistar állatokéhoz hasonló értékre), az E/e' arány, tehát a töltőnyomás csökkent ($p = 0,0019$ vs. GotoK). Az ejekció időtartama megnőtt, ezáltal a Tei-index szignifikánsan javult ($p = 0,0147$ vs. GotoK), amely a globális kardiális funkció javulását jelzi. A szisztolés funkciót jelző paraméterek érdemben nem változtak a kezelések során. A metformin-kezelt csoportban az e'/a' arány, illetve a kiáramlási pálya sebessége megőrzött volt, de további paraméterek nem különböztek szignifikánsan a GotoK csoport értékeitől. A pioglitazon-kezelésnek egyáltalán nem volt hatása az echokardiográfiával meghatározott kardiális funkcióra.

Paraméter	Wistar	GotoK	GotoK+BGP-15	GotoK+MET	GotoK+PIO
LVIDd (mm)	7,267±0,278	6,918±0,167	7,243±0,183	6,483±0,425	7,323±0,400
LVIDs (mm)	4,365±0,201	4,515±0,095	4,69±0,193	3,940±0,200	4,478±0,345
FS (%)	39,94±1,474	33,27±1,667	37,62±0,727	38,85±1,715	39,21±1,608
EF (%)	68,92±1,813	60,36±2,343	66,13±0,891	67,94±2,068	67,98±2,110
MV E (m/s)	0,612±0,047	0,883±0,024**	0,648±0,021##	0,763±0,025	0,810±0,033
MV A (m/s)	0,402±0,048	0,507±0,023	0,372±0,022#	0,457±0,021	0,480±0,032
E/A arány	1,554±0,070	1,735±0,117	1,762±0,066	1,698±0,0840	1,645±0,089
MV DecT (ms)	53,83±3,692	62,33±2,883	55,00±3,759	58,00±3,425	53,00±3,162
e'/a' arány	1,284±0,158	0,744±0,056*	1,458±0,155#	1,249±0,153	0,968±0,032
E/e' arány	16,48±1,512	24,92±1,114**	16,31±0,918##	20,58±0,766	19,74±1,156
LVOT Vmax (m/s)	0,768±0,037	0,998±0,026**	0,780±0,029#	0,768±0,008#	0,812±0,039
IVCT (ms)	15,67±2,906	18,00±3,777	18,83±3,516	22,83±3,167	16,83±2,272
IVRT (ms)	32,50±1,258	30,33±3,007	32,50±1,057	35,17±1,515	34,00±1,438
LV ET (ms)	87,67±3,116	63,67±1,961*	101,7±3,703###	87,83±5,282	80,67±1,745
Tei-index (MPI)	0,558±0,058	0,724±0,051	0,471±0,027#	0,669±0,055	0,632±0,039
RV E (m/s)	0,332±0,026	0,497±0,044	0,368±0,034	0,383±0,048	0,364±0,027
RV A (m/s)	0,498±0,041	0,628±0,073	0,578±0,033	0,235±0,003#	0,356±0,074

4. táblázat. A patkánymodell-kísérletekből származó echokardiográfiás paraméterek (2D-, M-mód-, Doppler- és TDI-echokardiográfia). A GotoK állatok diasztolés funkciója romlott a kontrollhoz képest, míg a BGP-15-kezelt patkányok diasztológiája szignifikánsan javult, gyakorlatilag megőrzött maradt. A rövidítések magyarázata és a paraméterek által jelzett funkciók a Módszerek (3.4.) fejezetben került ismertetésre. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc teszttel. *: vs. Wistar ($p < 0.05$); **: vs. Wistar ($p < 0.01$); #: vs. GotoK ($p < 0.05$); ##: vs. GotoK ($p < 0.01$); ###: vs. GotoK ($p < 0.001$).

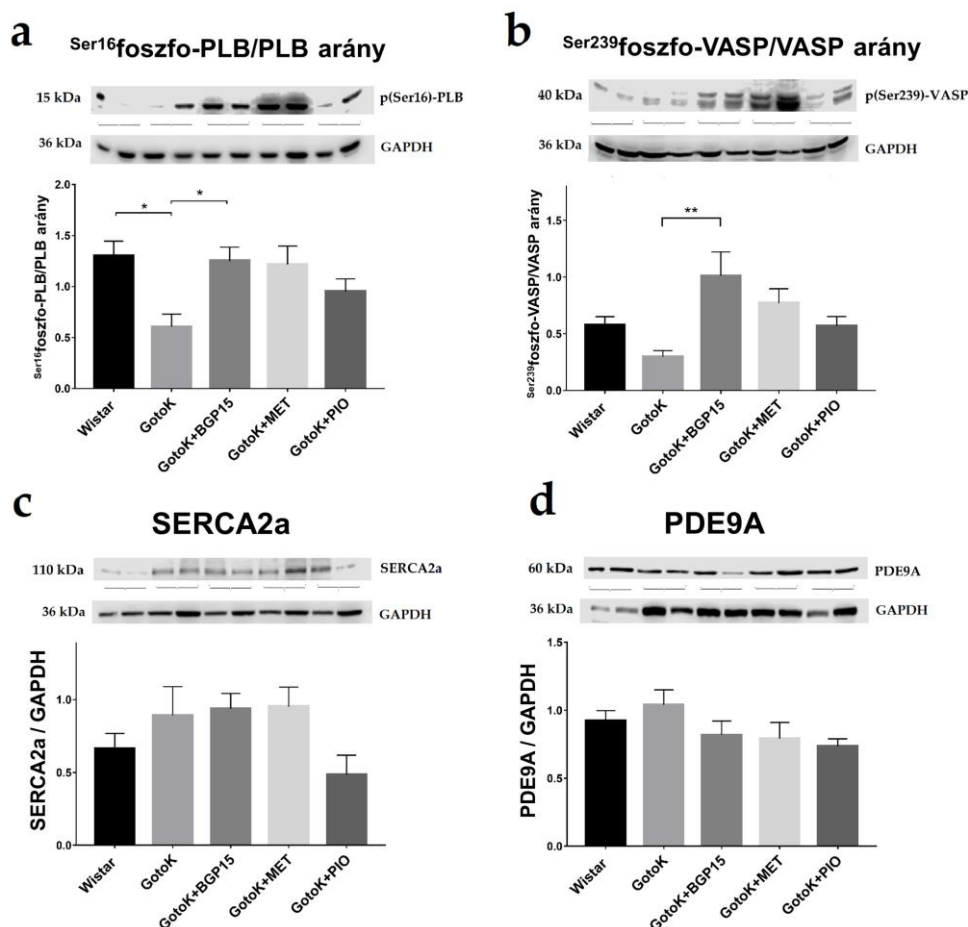


9. ábra. Reprezentatív echokardiográfias felvételek. „a” panel: TDI felvételek, az e' és a' hullámok negatív irányban láthatók. „b” panel: mitrális beáramlás (pozitív irányú E és A hullámok), valamint bal kamrai M-mód felvételek. „c” panel: e'/a' arány grafikon, a diasztolés funkciót jelzi; „d” E/e' arány, a kamrai töltőnyomásra utal; „e” panel: Dopplerrel mért A hullám, a pitvar hozzájárulása a kamratelődéshez; „f” panel: Tei-index, vagy miokardiális teljesítmény (MPI), a kisebb index jobb teljesítményt jelöl. Az adatok átlag SEM-ben vannak megadva, $n=6$ /csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn's post-hoc tesztel. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik (vs. Wistar); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.1.4. Western blot vizsgálatok

A bal kamrai mintákból származó fehérje-izolátumokon foszfo-specifikus antitestekkel végzett Western blot analízisek eredménye a 10. ábrán látható⁴. A foszfolambán (PLB) és VASP fehérjék szintjében és foszforiláltságban jelentős különbségeket találtunk a csoportok között. A ^{Ser16}foszfo-foszolambán aránya a nem-foszforilált formához képest (pPLB/PLB) szignifikánsan lecsökkent a kezeletlen GotoK csoportban ($p = 0,0171$ vs. Wistar). Ugyanakkor a foszforilált fehérje aránya szignifikánsan nőtt a BGP-15-kezelt GotoK állatok miokardiumában ($p = 0,0348$ vs. GotoK). A metformin-kezelés hasonló tendenciát hozott ($p = 0,1432$ v. GotoK). Mivel a VASP fehérje 239-es szerin aminosava a Protein Kináz G foszforilációs célpontja, a ^{Ser239}-foszfo-VASP /totál VASP arányokat is vizsgáltuk. A foszforilált VASP/totál VASP aránya a foszfolambán fehérjéhez hasonló mintázatot követett, vagyis a BGP-15-kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt a kezeletlen állatokéhoz viszonyítva ($p = 0,0094$ vs. GotoK). A metformin kezelés ebben az esetben is hasonló tendenciával járt ($p = 0,0877$ vs. GotoK). A SERCA2a expressziója nem különbözött szignifikánsan a kezelési csoportok között. Habár a cGMP degradációjáért felelős PDE9A expressziója a GotoK csoportban volt a legmagasabb, a BGP-15-kezelt csoportban pedig a legalacsonyabb, ezek a különbségek nem érték el az előre definiált szignifikancia-szintet ($p < 0,05$).

⁴ A fehérje-izolálás és a Western blot részben társszerző (B.M.) segítségével történt, részben saját munka



10. ábra. A Western blot vizsgálatok eredményei. A SERCA pumpa funkcióját reguláló foszfolambán (PLB) fehérje foszforilációja csökkent a GotoK csoportban, ugyanakkor szignifikánsan nőtt a BGP-15-kezelt csoportban („a” panel). A PKG-célpont VASP protein foszforiláltsága hasonló sémát mutatott („b” panel). A SERCA2a expressziója nem változott szignifikánsan („c” panel), és a PDE9A szintek változása sem érte el a szignifikancia határát („d” panel). Az expressziókat GAPDH háztartási fehérjére normalizáltuk, a „kDa” a kilodaltonban megadott molekulatömeg. Átlag±SEM, n=6/csoport, Kruskal-Wallis teszt, Dunn’s post-hoc teszt. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.1.5. A patkánymodell-kísérletek eredményeinek összefoglalása

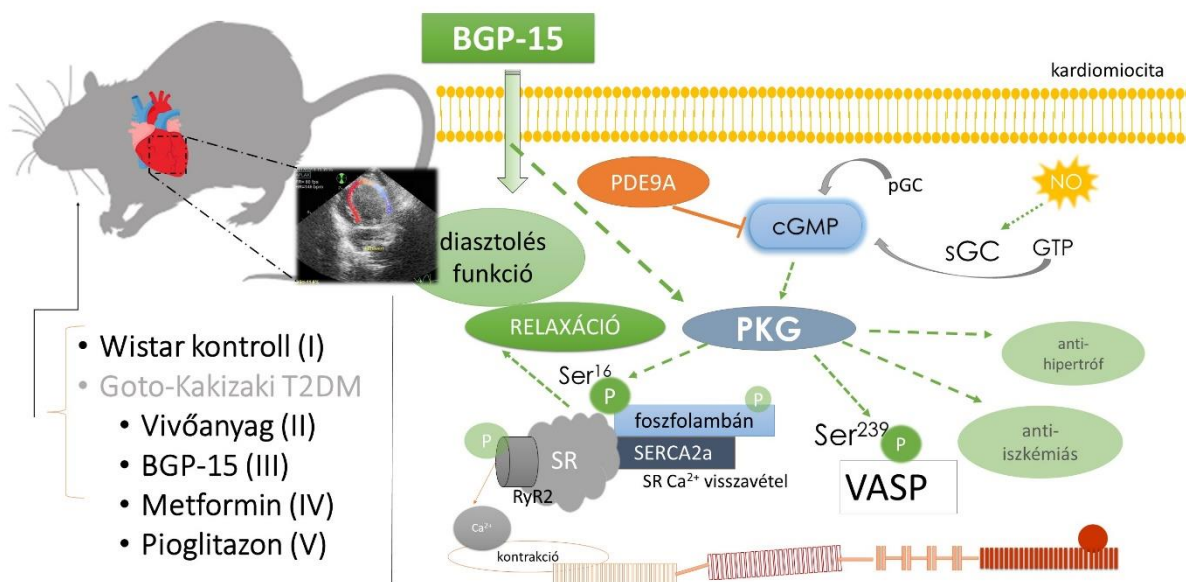
A Goto-Kakizaki modellen végzett vizsgálatok tapasztalatait az alábbiakban foglalhatjuk össze. A GotoK állatok – a vártak megfelelően – emelkedett éhomi glükóz- és inzulinszintekkel rendelkeztek, illetve inzulin-reszisztensek voltak (HOMA-IR). Az

alkalmazott hatóanyagok közül, kísérleti elrendezésünkben csak a pioglitazon tudott kifejezteni szignifikáns mértékű szérumban glükóz-szint csökkentést, habár kismértékben a BGP-15 és metformin-kezelt állatok glükóz szintje is alacsonyabb volt. A pioglitazon szignifikánsan javította az izolált aortagyűrűk acetil-kolinra adott válaszát, vagyis az endothel-függő vazorelaxációt, melyre a metformin-kezelés csak kis hatással volt az alkalmazott koncentráció-tartományt vizsgálva. A BGP-15-kezelésnek nem volt hatása a vazorelaxációra. A pioglitazon kedvező hatásai ellenére azonban súlygyarapodást tapasztaltunk a kezelt állatokban, mely nem kívánatos T2DM-ben. A kardiális funkció tekintetében a fentiekől lényegesen eltérő hatásokat tapasztaltunk, ugyanis a pioglitazon- és metformin-kezeléseknek csak elhanyagolható hatása volt a GotoK állatokban megfigyelt diasztolés diszfunkcióra, ellenben a BGP-15-kezelt állatokban a kardiális funkcióromlás egyáltalán nem alakult ki. Az echokardiográfia alapján a GotoK+BGP-15 csoportban a passzív kamratelődést jelző E hullám magassága, a miokardium mozgékonyágát mutató e'/a' arány, és a töltőnyomást jelző E/e' hányados is megtartott maradt. Az ejekciós idő, a miokardium teljesítményét leíró Tei-index és a kiáramlási pálya sebessége is a Wistar kontroll állatokéhoz hasonló, a kezeletlen GotoK állatokban mért értékeknél szignifikánsan jobbnak mutatkozott.

A kardiális funkció megtartottságának hátterében a diasztológiát meghatározó SERCA2a pumpa expresszióját és aktivitását vizsgáltuk. A SERCA pumpa fehérjeszintű expressziója nem különbözött a kezelési csoportokban, ezzel ellentétben a pumpa aktivitását meghatározó foszfolambán foszforilációja szignifikáns eltéréseket mutatott. A kezeletlen GotoK csoportban a PLB foszforilációja csökkent, míg a BGP-15-kezelt GotoK állatokban megnövekedett, amely a SERCA pumpa megtartott funkcióját jelzi a BGP-15 kezelés hatására. A PLB megfelelő, Ser16-os aminosavának foszforilálása mögött emelkedett Protein Kináz G aktivitás állhat, melyet a VASP protein, unikális PKG-célpont foszforilációjának monitorozásával megerősítettünk. Mivel a BGP-15 az endothel-függő relaxációt nem befolyásolta, azt feltételeztük, hogy a PKG aktivitását nem az NO-útvonalon befolyásolja (habár lehetséges hogy az érfalban és a szívizomban eltérő jelátviteli útvonalakat aktivál). Ennek függvényében megvizsgáltuk a NP-cGMP lebontásáért felelős PDE9A enzim expresszióját, és habár a kezeletlen csoportban volt a legmagasabb, a BGP-15 kezelt csoportban pedig csökkent, a különbség nem érte el a szignifikancia határát (kis elemszám), ezért ezen vizsgálatok megismétlése hasonló modelleken indokolt lehet.

Összefoglalva, mivel a BGP-15-kezelésnek a GotoK modellen csak elhanyagolható szérumban glükózsint-csökkentő hatása van, illetve a BGP-15 nem befolyásolja az endothel-függő vazorelaxációt, így a kezelés hatására létrejött diasztolés funkció-javulás hátterében részben a

PKG enzim megtartott aktivitása, a PLB foszforilálása, ezáltal pedig a megőrzött SERCA funkció, és teljesebb miokardiális relaxáció állhat (11. ábra).



11. ábra. A Goto-Kakizaki patkánymodellel végzett kísérletek tapasztalatai, illetve a kapcsolódó jelátviteli útvonalak. A BGP-15- kezelés javította a diasztolés funkciót, továbbá a foszfolambán- és VASP fehérjék PKG-specifikus foszforilációja megnövekedett a BGP-15-kezelt állatok bal kamrai mintáiban, amely részben magyarázhatja a funkcionális eredményt. A BGP-15 molekuláris célpontjának azonosítása további vizsgálatok tárgya. A metformin és a pioglitazon elsősorban vaszkuláris pleiotróp hatásokkal rendelkezik, ezen hatóanyagok kísérleti elrendezésünkben nem voltak jelentős hatással a kardiális funkcióra.

4.2. A nyúlmodell-kísérletek eredményei

4.2.1. Echokardiográfia

A 16 hétig tartó aterogén diéta után jelentős különbségeket észleltünk a Kontroll és HC csoportok echokardiográfiás paramétereit között, elsősorban a diasztológia tekintetében (5. és 6. táblázatok)⁵. A HC csoportban a bal pitvar területe, a bal kamra tömege, relatív falvastagsága, továbbá a kiáramlási pálya sebessége és nyomásgradiense szignifikánsan emelkedett, ezen paraméterek a megnövekedett töltőnyomásra, valamint kamra-hipertrófiára és aortasztenózisra utalnak. Az ejekciós frakció (és a frakcionált rövidülés) szignifikánsan csökkent, de még a fiziológiás tartományban maradt.

2D és M-mód	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
Bal pitvar területe (cm ²)	0,833 ± 0,029	1,633 ± 0,065 ****	<0,0001
IVSd (mm)	2,27 ± 0,139	2,882 ± 0,176 *	0,0149
BK tömege (g)	4,651 ± 0,433	8,035 ± 0,655 ***	0,0005
RWT (%)	0,283 ± 0,017	0,362 ± 0,018 **	0,0050
FS (%)	30,78 ± 0,434	28,44 ± 0,669 **	0,0099
EF (%)	62,22 ± 0,619	58,33 ± 0,898 **	0,0026
MAPSE (mm)	5,488 ± 0,093	5,661 ± 0,254	0,5147
LVOT paraméterek	Kontroll	HC	p érték
Vmax (m/s)	0,923 ± 0,018	1,204 ± 0,021 ****	<0,0001
Vmean (m/s)	0,601 ± 0,018	0,701 ± 0,027 **	0,0076
maxPG (mmHg)	3,453 ± 0,139	5,832 ± 0,199 ****	<0,0001
meanPG (mmHg)	1,747 ± 0,104	2,637 ± 0,172 ***	0,0004

5. táblázat. A 2D- és M-mód echokardiográfia eredményei. A HC csoportban igen markáns különbségek jelentek meg a Kontroll csoporthoz viszonyítva. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. A rövidítések magyarázata a Módszerek (3.) fejezetben található.

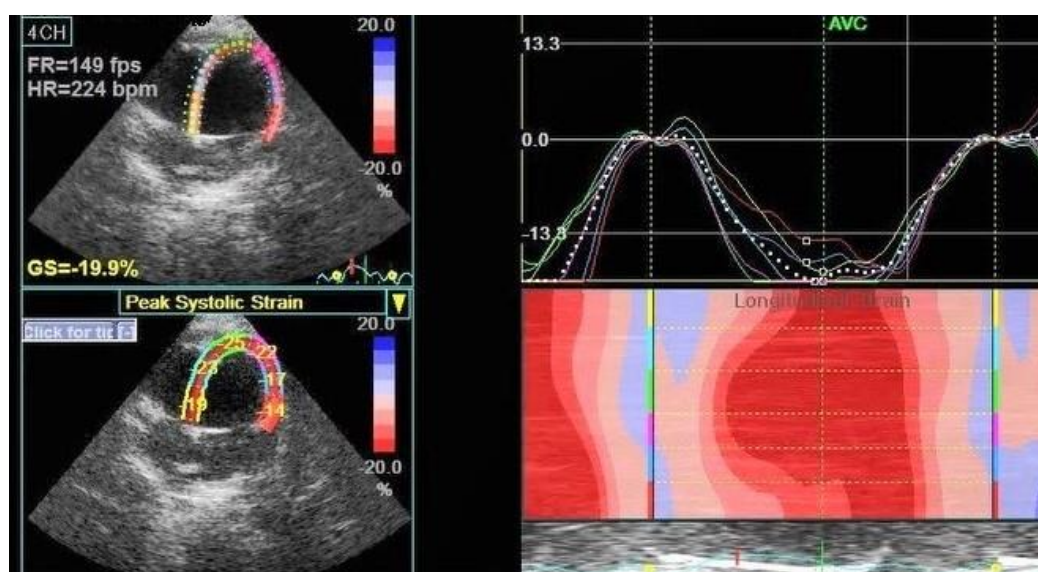
A Doppler echokardiográfiával meghatározott értékek közül kitűnik az E/A és TDI e'/a' hányadosok csökkenése, a decelerációs idő és az izovolumetriás kontrakciós idő megnyúlása, valamint az E/e' arány növekedése a HC csoportban, mely paraméterek érzékenyen jelzik a diasztolés funkciózavart és az emelkedett töltőnyomást. A globális teljesítményt jelző Tei-index szignifikánsan romlott a Kontroll csoporthoz viszonyítva. A Speckle Tracking echokardiográfia

⁵ Az echokardiográfia kivitelezése és értékelése saját munka (témavezetői jelenléttel)

során a globális longitudinális szisztolés kamrafunkciót a GLS (global longitudinal strain) értékkel jellemeztük. A GLS negatív irányú, a miokardium rostjainak maximális összehúzódását („tömörödését”) mutatja meg az eredeti (relaxált) állapothoz képest. A GLS értéke az egészséges 20 % fölötti értékről 16 % körülire csökkent a HC csoportban, mely az ejekciós frakciónál specifikusabban jelzi a kezdődő szisztolés elégtelenséget (6. táblázat).

Doppler és TDI	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
E hullám (m/s)	0,630 ± 0,022	0,698 ± 0,047	0,2049
A hullám (m/s)	0,391 ± 0,012	0,653 ± 0,042 ****	<0,0001
E/A arány	1,624 ± 0,068	1,069 ± 0,039 ****	<0,0001
DecT (ms)	55,44 ± 2,001	71,22 ± 2,666 ***	0,0002
TDI e'/a' arány	1,233 ± 0,060	0,935 ± 0,054 **	0,0020
E/e' arány	8,002 ± 0,164	13,20 ± 1,091 ***	0,0002
IVRT (ms)	30,78 ± 1,188	56,56 ± 2,588 ****	<0,0001
Tei-index (MPI)	0,528 ± 0,013	0,8385 ± 0,049 ****	<0,0001
Strain (STE)	Kontroll	HC	p érték
GLS	-21,34 ± 0,664	-16,07 ± 1,029 ***	0,0007

6. táblázat. A Doppler- és Speckle Tracking (STE) echokardiográfia eredményei. A HC csoport diasztolés és szisztolés funkciója is szignifikánsan romlott. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. A rövidítések magyarázata a Módszerek (3.) fejezetben található.



12. ábra. Speckle Tracking (STE) echokardiográfias módszer során nyert reprezentatív kép. Egészséges állat, a GLS (GS) -19,9 %. A kép saját felvétel.

4.2.2. Morfometria

A HC csoport állatai szignifikánsan magasabb testsúlyt értek el a aterogén étrenddel végzett kezelés végére. A bal kamra (BK) tömege is nőtt, melyet a testsúlyra és – egy standardizáltabb paraméterre – a tibia hosszára is normalizáltunk (7. táblázat)⁶. A tüdő és vese nedves/száraz tömegarányaiban nem találtunk eltérést a csoportok között, amely arra utalhat, hogy a szövetek között még nem jelent meg jelentős mértékű ödéma.

	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)
Testtömeg (g)	3064 ± 87	4153 ± 86 ***
A szív tömege (g)	7,795 ± 0,418	12,25 ± 0,535 ***
A szív tömege/testtömeg	0,00253 ± 0,0003	0,00294 ± 0,0002
BK tömege (g)	6,22 ± 0,337	10,13 ± 0,534 ***
BK tömege/tibiahossz	0,605 ± 0,046	0,828 ± 0,038 **
BK tömege/testtömeg	0,00087 ± 0,0003	0,0008 ± 0,0002
Tüdő nedves/száraz tömegarány	5,254 ± 0,147	5,118 ± 0,094
Vese nedves/száraz tömegarány	3,421 ± 0,058	3,281 ± 0,191

7. táblázat. Morfometriai paraméterek. A HC csoportban a bal kamra tömege szignifikánsan nőtt. A szervek nedves/száraz tömegaránya még nem mutat különbséget a csoportok között. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok a szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.2.3. Szérum paraméterek

A vérvételek eredményei alapján⁷ a HC állatok lipid-paraméterei, májenzim-értékei, valamint a C-reaktív protein (CRP) és troponin T értékek szignifikánsan különböztek a Kontroll nyulak paramétereitől (8. táblázat). A HC állatokban tehát markáns hiperkoleszterinémia, illetve enyhébb gyulladás (CRP) volt tapasztalható.

⁶ A morfometria kivitelezése és értékelése saját munka

⁷ A szérum paraméterek meghatározása a DE Laboratóriumi Medicina Intézet szívességéből történt, az eredmények értékelése és statisztikai analízise saját munka

	Kontroll (n = 9)	HC (n = 9)	p érték
Össz-koleszterin (mmol/l)	1,753 ± 0,0187	32,360 ± 2,164 ****	<0,0001
LDL (mmol/l)	0,725 ± 0,312	32,030 ± 1,813 ****	<0,0001
ApoB (mmol/l)	0,026 ± 0,005	0,154 ± 0,006 ****	<0,0001
HDL (mmol/l)	0,963 ± 0,092	6,428 ± 0,600 ****	<0,0001
ApoA (mmol/l)	0,149 ± 0,011	0,034 ± 0,007 ****	<0,0001
Aterogén-index	1,986 ± 0,391	5,499 ± 0,458 ***	0,0001
ApoB/ApoA arány	0,188 ± 0,041	3,691 ± 0,492 ****	<0,0001
Triglicerid (mmol/l)	1,139 ± 0,136	1,001 ± 0,225	0,6959
AST (GOT) (U/l)	22,710 ± 6,781	33,47 ± 3,016	0,1056
ALT (GPT) (U/l)	64,140 ± 19,660	57,730 ± 5,479	0,6813
Kreatinin (μmol/l)	71,430 ± 12,040	116,100 ± 5,984 **	0,0013
CK-MB (U/l)	1154,0 ± 276,9	785,6 ± 126,1	0,1754
CRP (mg/l)	0,079 ± 0,070	0,325 ± 0,073 *	0,0359
Troponin T (ng/l)	7,438 ± 1,199	20,21 ± 2,778 **	0,0092

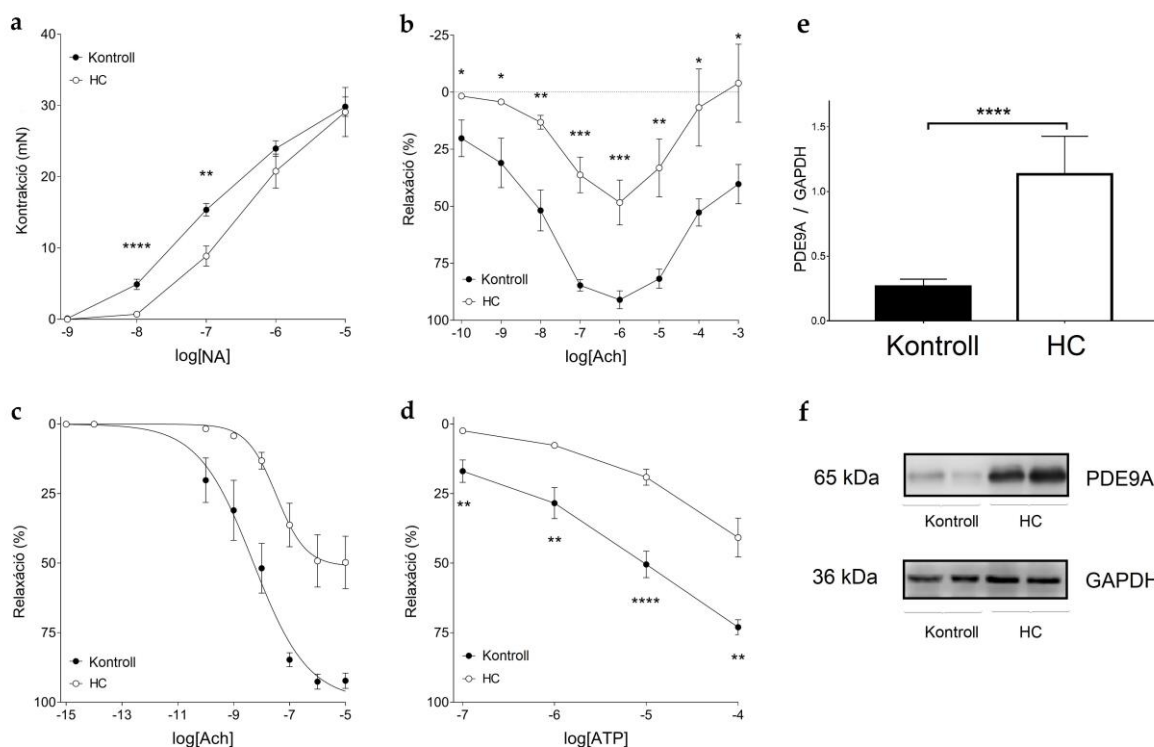
8. táblázat. Vérvételi eredmények. A HC csoportban drámai hiperkoleszterinémia alakult ki, az aterogén-index szignifikánsan nőtt. A kreatinin, CRP és troponin T értékei is magasabbnak bizonyultak a Kontroll-hoz képest. Átlag±SEM, n=9/csoport, párosítatlan kétmintás t-próba. A *-ok szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4.2.4. Endothel-függő vazorelaxáció

Az izolált érgyűrűkön végzett *ex vivo* kísérletek eredményei a 13. ábrán láthatóak⁸. A noradrenalinra adott válasz szignifikánsan eltért a csoportok között, ugyanis 10 és 100 nmol/l-es koncentrációknál szignifikánsan gyengébb kontrakciós válasz volt tapasztalható a HC csoportban (13. ábra, „a” panel). Az acetil-kolin mindkét csoportban relaxációt okozott (a prekontrakcióhoz képest) 1 μmol/l-es koncentrációig, e fölött kontrakciót váltott ki a preparátumokon. Az aterogén étrenden tartott állatok érgyűrűi szignifikánsan kisebb mértékű relaxációt produkáltak, minden koncentráció-tartományban („b” panel). A Hill-egyenlet illesztése után meghatározott E_{max} csökkent ($50,9 \pm 9,48$ vs. $93,67 \pm 2,66$, HC vs. Kontroll), míg a $\log EC_{50}$ kismértékben nőtt ($-7,59 \pm 0,16$ vs. $-8,62 \pm 0,36$, HC vs. Kontroll) a HC

⁸ Az izolált érgyűrűkön végzett kísérlet társszerző (G.R.) munkája

csoportban, a Kontrollhoz viszonyítva („c” panel). Az ATP szignifikánsan nagyobb mértékű relaxációt váltott ki a Kontroll csoport preparátumain a HC csoporthoz képest, tehát az aterogén diéta az ATP-indukálta relaxációt is rontotta, a „klasszikus”, acetyl-kolinnal vizsgált endothel-függő relaxáció mellett. A 13. ábra „e” és „f” paneleken az aorta-mintákon elvégzett Western blot eredményeit szemléltettük. Az HC állatok torakális aorta-mintáiban a PDE9A expressziója szignifikánsan emelkedett a Kontroll csoporthoz viszonyítva (ld. 4.2.6. fejezet).



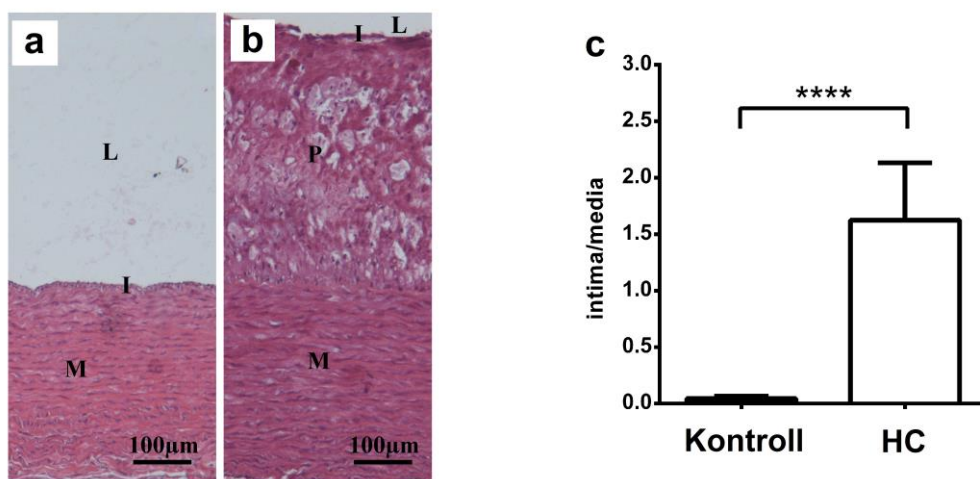
13. ábra. Az izolált érgyűrű-preparátumokon végzett kísérletek eredményei. „a” panel: A noradrenalinra (NA) adott kontrakciós válasz (a nyugalmi feszüléshez képest), x tengely: NA koncentrációk logaritmus, y tengely: kontraktilis erő (millinewton, mN). A „b” panel az acetyl-kolinnal (ACh) adott választ, a „c” panel az endothel-függő vazorelaxációt szemlélteti, az x tengely az ACh koncentráció logaritmus, az y tengely a kontrakciós erő %-os csökkenése, a „d” panel a Hill-egyenlet illesztése utáni görbét mutatja meg. A „e” panelen az ATP hatása látható, prekontrakció után. Az „e” panelen a nyulak torakális aorta-mintáiból meghatározott PDE9A expressziója látható a Kontroll és HC csoportokban, míg az „f” panel a reprezentatív blotokat szemlélteti. Az adatok átlag±SEM-ben vannak megadva, a *-ok szignifikancia szintjét jelölik, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Az „a-d” panelek adatai társszerző (G.R.), az „e-f” paneleken látható adatok saját munka eredményei

4.2.5. Szövettani festések

Az aorták metszetein végzett hematoxilin-eozin festés során láthatóvá váltak a habos sejteket tartalmazó plakkok. A 14. ábra⁹ („a-c” panel) a plakkosodás mértékét szemlélteti, az érgyűrű intimájának és médiájának egymáshoz viszonyított arányával. A plakk nélküli, kontroll erek intímája nagyon vékony, az intima/media arány kicsi, míg az ateromás lézió miatt a HC állatok mintáiban az intima/media arány szignifikánsan megnőtt ($1,623 \pm 0,079$ vs. $0,043 \pm 0,004$; HC vs. Kontroll).

A Masson’s trichrome festést tájékozási, reprezentatív céllal készítettük, kisszámú mintán. A festések során - kék színnel - fibrotikus szövetnyomok detektálhatóak a HC állatok bal kamrai miokardiumában, míg ezek a Kontroll mintákban nem tűnnek elő (14. ábra, „d-e” panel).

⁹ A szövettani festések és azok értékelése részben társszerzők (K.A., V.B.) munkája, részben saját eredmény



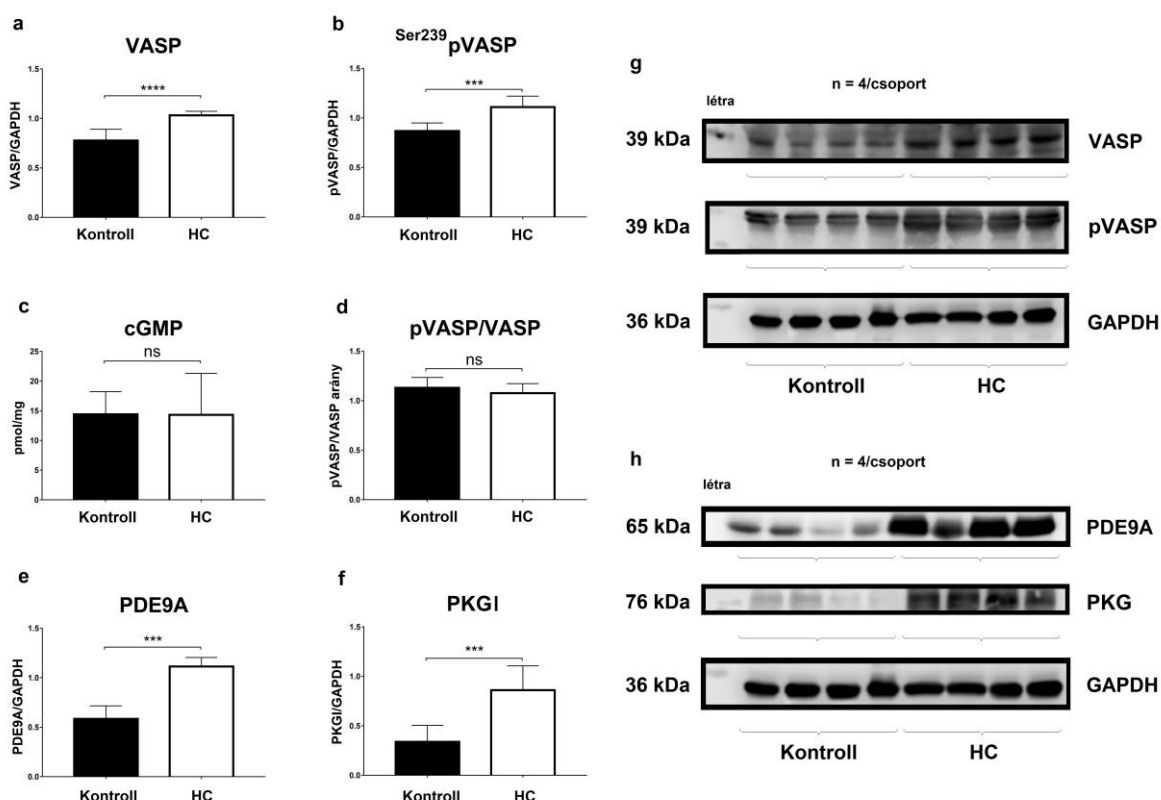
14. ábra. A szövettani festések eredményei. Az „a” panel Kontroll aorta keresztmetszete képe, vastag simaizom-réteg (M: media) és vékony intima (I) látható a lumen (L) alatt. A „b” panel HC állat aortája, jól látható a habos sejtes plakk (P), így a vastag intima. A „c” panel az intima/media arány kvantifikálásának eredménye. Az adatok átlag $\pm$ SEM-ben vannak megadva, t-próba, ****: $p < 0,0001$. A „d” panel Kontroll állat miokardium-részlete, Masson’ trichrome festés, míg az „e” panel HC állat miokardiuma; láthatóak a kék, fibrotikus részek.

4.2.6. Western blot és miokardiális cGMP-szint

Az állatok bal kamrai miokardiális mintáin elvégzett Western blot vizsgálatok eredménye, valamint az ugyanezen mintákból ELISA segítségével meghatározott cGMP-szintje az 15. ábrán látható¹⁰. A HC állatok mintáiban a PDE9A expressziója mintegy kétszerese

¹⁰ A Western blot és cGMP-szint mérés saját munka

a Kontroll mintákban meghatározott szintnek ($p < 0,001$). Mind a foszforilálatlan VASP protein, mind a ^{Ser239}foszfo-VASP (pVASP) expressziója emelkedett a HC csoportban a Kontrollhoz viszonyítva, de a pVASP/VASP arány nem változott, amely változatlan Protein Kináz G aktivitást feltételez. Ezt alátámasztja a miokardiális cGMP szintje is: nem találtunk szignifikáns különbséget a Kontroll és HC állatok cGMP-szintjei között. Ezzel ellentétben a PKG fehérje expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a HC csoportban ($p < 0,001$), így – eredményeink alapján - a megnövekedett expressziót nem követte az enzimaktivitás emelkedése.



15. ábra. A Western blot és ELISA eredményei. A VASP („a” panel) és a foszforilált VASP („b” panel) expressziója is emelkedett a HC csoportban. A változatlan cGMP-szint és pVASP/VASP arány („c-d”) változatlan PKG aktivitásra utal, ugyanakkor a PKG expressziója szignifikánsan növekedett („f” panel). A cGMP degradálásában részt vevő PDE9A expressziója szignifikánsan magasabb a HC csoportban („e”). A „g-h” paneleken reprezentatív blotok láthatóak. Az adatok átlag±SEM-ben vannak megadva, kétmintás t-próba, ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

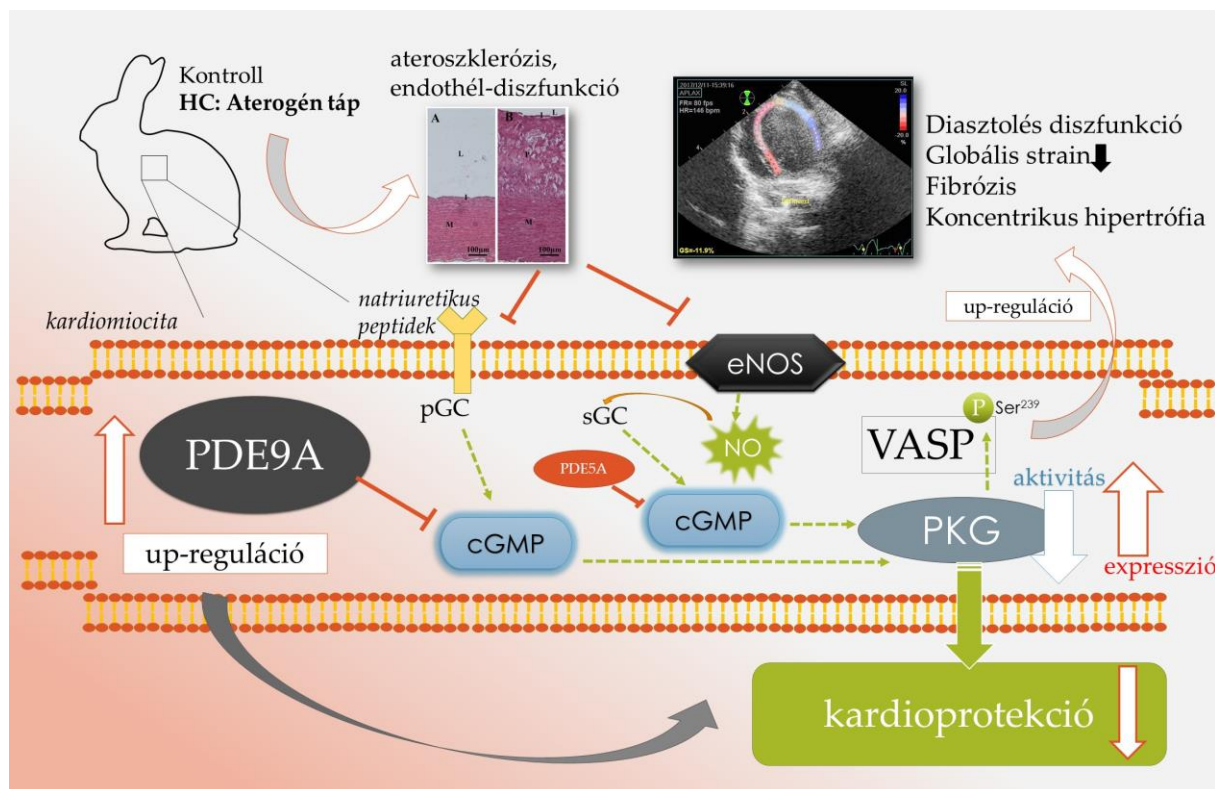
4.2.7. A nyúl modell eredményeinek összefoglalása

A nyúlmodellen végzett kísérleteink tapasztalatai alapján a HC csoport állataiban igen markáns diasztolés diszfunkció fejlődött ki, annak minden echokardiográfiás jelével együtt. Az E/A és e'/a' arány csökkent, a DecT és IVRT megnyúlt, a E/e' megemelkedett. A bal kamra tömege szignifikánsan magasabb a HC csoportban, ezzel pedig a falvastagság (IVS) növekedése, illetve a relatív falvastagság (RWT%) emelkedése is együtt járt, amely koncentrikus hipertrófiára utal. A patológiát a reprezentatív festések során tapasztalt fibrotikus szövet megjelenése is alátámasztja. A globális kardiális funkcióromlást a Tei-index emelkedése jelezte. A szisztolés funkciók a klasszikus mérések alapján megtartottak voltak, az ejekciós frakció csak kismértékben csökkent ($58,33 \pm 0,898$ vs. $62,22 \pm 0,619$; HC vs. Kontroll), azonban az STE echokardiográfiával megmért GLS (a rostok hossz-irányú tömörödése) szignifikánsan rosszabb volt az aterogén étrenden tartott csoportban ($-16,07 \pm 1,029$ vs. $-21,34 \pm 0,664$; HC vs. Kontroll). A kiáramlási pálya megnövekedett nyomás- és sebességgradiensei perzisztáló aorta-sztenózt jeleznek a HC csoportban. A bal kamra és a szív megnagyobbodását az *ex vivo* mérések is alátámasztották, azonban perifériás ödéma jeleit (nedves/száraz tömegarányok) nem tapasztaltuk.

A vérvételek eredményei alapján markáns diszlipidémia alakult ki (össz-koleszterin, LDL, ApoB), a gyulladásos és kardiális markerek enyhe, de szignifikáns emelkedésével (CRT, troponin T). Ezt az ateroszklerózis szövettani megjelenése kísérte (habos sejtes plakkok az aortán), amely együtt járt az endothel-függő vazorelaxáció, vagyis a NO-bioelérhetőségének jelentős csökkenésével (Ach E_{max} : $50,9 \pm 9,48$ vs. $93,67 \pm 2,66$, HC vs. Kontroll). Fontos új eredményként a Western blot vizsgálatok során a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját tapasztaltuk az aorta-mintákon, mely a NP-cGMP lebontásával hozzájárulhat az endothel-diszfunkció kialakulásához.

A miokardium-szöveten végzett molekuláris biológiai vizsgálatok alapján az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció együtt járt a PDE9A enzim fokozott expressziójával, melyet ateroszklerotikus szívbetegség esetében először írtunk le. Hasonlóan, a VASP protein (foszforilálatlan és Ser239-en foszforilált forma) expressziója is növekedett, amely a hipertróf válasz egyik oka lehet a HC csoportban. A pVASP/VASP aránnyal a Protein Kináz G, kulcsfontosságú, kardioprotektív útvonalakat iniciáló enzim aktivitását monitoroztuk, amely változatlanul bizonyult, azonban a PKG fehérje-szintű expressziója szignifikánsan emelkedett a HC csoportban. A PKG esetében az expresszió-növekedést tehát nem kísérte az aktivitás emelkedése, ennek lehetséges oka pedig az enzim kofaktorának, a cGMP másodlagos

messengernek a relatív hiánya. A cGMP-szint meghatározásának eredménye jól korrelál a pVASP/VASP aránnyal, és megerősíti a megnövekedett expresszió melletti változatlan PKG aktivitást. A cGMP-szint növekedésének limitáló tényezője a lebontásáért felelős PDE9A enzim expressziójának növekedése lehet, mely jelen eredményeink alapján már korai stádiumú kardiális diszfunkcióban kimutatható, így akár jövőbeni gyógyszer-célpont lehet ateroszklerotikus szívbetegségekben (16. ábra).



16. ábra. A nyúlmodell-kísérletek grafikus összefoglalása. Az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció együtt jár a PDE9A enzim fokozott expressziójával, mely hozzájárulhat a PKG változatlan aktivitásához emelkedő fehérje-expresszió mellett.

5. Megbeszélés

A kardiális diszfunkció és a következményes szívelégtelenség népegészségügyi jelentősége hatalmas, eredményes terápiája azonban – különösen a diasztolés elégtelenség tekintetében – megoldatlan. A kardiális diszfunkció leggyakoribb metabolikus okai a ateroszklerózis, illetve a diabétesz mellitusz talaján kifejlődő patológias változások a miokardiumban és az érrendszerben. Az utóbbi évtized munkái a cGMP-PKG jelátviteli útvonal szerepét hangsúlyozzák a szívelégtelenség patofiziológiájában [136]. A cGMP mint kofaktor a Protein Kináz G aktiválásával számos, protektív szignalizációs utat iniciál, nem csak az érrendszerben, ahol a vazorelaxációt segíti elő, hanem a miokardiumban is. A szívízomban a PKG aktiválása a natriuretikus peptidek, vagy a nitrogén-monoxid által generált cGMP segítségével (NP-cGMP és NO-cGMP) anti-hipertróf jelátvitelt közvetít, továbbá a SERCA pumpa aktivitásának és a titin óriásmolekula passzív feszülésének szabályozásán keresztül a miokardium relaxációját is determinálja. A fentiek okán tanulmányainkban a PKG jelátviteli út tagjait vizsgáltuk, 2-es típusú diabétesz, valamint ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkcióban, továbbá a kaszkád egy lehetséges farmakológiai befolyásolásának lehetőségét (BGP-15) is elemeztük, a diabétesz modell esetében.

A patkánymodellen végzett tanulmányban a BGP-15 gyógyszerjelölt és két, pleiotróp hatásokkal is rendelkező antidiabetikum (metformin, pioglitazon) kardiovaszkuláris hatásait értékeltük Goto-Kakizaki non-obez, diabéteszes modellen. Habár célkitűzésünk a miokardium funkciójának vizsgálata volt, a BGP-15 ismert hatásai (inzulin-érzékenyítés), valamint a modell jellegzetessége (poligén diabétesz) miatt a metabolikus paramétereket is megvizsgáltuk. A GotoK állatok az irodalomban leírtaknak megfelelően hiperglikémiásnak, illetve hiperinzulinémiásnak bizonyultak, továbbá a 12 hét leteltével inzulin-rezisztencia is kifejlődött (HOMA-IR index, 7. ábra, „b” panel). Az emelkedett éhomi glükóz szintet a BGP-15- és a metformin-kezelés nem-szignifikánsan csökkentette (ebben valószínűleg közrejátszik a kis elemszám), ellenben a pioglitazon-kezelt állatokban szignifikáns plazma glükóz szint csökkenést találtunk (3. táblázat). A pioglitazon jelentős mértékben javította a GotoK állatokban már károsodott endothel-függő vazorelaxációt is (8. ábra). A pioglitazon ezen hatása az irodalomban ismert [137], Huang és mtsai (2008) szerint a gyógyszer az eNOS aktiválásával javítja az acetil-kolinra adott választ, mely eredményt tehát – funkcionálisan - sikerült megerősítenünk [138].

Mindazonáltal a pioglitazonnal kezelt GotoK állatok testtömege nagymértékben emelkedett, ugyancsak összhangban az irodalomban leírtakkal. A pioglitazon

folyadékretenciót, ödémát okozhat, illetve leírták az adipocita-differenciációt serkentő hatását is [139, 140]. A testsúly-gyarapodás és a folyadékretenció nemkívánatos hatásoknak tekinthetők mind a diabétesz, mind a kardiovaszkuláris történések kapcsán. A tiazolidén-dion típusú antidiabetikumokról bebizonyosodott, hogy növelik a szívelégtelenség kockázatát, így előnyös hatásai ellenére a kockázat/haszon arányuk nem megfelelő [139]. A fentiek miatt a glitazonokat az újabb iránymutatások nem ajánlják kardiovaszkuláris kockázatú diabéteszes pácienseknek, és fokozatosan kiszorulnak a terápiából [13]. Az endothel-függő vazorelaxációt a metformin-kezelés kismértékben, de nem-szignifikánsan javította. A metformin ilyen hatása GotoK modellen ismert, de csak nagyobb koncentrációtartományban (10^{-5} mol/l felett) [141]. A BGP-15-kezelt csoportban az acetil-kolinra adott relaxációs válasz nem változott a kezeletlen diabéteszes csoporthoz viszonyítva, így feltételezhetjük, hogy az alkalmazott dózisban és időtartamban BGP-15 kezelés nincs hatással az endothel-függő vazorelaxációra, illetve a kifejtett kismértékű glükózsztint-csökkenés sem fordítja vissza vaszkulátúra funkciójának diabétesz-indukálta károsodását Goto-Kakizaki modellben.

Az echokardiográfiával meghatározott szívfunkciós paraméterekben jelentős eltéréseket találtunk a csoportok között. A kezeletlen GotoK patkányokban a megfordult e'/a' arány, a megnövekedett E/e' (emelkedett töltőnyomás), és a magas transzmitrális A hullám (nagyobb pitvari hozzájárulás a károsodott passzív kamratelődéshez) jelzi a diasztolés diszfunkció kialakulását, vagyis a kezdődő diabéteszes kardiomiopátiát.

A metformin-kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a diasztolés paraméterekre (habár kismértékben javította az e'/a' arányt), illetve - ahogy fentebb említésre került – a metformin az endothel-funkciót, vagyis az acetil-kolinra adott relaxációs választ sem befolyásolta jelentősen a vizsgált koncentráció-tartományban. Az inzulin-rezisztens GotoK állatokban a metformin csak kevésbé képes javítani a glükóz-felhasználást, illetve a kis állatszámnak is szerepe lehet abban, hogy a metformin tekintetében az irodalmi adatokat csak részben sikerült reprodukálnunk [141, 142].

A pioglitazon-kezelés az előnyös endothel- és metabolikus hatásai ellenére nem volt hatással az echokardiográfiás funkciókra, melyre magyarázat lehet a fentebb leírt testsúly-növekedést és esetlegesen szívelégtelenséget okozó kedvezőtlen mechanizmusa.

Ezzel ellentétben a BGP-15-kezelés markáns hatásokat mutatott az echokardiográfiával értékelt kardiális funkcióra, ugyanis megelőzte a diasztolés funkció-romlást, valamint a miokardiális teljesítményt is javította. A mitrális beáramlás egészséges képet mutatott, a TDI e'/a' arány szignifikánsan nőtt (1 fölé emelkedett), az E/e' , a kamrai töltőnyomás pedig lecsökkent, tehát a BGP-15-kezelés során nem alakult ki a GotoK állatokra jellemző diasztolés

diszfunkció. Továbbá, a BGP-15-kezelt állatokban megnőtt az ejekció időtartama, amely a teljesebb szisztolét jelzi, illetve a globális miokardiális teljesítményt mutató Tei-index is normalizálódott a GotoK csoport értékeihez viszonyítva.

Az egyik lehetséges mechanizmus a fenti diasztolés funkcionális javulás mögött a SERCA2a pumpa hatékonyságának növelése, megőrzése. Hipotézisünk alapja az – a bevezetésben részletesen bemutatott – tény, miszerint több közlemény megerősítette a SERCA pumpa csökkent működését/expresszióját diabéteszes kardiomiopátiában, más szerzők pedig a BGP-15 kedvező harántcsíktal izom-hatásait összefüggésbe hozták a SERCA2a expresszióval [106]. A SERCA2a protein expressziója nem különbözött szignifikánsan a GotoK és a GotoK+BGP-15 csoportok között (10. ábra „c” panel), ugyanakkor, a pumpa funkcióját szabályozó kis fehérje, a foszfolambán aktivitása szignifikánsan eltért (10. ábra „a” panel). A SERCA pumpa a foszfolambán gátló hatása alatt áll, a fiziológiás szabályzás alapja pedig, hogy Ser16 vagy a Thr17 aminosavain foszforilált foszfolambán (pPLB) leválik a SERCA-ról, ezáltal szabaddá téve annak működését. A vivőanyag-kezelt GotoK állatokban a foszfo-specifikus antitest segítségével meghatározott pPLB expressziója szignifikánsan csökkent volt az egészséges Wistar állatokhoz képest, amely a SERCA pumpa csökkent aktivitására utal. A BGP-15-kezelt állatokban a pPLB expressziója, ezáltal –valószínűsíthetően - a SERCA aktivitása növekedett, amely eredmény részben magyarázhatja a kardiomiociták teljesebb relaxációját, így az echokardiográfia során tapasztalt diasztolés funkciójavulást.

A foszfolambán Ser16-os aminosava a PKG foszforilációs célpontja [143], továbbá Frantz és mtsai (2013, Eur Heart J) megmutatták, hogy a kardiomiociták PKG-deléciója a PLB csökkent foszforiláltságához vezet a Ser16-on, amely csökkent SERCA-aktivitással és romló kardiális funkcióval jár, ezáltal tehát a PKG enzim szerepet játszik a miociták Ca-homeosztázisában is [64]. A fenti adatokból kiindulva megvizsgáltuk a PKG enzim aktivitását jelző VASP protein foszforilációját, foszfo(Ser239)-specifikus antitest segítségével. Mivel a VASP fehérje Ser239-es aminosava a PKG enzim specifikus foszforilációs célpontja, a ^{Ser239}foszfo-VASP/totál-VASP arány (pVASP/VASP) meghatározása a PKG foszforilációs aktivitásának monitorozására alkalmas [47, 57]. Eredményeink alapján a VASP fehérje foszforilációja (vagyis a pVASP/VASP arány) alacsonyabb volt a GotoK csoportban az egészséges állatokhoz képest, míg szignifikánsan megnövekedett a BGP-15-kezelt csoportban. Így feltételezhetjük, hogy a diabéteszes GotoK állatok kardiomiocitáiban csökkent volt a PKG enzim aktivitása, amely a BGP-15-kezelés hatására megnövekedett, melyet az enzim két célpontjának (PLB és VASP) emelkedett foszforilációs szintje jelez.

Tanulmányunk egyik limitációja, hogy a másik univerzális kináz, a cAMP-függő PKA enzim aktivitását nem határoztuk meg, így nem zárható ki, hogy a PKA aktivitása is hozzájárul a PLB foszforilálásához. További limitáció, hogy a bal kamrai minták kis mennyisége miatt nem sikerült meghatározni a miokardiális cGMP szintjét, mely megerősíthetné eredményeinket. Mivel azonban nyomásterhelésre kialakult szívelégtelen modellben bebizonyosodott a cGMP-t lebontó PDE9A enzim megnövekedett expressziója [68], továbbá saját adataink alapján a BGP-15-kezelés az endothel-függő relaxációt (NO-jelátvitel) nem befolyásolta, azt feltételeztük, hogy a BGP-15-kezelés a PKG enzimet nem az NO-útvonalon keresztül aktiválja (habár elméletileg lehetséges, hogy a BGP-15 az érfalban és a szívizomban eltérő jelátviteli útvonalakat hoz működésbe). A fentiek függvényében megvizsgáltuk a NP-cGMP lebontásáért felelős PDE9A enzim expresszióját a kezelési csoportokban, tudomásunk szerint GotoK modellen elsőként. Habár a PDE9A expresszió a kezeletlen GotoK állatok miokardiumában volt a legmagasabb, a BGP-15-kezelt csoportban pedig alacsonyabb, a különbségek nem érték el a pre-definiált szignifikanciaszintet. A tendencia miatt azonban érdemes lehet a PDE9A (és egyéb foszfodiészterázok) expresszióját előrehaladottabb diabéteszes kardiomiopátiában, és nagyobb elemszámú csoportokon megvizsgálni, illetve értékelni a BGP-15 hatásait a natriuretikus peptid szignalizációs útvonal egyéb tagjaira. Megemlítendő, hogy a BGP-15 celluláris, vagy molekuláris célpontja, ezáltal a farmakodinámia pontos felderítése még várat magára, továbbá az irodalmi adatok és saját kísérletes munkánk alapján elképzelhető, hogy a molekulának több támadáspontja, többféle élettani hatása is van.

A patkánymodell-kísérletek alapján összegzésként megállapítható, hogy a BGP-15 szignifikánsan javítja a diabéteszes kardiomiopátia korai stádiumában már kialakuló diasztolés diszfunkciót. Mivel a BGP-15 kezelésnek a GotoK modellen csak elhanyagolható szérum-glükóz-szint csökkentő hatása van, illetve nem befolyásolja az endothel-függő vazorelaxációt, a kardiális funkció javulásának hátterében valószínűsíthetően – részben - a PKG enzim fokozott aktivitása, a PLB foszforilálása, ezáltal pedig a megőrzött SERCA funkció, és teljesebb miokardiális relaxáció állhat (11. ábra). A pontos mechanizmusok felderítése, valamint a BGP-15 lehetséges terápiás hasznának értékelése a transzlációs medicina tükrében további vizsgálatokat, és kiegészítő technikákat igényel.

Kísérleteink második fázisában az ateroszklerózis következtében kialakuló kardiális diszfunkciót, és az ezzel járó molekuláris patológiai változásokat hiperkoleszterinémiás nyúlmodellen vizsgáltuk. A tanulmány során célunk a kardiális- és endothel-diszfunkció

értékelése volt, összefüggésben a PDE9A enzim expressziójával, valamint a PKG jelátviteli útvonal egyéb szereplőivel.

A HC állatok echokardiográfiás eredményei szignifikáns mértékű kardiális funkciózavart mutattak. A diasztolés diszfunkciót – az iránymutatásokban is szereplő – E/A arány csökkenése, a decelerációs idő (DecT) megnyúlása, valamint az E/e' hányadossal jelzett kamrai töltőnyomás emelkedése jelezte [78] (5. és 6. táblázat). A diagnosztikus jelek közül az E/A (és TDI e'/a') arány csökkenése arra utal, hogy a kamra passzív telődése károsodott, a pitvarnak nagyobb munkát kell „vállalnia” a vér továbbításában. Ezzel együtt jár az E hullám decelerációs idejének megnyúlása (lassabb passzív telődés), illetve a nyomás emelkedése (E/e'). További megerősítő adatok az izovolumetriás relaxációs idő megnyúlása (a romló relaxáció miatt több időbe telik a megfelelő állapot elérése a billentyűk nyitásához), továbbá a bal pitvar méretének megnövekedése, hiszen az emelkedő kamrai nyomás - a nyitott mitrális billentyűn keresztül - visszahat a pitvarra, annak nyomását (LAP: left atrial pressure) is megnövelve, üregét kitágítva. A fenti eredmények közül az E/A és e'/a' arányok csökkenése volt ismert az irodalomban, hasonló nyúlmodellen - Rubinstein (2009) szerint az echokardiográfiás adatok közvetlen korrelációt mutatnak a miokardiális koleszterintartalommal, amely a diszlipidémia direkt kardiális hatásait feltételezi [128]. Néhány szerző az emelt koleszterinbevitel ilyen, vaszkuláris hatásoktól is független károsító hatására a „*cholesterol cardiomyopathy*” kifejezést is javasolta, azonban ez az irodalomban kevésbé terjedt el [129]. A részletesebb echokardiográfiás elemzés során kimutatott kiáramlási pálya (LVOT) sebesség- és nyomásgradienseinek emelkedése a HC csoportban arra utal, hogy a vérnek adott idő alatt kisebb helyen, vagyis gyorsabban és nagyobb nyomással kell kiáramlania az aortán keresztül, amely az aortabillentyű sztenózisának diagnosztikus jele. Nyúl modellen már sokkal kisebb koncentrációban (0,25%) alkalmazott alimentáris koleszterin aortabillentyű-elváltozásokat okoz lipid depozitumokkal, az elasztin- és kollagén-összetétel változásaival, valamint makrofág-infiltrációval [130]. Így, bár az aorta-billentyűt szövettanilag nem vizsgáltuk, az LVOT paraméterek és a szakirodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy sztenózis is kialakult a HC csoport állataiban.

Az általunk kimutatott patológiás változások jelenlétét megerősíti az echokardiográfiásan meghatározott relatív falvastagság (RWT%) növekedése is, mely a bal kamra tömegének növekedésével együtt a koncentrikus hipertrófia jelének tekinthető (6. táblázat). A bal kamra tömegének echokardiográfiás meghatározását alátámasztja az *ex vivo*, manuálisan lement adat is (7. táblázat). A fentiekkel összefüggésben fibrózis jeleit találtuk a bal kamrai mintákon elvégzett Masson's trichrome festések során (14. ábra „e” panel). Korábbi

tanulmányok alapján 0,5 %-ban, 10 hétig alkalmazott almentráis koleszterin már mérhető változásokat okoz az izolált miociták kontraktilis-relaxációs paramétereiben, de még nem észlelhető megnövekedett nyomásgradiens vagy fibrózis jelenléte [129]. Az általunk alkalmazott kezelés (1%, 16 hét) viszont úgy tűnik, már elegendő ahhoz, hogy a sejtszinten létrejött változások globálisan is észlelhetőek legyenek, emelkedett nyomásban és következményes hipertrófiában, fibrózisban manifestálódva. A nyomásnövekedés (pl. az aorta-sztenózis miatt) következtében kialakult adaptív hipertróf válasz tulajdonképpen a kompenzáló-mechanizmusok része, célja a falra ható nyomás normalizálása, ezáltal a kontraktilis teljesítmény megőrzése. Azonban a patológiás hipertrófia extracelluláris változásokkal, valamint az általunk is tapasztalt fibrotikus szövet megjelenésével társul, és a maladaptív válasz részeként hozzájárul a szívelégtelenség progrediálásához [39]. A fibrózis humán diasztolés elégtelenségben (HFpEF) is igen karakterisztikus, okai között pedig a fent említett nyomásnövekedés, valamint endothel-diszfunkció és makrofág-infiltráció sorolhatók fel [144].

A szisztolés kamrafunkciók tekintetében kismértékű, szignifikáns csökkenést tapasztalhattunk a HC állatok ejekciós frakciójában, azonban ennek értéke még a fiziológiásnak tekintett tartományban maradt (5. táblázat). Ugyanakkor a szenzitívebb STE echokardiográfia alkalmazásával meghatározott GLS érték, vagyis a hosszanti rostok „tömörödése” szignifikánsan kisebb volt a HC csoportban, ezzel jelezve a pumpafunkció kezdődő károsodását (6. táblázat). Eredményeink megerősítik Liu és mtsai munkáját (2014), akik hasonló modellen a longitudinális és circumferenciális strain csökkenését írták le, megőrzött ejekciós frakció mellett [145], továbbá vizsgálatukban a miokardiális strain értékek fordítottan korreláltak a vér koleszterin- és LDL-koncentrációjával. A STE módszer alkalmazása az iránymutatásokba még nem került bele, azonban mivel a módszer igen érzékeny, és már egészen korai stádiumban jelezheti a kardiális funkciózavart, szélesebb körű elterjedése kívánatos lenne.

A szérum paraméterek tekintetében látható volt, hogy a HC csoport állataiban az LDL-koleszterin, ennek fehérje-komponense, az apolipoprotein B, valamint az aterogén index szignifikánsan emelkedett. Ezeket a változásokat az aortában detektált ateroszklerotikus léziók megjelenése kísérte (8. táblázat és 14. ábra). Habár a koronária-ereket külön nem vizsgáltuk, feltételezzük, hogy koronária-ateroszklerózis is fennállt, hiszen erős klinikai evidenciák támasztják alá, hogy az aortában megjelenő plakkosodás már perzisztáló koronária-betegségre (CAD) utal [146]. Az ateroszklerózis megjelenése ellenére azt feltételezhetjük, hogy irreverzibilis iszkémia, illetve miokardiális infarktus még nem zajlott le a HC csoport állataiban, ugyanis a CK-MB szintje nem emelkedett, illetve a tájékoztató festéseken sem találtuk elhalt

szívizom-szövet jeleit. Korábbi vizsgálataink is azt mutatták, hogy miokardiális infarktus csak nagyobb koleszterin-koncentráció, illetve hosszabb idejű kezelés után alakul ki [127]. A troponin T szintje emelkedett volt a HC csoportban (a Kontrollnak mintegy 3-szorosa), azonban értéke még az AMI-t jelző szint alatt maradt (mintegy 50-szeres emelkedés). Irodalmi adatok alapján a troponin T emelkedése összefüggésben áll a bal kamrai csökkent relaxációval (statisztikailag a TDI e' hullám csökkenésével) HFpEF páciensek esetében [147], így feltételezhetően a troponin T enyhe emelkedése nyúl modell esetében is a relaxációs zavar egyik markere, természetesen a csökkent e' hullámmal együtt. A hiperkoleszterinémia és az ateroszklerózis endothel-diszfunkcióval párosul, már a betegség korai stádiumában [148]. Az endothel-diszfunkció legfontosabb jelzője a csökkent vazorelaxáció, mely a nitrogén-monoxid jelátviteli út zavara miatt alakul ki. A mikrovaszkuláris gyulladás és a koronária-betegség - a megnövekedett utóterhelés mellett - a diasztolés elégtelenség legfőbb okai, melyek csökkent NO bioelérhetőséget, ezáltal alacsony cGMP-szintet és PKG aktivitást okoznak mind a vaszkulaturában, mind a környező miocitákban. Ezáltal a NO jelátviteli útvonal zavara nem csak az endothel-diszfunkció és az ateroszklerózis kulcsfontosságú tényezője, hanem a PKG szignalizációs kaszkád alulműködését is okozhatja a kardiomicitákban, hozzájárulva ezzel az emelkedett nyugalmi feszüléshez, fibrózishoz és diasztolés elégtelenséghez [50, 51]. Saját eredményeink alapján a HC csoport ér-preparátumaiban drámaian csökkent az acetil-kolinra adott válasz, vagyis az endothel-függő vazorelaxáció, melyet az ATP-vel végzett kísérletek is megerősítettek (13. ábra). Ezzel egyidejűleg, új eredményként a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját tapasztaltuk a HC állatok aorta-mintáiból készített izolátumokban. A PDE9A megnövekedett expressziója hozzájárulhat a csökkent vaszkuláris cGMP-szinthez a NO-útvonaltól függetlenül, ezáltal pedig az érsimaizom relaxációjának zavarához is. Az aorta plakkosodása nem csupán a vazorelaxációs zavaron át, hanem „fizikailag”, az ér lumenének csökkentésével is hozzájárulhat a megnövekedett ellenálláshoz, ezáltal az emelkedett utóterheléshez, tovább rontva a diasztolés elégtelenséget (hasonlatosan az aorta részleges lekötésével létrehozott, nyomásterhelt (pl. TAC) állatmodellekhez) [149].

A kardiális- és endothel-diszfunkciót, valamint a megnövekedett kiáramlási nyomást (aorta-sztenózt) tehát sikeresen igazoltuk a HC csoportban, azonban a szervek nedves/száraz tömegarányai alapján ödéma jelenléte még nem volt kimutatható, továbbá, az NT-proBNP mint rutin marker meghatározása sikertelen volt (a szérumszintek a detektálási limit alatt voltak). Ezek alapján nem jelenthető ki, hogy a kardiális diszfunkció már manifeszt szívelégtelenséget okozott volna HC csoportban, ugyanakkor a modell kimeríti az AHA állásfoglalását az aorta-sztenózis állatmodelljeire vonatkozóan, minthogy a hipertrófia, fibrózis és diasztolés

diszfunkció igazolódott, megnövekedett töltőnyomással és pitvari mérettel, illetve enyhén csökkent szisztolés funkcióval [111]. Ez a fázis – a humán klasszifikáció alapján – az AHA „B” stádiumának felel meg a szívelégtelenség kialakulásának idővonalán (strukturális szívbetegség) [111].

A tanulmány legfontosabb, új eredménye a PDE9A enzim fokozott expressziójának kimutatása ateroszklerózis körülmények között miokardiális és vaszkuláris mintákból, tudomásunk szerint első alkalommal (15. ábra, „e” panel). A PDE9A enzim szerepe jelenleg igen intenzív tudományos érdeklődésre tart számot, hiszen a natriuretikus peptid-útvonalon képződő cGMP lebontásával hozzájárul a kardiális diszfunkció patológiájához, és felveti a NO- és PDE5-független farmakológia beavatkozások lehetőségét is. Míg a NO-útvonalon képződő cGMP-t a jól ismert PDE5 izoforma bontja 5'-GMP-vé, addig a PDE9A izoforma a NP-útvonalon keresztül generált cGMP lebontásáért felelős, ugyanis az enzim kompartmentalizáltan, a T-tubulus membránja közelében helyezkedik el [68]. A PDE5-gátlókkal végzett terápiák, habár állatmodelleken ígéretesek voltak, nem hoztak igazi klinikai sikereket [150-153], ezért a cGMP-szint alternatív útvonalon történő megemelése reménykeltő lehet. HFpEF-ben ráadásul a PKG aktivitása és a cGMP szintje alacsony, így a PDE5-gátló terápia csak akkor lehet sikeres, ha a csökkent cGMP-szintet nagyrészt az upregulálódott PDE5 okozta, nem pedig más patológiás ok [150]. A PDE9A szignalizáció leírása ezért is igen fontos láncszem a patofiziológia mélyebb megértésében és a terápiák fejlődésében. A PDE9A fokozott miokardiális expresszióját nyomásterhelés során kialakuló szívelégtelen egérmódelben, valamint humán páciensekből származó mintákon is kimutatták (Lee és mtsai, Nature, 2015), az enzim deléción pedig csökkentette a fibrózist és a kardiális diszfunkciót [68]. Saját eredményeink alapján a PDE9A ateroszklerózis talaján kialakuló kardiális diszfunkció korai szakaszában upregulálódik, mind a vaszkulátúrában, mind pedig a miokardiumban, így a jövőben ígéretes terápia célponttá válhat.

A PKG jelátviteli út tagjai közül a VASP protein expresszióját is meghatároztuk, mely emelkedettnek bizonyult a HC csoportban (15. ábra „a”). Ez az eredmény egybevágn azon munkákkal, amelyek megnövekedett VASP-szintet mutattak ki hipertróf (nyomásterhelt) miokardiumban [154], ugyanakkor az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkcióban a fokozott VASP-expressziót elsőként írtuk le. Ez alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a hiperkoleszterinémia/ateroszklerózis valódi nyomásnövekedést okoz (ld. echokardiográfiás eredmények), annak következményes molekuláris patológiai változásaival. Míg a nyomásterhelés emelkedett VASP-expressziót okoz, VASP-deléción után fibrózis és hipertrófia jelenik meg egérmódelben, amely azt sugallja, hogy a sejt-sejt kölcsönhatásokban

és citoszkeleton-organizációban részt vevő VASP protein hipo- és hiperaktivációja egyaránt kóros folyamatokat indíthat el [154]. Mivel a VASP 239-es szerin aminosava a PKG foszforilációs célpontja, a foszforilált VASP meghatározásával a Protein Kináz G foszforilációs aktivitásáról nyerhetünk információt, a patkánymodell-kísérleteknél már leírt módon [57]. Az, hogy a VASP Ser239-es aminosavának foszforilációját az eNOS útvonalon generált NO-cGMP, vagy az NP-cGMP indíthatja el, kérdéses. Sartoretto (2009) szerint eNOS knockout egerek kardiomiocitáiban a VASP-foszforiláció változatlan, és fiziológiásan a natriuretikus peptid útvonalon képződött cGMP okozza a folyamatot, ellenben exogén NO adására a pVASP szintje nőhet [154]. Az érfalban viszont a VASP Ser239-es foszforilációja az endothel-diszfunkció megjelenésével és az NO csökkenésével egyértelműen alacsonyabb lesz [155]. A fentiek alapján a VASP foszforilációja különböző sejttípusokban nem csak a PKG aktivitásától, hanem a kofaktor cGMP képződési módjától és lokalizációjától is függhet.

A HC csoport állataiban a pVASP/VASP arány nem változott szignifikánsan a Kontrollhoz képest, amely változatlan PKG aktivitásra utal (15. ábra, „d”). A PKG aktivitást másik oldalról a miokardiális cGMP-szint mérésével is alátámasztottuk, amely szintén nem mutatott különbséget a csoportok között (15. ábra, „c”). Mindezek ellenére a Protein Kináz G enzim expressziója szignifikánsan megemelkedett a HC csoportban. A fenti eredményekre egy lehetséges magyarázat, hogy a patológiás válasz során a kardioprotektív PKG enzim expressziója megnövekszik, de hiába áll rendelkezésre több enzim-molekula, ha a kofaktor (cGMP) hiányában a PKG aktivitása nem tud megnövekedni, így az nem képes fokozni kardioprotektív effektorainak aktivitását. Vizsgálataink alapján a kofaktor, vagyis a cGMP szintjének növekedését a túlexpresszáldott PDE9A gátolhatja. Mechanizmusában hasonló eredményekre jutottak magyar kutatók a diasztolés szívelégtelen ZDF patkánymodellel végzett kísérletsorozatokban (Mátyás és mtsai, Eur J Heart Fail, 2017). A beteg állatokban csökkent cGMP-szint és pVASP/VASP arány volt tapasztalható, ugyanakkor a PKG enzim, illetve a NO-cGMP lebontásáért felelős PDE5A expressziója megnövekedett [156]. Saját eredményeink ugyanezt a sémát mutatják, viszont a PDE9A enzim tekintetében, és ateroszklerózis modellen. Lehetséges, hogy a változatlan cGMP szint annak eredménye, hogy a növekvő PDE9A expresszió következtében csökkenő cGMP szintet a NO útvonal mintegy kompenzálja, és *vice versa*. A fenti két eredményt összevetve érdemes lenne együtt vizsgálni a PDE5 és PDE9A expressziókat, hiszen valószínűleg betegségmodellől függően eltérő mértékben járulnak hozzá a PKG útvonal aktivitásának csökkenéséhez, így a kardioprotektív jelátvitel gátlásához.

A transzlációs medicina szempontjából elmondható, hogy emberben - természetesen - a megnövelt koleszterin-bevitel nem okoz olyan mértékű és gyorsaságú patológiás változásokat,

mint a nyúl modell esetén, habár a hiperkoleszterinémia a CAD, az AMI és szívelégtelenség közvetlen rizikófaktor. A nyúl modellben viszont az ateroszklerózis indukálta kardiális és vaszkuláris változások gyorsan kifejlődnek, és a kardiális diszfunkció patofiziológiája és klinikai képe az emberéhez hasonló. Ennek egyik oka, hogy a nyúl szívének fiziológiai tulajdonságai (ioncsatornák, Ca-homeosztázis, miozin-izofomák) közelebb állnak az emberéhez, mint a kis rágcsálóké [113]. Megjegyzendő, hogy a nyúl növényevő volta ellenére a koleszterin-háztartásában részt vevő fehérjék és transzporterek (CETP: cholesterylester transfer protein jelenléte, HDL/LDL aránya) is nagy homológiát mutatnak az emberével, így a nyúl modell továbbra is elérhető és előnyös eszköz a kardiológiai kutatások terén [125].

A tanulmány limitációi között megemlítenéd, hogy a kardiális patológiát igazoló NT-pro-BNP szinteket nem tudtuk meghatározni (a szintek a detektálási limit alá estek). A szignalizációs útvonal szempontjából érdemes lett volna a PDE5 enzim expressziójának, illetve a GotoK modellhez hasonlóan a PLB/SERCA aktivitásának meghatározása is. Ezek, és egyéb, az eredmények alapján felmerülő kérdések megválaszolása későbbi, illetve folyamatban lévő tanulmányok feladata lesz.

Összefoglalva, eredeti célkitűzéseink tükrében, a fenti két tanulmány alapján az alábbi új eredményeket fogalmaztuk meg a doktori értekezésben:

- A BGP-15 kezelés javítja a 2-es típusú diabétesz következtében károsodott diasztolés szívfunctiót Goto-Kakizaki patkánymodellen, metabolikus- és vaszkuláris hatásoktól függetlenül; és a BGP-15 kedvező hatásai mögött részben a foszfolambán Ser16-os aminosaván történő foszforiláltságának emelkedése, ezáltal a SERCA2a pumpa megőrzött functiója állhat, mely a Protein Kináz G jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül valósulhat meg.
- Nyúl modellen az ateroszklerózis talaján kialakult, manifeszt kardiális diszfunkció a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját eredményezi az érfalban és miokardiumban, mely a szívizom-szövetben együtt jár a PKG enzim expressziójának növekedésével, változatlan aktivitás mellett; így a PDE9A túlexpresszáltága hozzájárulhat a kardioprotektív szignálok visszaszorításához.

A két állatmodellen végzett vizsgálatok eredményei felvetik annak lehetőségét, hogy a kezdeti stádiumú, csak echokardiográfiásan észlelhető diabéteszes kardiomiopátia és kardiális diszfunkció még nem okoz jelentős emelkedést a PDE9A expressziójában, míg a súlyosabb fokú, ateroszklerózis talaján kialakuló manifeszt szívfunkció-romlás a PDE9A fokozott expressziójával jár együtt.

A cGMP-PKG-PDE9A szignalizációs útvonal kulcsfontosságú szerepet tölt be a kardiális funkciózavar és a szívelégtelenség patofiziológiájában, így részletesebb felderítése, illetve farmakológiai befolyásolásának vizsgálata új terápiák lehetőségét veti fel mind a diabétesz, mind az ateroszklerózis kapcsán kialakult patológias állapotokban. A BGP-15 gyógyszerjelölt további vizsgálata azért is jelentős, mivel az orvostudomány jelenleg nem rendelkezik hatékony gyógyszerrel sem a diabéteszes kardiomiopátia, sem az azzal gyakorta együtt járó diasztolés szívelégtelenség terápiájában, melyek esetében a cGMP-PKG útvonalra ható farmakonoknak kiemelt szerepe lehet [136].

Eredményeinkkel - reményeink szerint - hozzájárulhatunk a kardiális diszfunkció és a szívelégtelenség patofiziológiájának mélyebb megértéséhez, és a kardiovaszkuláris rendszert célzó farmakoterápiás eljárások jövőbeni fejlődéséhez.

6. Összefoglalás/Summary

A diabetes mellitus és atherosclerosis olyan patofiziológiai változásokat indukálnak az érrendszerben és a miokardiumban, melyek talaján kardiális funkciózavar jön létre. Az utóbbi évtized kutatásai a cGMP-PKG jelátviteli útvonal szerepére mutattak rá a patológiai változások mögött. Munkámban célul tűztük ki a diabetes mellitus során kifejlődő kardiális diszfunkció értékelését Goto-Kakizaki patkánymodellen, valamint a BGP-15 gyógyszerjelölt kardiiovaszkuláris hatásainak összehasonlítását ismert, pleiotróp hatású antidiabetikumokkal, a PKG útvonal tekintetében. Továbbá, célunk volt az atherosclerosis során kialakult kardiális- és endothel- diszfunkció részletes feltérképezése hiperkoleszterinémias nyúl modellen, a cGMP-PKG-PDE9A jelátviteli útvonal szerepének vizsgálatával. Eredményeink alapján a BGP-15 kezelés javítja a 2-es típusú diabetes következtében károsodott diasztolés funkciót Goto-Kakizaki patkánymodellen, metabolikus- és vaszkuláris hatásoktól függetlenül. A BGP-15 kedvező hatásai mögött részben a foszfolambán Ser16-os aminosaván történő foszforiláltságának emelkedése, ezáltal a SERCA2a pumpa megőrzött funkciója állhat, mely a Protein Kináz G jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül valósulhat meg a miokardiumban. Nyúl modellen az atherosclerosis talaján kialakult, kardiális diszfunkció a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját eredményezi az érfalban és miokardiumban, mely a szívizomszövetben együtt jár a PKG enzim expressziójának növekedésével, változatlan aktivitás mellett, így a PDE9A túlexpresszáltága hozzájárulhat a kardioprotektív szignálok visszaszorításához atherosclerosis-sal társuló kórképekben.

Summary

Both diabetes mellitus and atherosclerosis induce pathological changes in the vasculature and in the myocardial tissue, that may result in cardiac dysfunction. Recent investigations emphasize the diminished activity of the cGMP-PKG signaling pathway behind the pathophysiology. Our aim was to characterize cardiac dysfunction induced by diabetes in the Goto-Kakizaki rat, and to compare the cardiovascular effects of the drug candidate BGP-15 to such actions of well-known pleiotropic antidiabetic agents, with particular interest regarding the Protein Kinase G pathway. Secondly, we aimed to investigate cardiac and endothelial dysfunction as a result of atherogenic diet in a hypercholesterolemic rabbit model, concerning the role of the same cGMP-PKG-PDE9A signaling pathway. According to our results, BGP-15 delays the onset of diabetic cardiomyopathy in the Goto-Kakizaki rat, independent from any beneficial metabolic or vascular effect. BGP-15 seems to increase phospholamban phosphorylation at Ser16, that may preserve SERCA2a pump function. This mechanism may be related to increased activity of PKG enzyme, as showed by elevated pVASP/VASP ratios in the myocardial tissues of rats. Furthermore, our findings demonstrate that atherosclerotic cardiovascular disease may be associated with the upregulation of PDE9A enzyme in aortic vessels and myocardial tissues of rabbits. This is accompanied by the increased expression but not activity of the PKG enzyme in the heart, thus the upregulation of PDE9A may contribute to diminished activity of cardioprotective pathways under atherosclerotic conditions.

7. Irodalomjegyzék

1. Mensah, G.A., et al., *Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications*. Circ Res, 2017. **120**(2): p. 366-380.
2. Roth, G.A., et al., *Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality*. N Engl J Med, 2015. **372**(14): p. 1333-41.
3. Fordyce, C.B., et al., *Cardiovascular drug development: is it dead or just hibernating?* J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(15): p. 1567-82.
4. Stern, C.S. and J. Lebowitz, *Latest drug developments in the field of cardiovascular disease*. Int J Angiol, 2010. **19**(3): p. e100-5.
5. Hwang, T.J., et al., *Temporal Trends and Factors Associated With Cardiovascular Drug Development, 1990 to 2012*. JACC Basic Transl Sci, 2016. **1**(5): p. 301-308.
6. Stoekenbroek, R.M., et al., *Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **15**(1): p. 52-62.
7. Bartell, N. and W.H. Frishman, *Neprilysin Inhibition and the Treatment of Heart Failure: Recent Steps in the Right Direction*. Cardiol Rev, 2017. **25**(6): p. 315-320.
8. Huang, C.L., *SERCA2a stimulation by istaroxime: a novel mechanism of action with translational implications*. Br J Pharmacol, 2013. **170**(3): p. 486-8.
9. Mamidi, R., et al., *Dose-Dependent Effects of the Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil on Cross-Bridge Behavior and Force Generation in Failing Human Myocardium*. Circ Heart Fail, 2017. **10**(10).
10. Pabel, S., et al., *Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure*. Eur J Heart Fail, 2018. **20**(12): p. 1690-1700.
11. Hivatal, K.S., *Egészségesen várható élettartam*. STATISZTIKAI TÜKÖR, 2015. **2015/27**.
12. Mehler, R.E., *How the Circulatory System Works*. 2001: Blackwell Science.
13. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 891-975.
14. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(16): p. e147-239.
15. Ziaieian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
16. Roger, V.L., *Epidemiology of heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 646-59.
17. Sharma, A., et al., *Causes of Death in a Contemporary Cohort of Patients With Type 2 Diabetes and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Insights From the TECOS Trial*. Diabetes Care, 2017. **40**(12): p. 1763-1770.
18. Bugger, H. and E.D. Abel, *Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy*. Diabetologia, 2014. **57**(4): p. 660-71.
19. de Ferranti, S.D., et al., *Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association*. Circulation, 2014. **130**(13): p. 1110-30.
20. Tate, M., D.J. Grieve, and R.H. Ritchie, *Are targeted therapies for diabetic cardiomyopathy on the horizon?* Clin Sci (Lond), 2017. **131**(10): p. 897-915.
21. Jia, G., V.G. DeMarco, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(3): p. 144-53.

22. Montagnani, M., *Diabetic cardiomyopathy: how much does it depend on AGE?* Br J Pharmacol, 2008. **154**(4): p. 725-6.
23. Bodiga, V.L., S.R. Eda, and S. Bodiga, *Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy.* Heart Fail Rev, 2014. **19**(1): p. 49-63.
24. Bidasee, K.R., et al., *Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.* Diabetes, 2004. **53**(2): p. 463-73.
25. Radovits, T., et al., *An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction.* J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 728741.
26. Prenner, S.B. and J.A. Chirinos, *Arterial stiffness in diabetes mellitus.* Atherosclerosis, 2015. **238**(2): p. 370-9.
27. Dhingra, R. and R.S. Vasan, *Diabetes and the risk of heart failure.* Heart Fail Clin, 2012. **8**(1): p. 125-33.
28. Eurich, D.T., et al., *Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review.* BMJ, 2007. **335**(7618): p. 497.
29. Ference, B.A., et al., *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel.* Eur Heart J, 2017. **38**(32): p. 2459-2472.
30. Velagaleti, R.S. and R.S. Vasan, *Heart failure in the twenty-first century: is it a coronary artery disease or hypertension problem?* Cardiol Clin, 2007. **25**(4): p. 487-95; v.
31. Bahit, M.C., A. Kochar, and C.B. Granger, *Post-Myocardial Infarction Heart Failure.* JACC Heart Fail, 2018. **6**(3): p. 179-186.
32. Torabi, A., et al., *The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction.* Eur Heart J, 2008. **29**(7): p. 859-70.
33. Velagaleti, R.S., et al., *Relations of lipid concentrations to heart failure incidence: the Framingham Heart Study.* Circulation, 2009. **120**(23): p. 2345-51.
34. Kumar, V., *Robbins - A patología alapjai.* 2014: MEDICINA.
35. Tsao, C.W., et al., *Relation of Central Arterial Stiffness to Incident Heart Failure in the Community.* J Am Heart Assoc, 2015. **4**(11).
36. Fernandes, V.R., et al., *Arterial stiffness is associated with regional ventricular systolic and diastolic dysfunction: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(1): p. 194-201.
37. Mattace-Raso, F.U., et al., *Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study.* Circulation, 2006. **113**(5): p. 657-63.
38. Schirone, L., et al., *A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling.* Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 3920195.
39. Hilfiker-Kleiner, D., U. Landmesser, and H. Drexler, *Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis.* Journal of the American College of Cardiology, 2006. **48**(9, Supplement): p. A56-A66.
40. Volz, H.C., et al., *S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-kappaB signaling.* Basic Res Cardiol, 2012. **107**(2): p. 250.
41. Frati, G., et al., *An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy.* Cardiovasc Res, 2017. **113**(4): p. 378-388.
42. Villegas, S., F.J. Villarreal, and W.H. Dillmann, *Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes.* Basic Res Cardiol, 2000. **95**(1): p. 47-54.

43. Arany, Z., et al., *Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 10086-91.
44. Rosca, M.G. and C.L. Hoppel, *Mitochondrial dysfunction in heart failure*. Heart Fail Rev, 2013. **18**(5): p. 607-22.
45. Verma, S.K., V.N.S. Garikipati, and R. Kishore, *Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(5): p. 1098-1105.
46. Aroor, A.R., C.H. Mandavia, and J.R. Sowers, *Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms*. Heart Fail Clin, 2012. **8**(4): p. 609-17.
47. van Heerebeek, L., et al., *Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction*. Circulation, 2012. **126**(7): p. 830-9.
48. Munzel, T., et al., *Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2172-83.
49. Wolinsky, H., *A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis*. Circ Res, 1980. **47**(3): p. 301-11.
50. Gevaert, A.B., et al., *Targeting Endothelial Function to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The Promise of Exercise Training*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4865756.
51. van Heerebeek, L. and W.J. Paulus, *Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today?* Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 227-36.
52. Zois, N.E., et al., *Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(7): p. 403-12.
53. Kong, Q. and R.M. Blanton, *Protein kinase G I and heart failure: Shifting focus from vascular unloading to direct myocardial antiremodeling effects*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(6): p. 1268-83.
54. Ruetten, H., et al., *Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(3): p. 444-53.
55. Oliver, P.M., et al., *Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14730-5.
56. Benz, P.M., et al., *Mena/VASP and alphaII-Spectrin complexes regulate cytoplasmic actin networks in cardiomyocytes and protect from conduction abnormalities and dilated cardiomyopathy*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 56.
57. Smolenski, A., et al., *Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20029-35.
58. Ahmed, S.H. and M.L. Lindsey, *Titin phosphorylation: myocardial passive stiffness regulated by the intracellular giant*. Circ Res, 2009. **105**(7): p. 611-3.
59. Kruger, M., et al., *Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs*. Circ Res, 2009. **104**(1): p. 87-94.
60. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
61. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
62. Masterson, L.R., et al., *cAMP-dependent protein kinase A selects the excited state of the membrane substrate phospholamban*. J Mol Biol, 2011. **412**(2): p. 155-64.

63. Zhang, Q., et al., *Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction*. Cell Calcium, 2005. **37**(3): p. 259-66.
64. Frantz, S., et al., *Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I*. Eur Heart J, 2013. **34**(16): p. 1233-44.
65. Wang, H., et al., *Sildenafil Treatment in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Targeted Metabolomic Profiling in the RELAX Trial*. JAMA Cardiol, 2017. **2**(8): p. 896-901.
66. Hutchings, D.C., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibitors and the heart: compound cardioprotection?* Heart, 2018. **104**(15): p. 1244-1250.
67. Barnett, C.F. and R.F. Machado, *Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(4): p. 411-22.
68. Lee, D.I., et al., *Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease*. Nature, 2015. **519**(7544): p. 472-6.
69. Kang, S.H., et al., *Prognostic value of NT-proBNP in heart failure with preserved versus reduced EF*. Heart, 2015. **101**(23): p. 1881-8.
70. Roberts, E., et al., *The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting*. BMJ, 2015. **350**: p. h910.
71. Gonzalez, J.A. and C.M. Kramer, *Role of Imaging Techniques for Diagnosis, Prognosis and Management of Heart Failure Patients: Cardiac Magnetic Resonance*. Curr Heart Fail Rep, 2015. **12**(4): p. 276-83.
72. Singh, S. and A. Goyal, *The origin of echocardiography: a tribute to Inge Edler*. Tex Heart Inst J, 2007. **34**(4): p. 431-8.
73. Mohamed, A.A., A.A. Arifi, and A. Omran, *The basics of echocardiography*. J Saudi Heart Assoc, 2010. **22**(2): p. 71-6.
74. Chengode, S., *Left ventricular global systolic function assessment by echocardiography*. Ann Card Anaesth, 2016. **19**(Supplement): p. S26-S34.
75. Giannuzzi, P., et al., *Doppler-derived mitral deceleration time of early filling as a strong predictor of pulmonary capillary wedge pressure in postinfarction patients with left ventricular systolic dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(7): p. 1630-7.
76. Harrison, M.R., et al., *Effect of heart rate on left ventricular diastolic transmitral flow velocity patterns assessed by Doppler echocardiography in normal subjects*. Am J Cardiol, 1991. **67**(7): p. 622-7.
77. Baldi, J.C., et al., *Left ventricular diastolic filling and systolic function of young and older trained and untrained men*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(6): p. 2570-5.
78. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr, 2016. **29**(4): p. 277-314.
79. Caso, P., et al., *Pulsed Doppler tissue imaging in endurance athletes: relation between left ventricular preload and myocardial regional diastolic function*. Am J Cardiol, 2000. **85**(9): p. 1131-6.
80. Ng, A.C., L. Thomas, and D.Y. Leung, *Tissue Doppler echocardiography*. Minerva Cardioangiol, 2010. **58**(3): p. 357-78.
81. Park, J.H. and T.H. Marwick, *Use and Limitations of E/e' to Assess Left Ventricular Filling Pressure by Echocardiography*. J Cardiovasc Ultrasound, 2011. **19**(4): p. 169-73.

82. Temporelli, P.L., et al., *Doppler-derived mitral deceleration time as a strong prognostic marker of left ventricular remodeling and survival after acute myocardial infarction: results of the GISSI-3 echo substudy*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(9): p. 1646-53.
83. Myreng, Y. and O.A. Smiseth, *Assessment of left ventricular relaxation by Doppler echocardiography. Comparison of isovolumic relaxation time and transmitral flow velocities with time constant of isovolumic relaxation*. Circulation, 1990. **81**(1): p. 260-6.
84. Ghazal, S.N., *Valsalva maneuver in echocardiography*. J Echocardiogr, 2017. **15**(1): p. 1-5.
85. Baumgartner, H., et al., *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(1): p. 1-25.
86. Tei, C., *New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function*. J Cardiol, 1995. **26**(2): p. 135-6.
87. Lakoumentas, J.A., et al., *The Tei index of myocardial performance: applications in cardiology*. Hellenic J Cardiol, 2005. **46**(1): p. 52-8.
88. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(2): p. 107-33.
89. Mirea, O., J. Duchenne, and J.U. Voigt, *Recent advances in echocardiography: strain and strain rate imaging*. F1000Res, 2016. **5**.
90. Marwick, T.H., *Measurement of strain and strain rate by echocardiography: ready for prime time?* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(7): p. 1313-27.
91. Dandel, M., et al., *Strain and strain rate imaging by echocardiography - basic concepts and clinical applicability*. Curr Cardiol Rev, 2009. **5**(2): p. 133-48.
92. Collier, P., D. Phelan, and A. Klein, *A Test in Context: Myocardial Strain Measured by Speckle-Tracking Echocardiography*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(8): p. 1043-1056.
93. Fürst, Z., *Farmakológia és Klinikai Farmakológia*. 2017: MEDICINA.
94. Srivastava, P.K., et al., *Estimated 5-Year Number Needed to Treat to Prevent Cardiovascular Death or Heart Failure Hospitalization With Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibition vs Standard Therapy for Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: An Analysis of Data From the PARADIGM-HF Trial*. JAMA Cardiol, 2018.
95. Akadémia, M.T. *Felismerésből új irány*. 2012; Available from: http://old.mta.hu/tudomany_hirei/felismeresbol-uj-irany-129734.
96. Racz, I., et al., *BGP-15 - a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor - protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(6): p. 1099-111.
97. Halmosi, R., et al., *Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(6): p. 1497-505.
98. Chung, J., et al., *HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1739-44.
99. Literati-Nagy, B., et al., *Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial*. Horm Metab Res, 2009. **41**(5): p. 374-80.
100. Literati-Nagy, B., et al., *Beneficial effect of the insulin sensitizer (HSP inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders*. Brain Res Bull, 2010. **83**(6): p. 340-4.
101. Literati-Nagy, B., et al., *Improvement of insulin sensitivity by a novel drug candidate, BGP-15, in different animal studies*. Metab Syndr Relat Disord, 2014. **12**(2): p. 125-31.

102. ClinicalTrials.gov. *Safety and Efficacy of BGP-15 in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*. 2010; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01069965>.
103. Henstridge, D.C., et al., *Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance*. Diabetes, 2014. **63**(6): p. 1881-94.
104. Sumegi, K., et al., *BGP-15 Protects against Oxidative Stress- or Lipopolysaccharide-Induced Mitochondrial Destabilization and Reduces Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169372.
105. Sorensen, J.C., et al., *BGP-15 Protects against Oxaliplatin-Induced Skeletal Myopathy and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Mice*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 137.
106. Gehrig, S.M., et al., *Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 394-8.
107. Sapra, G., et al., *The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5705.
108. Kennedy, T.L., et al., *BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in mdx and dko Mice with Differing Efficacies in Heart and Skeletal Muscle*. Am J Pathol, 2016. **186**(12): p. 3246-3260.
109. Salah, H., et al., *The chaperone co-inducer BGP-15 alleviates ventilation-induced diaphragm dysfunction*. Sci Transl Med, 2016. **8**(350): p. 350ra103.
110. Nascimento, T.L., M.T. Silva, and E.H. Miyabara, *BGP-15 improves contractile function of regenerating soleus muscle*. J Muscle Res Cell Motil, 2018. **39**(1-2): p. 25-34.
111. Houser, S.R., et al., *Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 131-50.
112. Valero-Munoz, M., W. Backman, and F. Sam, *Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a "Fishing Expedition"*. JACC Basic Transl Sci, 2017. **2**(6): p. 770-789.
113. Hasenfuss, G., *Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 60-76.
114. Camacho, P., et al., *Small mammalian animal models of heart disease*. Am J Cardiovasc Dis, 2016. **6**(3): p. 70-80.
115. Mihm, M.J., et al., *Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model*. Life Sci, 2001. **69**(5): p. 527-42.
116. Conceicao, G., et al., *Animal models of heart failure with preserved ejection fraction*. Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 275-86.
117. Goto, Y., M. Kakizaki, and N. Masaki, *Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding*. Tohoku J Exp Med, 1976. **119**(1): p. 85-90.
118. Portha, B., et al., *The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes?* Mol Cell Endocrinol, 2009. **297**(1-2): p. 73-85.
119. Movassat, J., et al., *Type 2 diabetes - a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9 Suppl 2**: p. 187-95.
120. Liu, T., et al., *Comparative Genome of GK and Wistar Rats Reveals Genetic Basis of Type 2 Diabetes*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0141859.
121. Gauguier, D., et al., *Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 38-43.
122. Picatoste, B., et al., *Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78330.

123. El-Omar, M.M., et al., *Cardiac dysfunction in the Goto-Kakizaki rat. A model of type II diabetes mellitus*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(2): p. 133-41.
124. Ostenson, C.G. and S. Efendic, *Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9 Suppl 2**: p. 180-6.
125. Fan, J., et al., *Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine*. Pharmacol Ther, 2015. **146**: p. 104-19.
126. Kolodgie, F.D., et al., *Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(12): p. 1454-64.
127. Kertesz, A., et al., *Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 19086-108.
128. Rubinstein, J., et al., *Hypercholesterolemia and myocardial function evaluated via tissue doppler imaging*. Cardiovasc Ultrasound, 2009. **7**: p. 56.
129. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 97-102.
130. Cimini, M., et al., *Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(3): p. 365-75.
131. D. Maj, J.B., P. Łapa, I. Sternstein, *The effect of crossing New Zealand White with Californian rabbits on growth and slaughter traits*. Arch. Anim. Breed, 2009. **52**: p. 205-211.
132. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
133. Lang, R.M., et al., *Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr, 2015. **28**(1): p. 1-39 e14.
134. Tei, C., et al., *New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy*. J Cardiol, 1995. **26**(6): p. 357-66.
135. Kuwabara, W.M.T., et al., *Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus?* PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0189622.
136. Papp, Z., et al., *Molecular and pathophysiological links between heart failure with preserved ejection fraction and type 2 diabetes mellitus*. Eur J Heart Fail, 2018. **20**(12): p. 1649-1652.
137. Peuler, J.D. and L.E. Phelps, *Sildenafil does not enhance but rather attenuates vasorelaxant effects of antidiabetic agents*. J Smooth Muscle Res, 2015. **51**: p. 22-36.
138. Huang, P.H., et al., *Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(1): p. 46-52.
139. Liao, H.W., et al., *Pioglitazone and cardiovascular outcomes in patients with insulin resistance, pre-diabetes and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open, 2017. **7**(1): p. e013927.

140. Hallakou, S., et al., *Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat*. Diabetes, 1997. **46**(9): p. 1393-9.
141. Sena, C.M., et al., *Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(2): p. 424-37.
142. Yoshida, T., et al., *Metformin primarily decreases plasma glucose not by gluconeogenesis suppression but by activating glucose utilization in a non-obese type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats*. Eur J Pharmacol, 2009. **623**(1-3): p. 141-7.
143. Gorbe, A., et al., *Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(5): p. 643-50.
144. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 44-52.
145. Liu, L., et al., *Association of hypercholesterolemia and cardiac function evaluated by speckle tracking echocardiography in a rabbit model*. Lipids Health Dis, 2014. **13**: p. 128.
146. Li, W., et al., *Association between abdominal aortic plaque and coronary artery disease*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 683-8.
147. Shah, R.V., et al., *Association between troponin T and impaired left ventricular relaxation in patients with acute decompensated heart failure with preserved systolic function*. Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(6): p. 765-8.
148. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
149. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
150. Rainer, P.P. and D.A. Kass, *Old dog, new tricks: novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G*. Cardiovasc Res, 2016. **111**(2): p. 154-62.
151. Inserte, J. and D. Garcia-Dorado, *The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(8): p. 1996-2009.
152. Guazzi, M., et al., *PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 8-17.
153. Redfield, M.M., et al., *Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial*. JAMA, 2013. **309**(12): p. 1268-77.
154. Sartoretto, J.L., et al., *Regulation of VASP phosphorylation in cardiac myocytes: differential regulation by cyclic nucleotides and modulation of protein expression in diabetic and hypertrophic heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(5): p. H1697-710.
155. Oelze, M., et al., *Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 999-1005.
156. Matyas, C., et al., *Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes*. Eur J Heart Fail, 2017. **19**(3): p. 326-336.



Nyilvántartási szám: DEENK/47/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Priksz Dániel
Neptun kód: BW72WL
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Kiss, R., Hollós, N., Varga, B., Németh, J., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy.
Molecules. 24 (3), 1-18, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24030586>
IF: 3.098 (2017)
2. **Priksz, D.**, Bombicz, M., Varga, B., Kurucz, A., Gesztelyi, R., Balla, J., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease.
Int. J. Mol. Sci. 19 (10), 1-18, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19102882>
IF: 3.687 (2017)





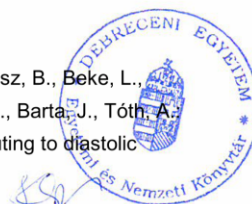
További közlemények

3. 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: 3.687 (2017)
4. Kurucz, A., Bombicz, M., Kiss, R., **Priksz, D.**, Varga, B., Hortobágyi, T., Trencsényi, G., Szabó, R., Pósa, A., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Heme oxygenase-1 activity as a correlate to exercise-mediated amelioration of cognitive decline and neuropathological alterations in an aging rat model of dementia.
Biomed Res. Int. 2018, 1-13, 2018.
IF: 2.583 (2017)
5. Kiss, R., Szabó, K., Gesztelyi, R., Somodi, S., Kovács, P., Szabó, Z., Németh, J., **Priksz, D.**, Kurucz, A., Juhász, B., Szilvássy, Z.: Insulin-Sensitizer Effects of Fenugreek Seeds in Parallel with Changes in Plasma MCH Levels in Healthy Volunteers.
Int. J. Mol. Sci. 19 (3), 771-, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030771>
IF: 3.687 (2017)
6. Varga, C., Veszélka, M., Kupai, K., Börzsei, D., Deim, Z., Szabó, R., Török, S., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Juhász, B., Radák, Z., Pósa, A.: The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: the Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk.
J. Sports Sci. Med. 17 (4), 580-588, 2018.
IF: 1.99 (2017)
7. Vecsernyés, M., Szokol, M., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Fülöp, G. Á., Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Alpha-MSH induces vasodilatation and exerts cardioprotection via the heme-oxygenase pathway in rat hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.227





8. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Varga, B., Kurucz, A., Kertész, A. B., Takács, Á., Pósa, A., Kiss, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil.
Int. J. Mol. Sci. 18 (7), 1-19, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071436>
IF: 3.687
9. Szokol, M., **Priksz, D.**, Bombicz, M., Varga, B., Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Csípő, T., Pósa, A., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Long term osmotic mini pump treatment with alpha-MSH improves myocardial function in Zucker Diabetic Fatty rats.
Molecules. 22 (10), 1-18, 2017.
IF: 3.098
10. 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
11. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Varga, B., Gesztelyi, R., Kertész, A. B., Lengyel, P., Balogh, P., Csupor, D., Hohmann, J., Bhattoa, H. P., Haines, D. D., Juhász, B.: Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits.
Int. J. Mol. Sci. 17 (8), E1284, 2016.
IF: 3.226
12. Fehér, P., Ujhelyi, Z., Váradi, J., Fenyvesi, F., Róka, E., Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.
Molecules. 21 (10), 1269, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101269>
IF: 2.861
13. Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Kovács, A., Csípő, T., Bódi, B., **Priksz, D.**, Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 310 (11), H1671-H1682, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>
IF: 3.348





14. Kertész, A. B., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF: 2.339
15. Juhász, B., Kertész, A. B., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF: 3.288

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 45,904

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,785

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, 2019.03.01.



8. Tárgyszavak

diszlipidémia
2-es típusú diabétesz mellitusz
Goto-Kakizaki
echokardiográfia
kardiális diszfunkció
szívelégtelenség
vazorelaxáció
Protein Kináz G
foszfodiészteráz enzim
BGP-15
metformin
pioglitazon

Keywords

dyslipidemia
type 2 diabetes mellitus
Goto-Kakizaki
echocardiography
cardiac dysfunction
heart failure
vasorelaxation
Protein kinase G
phosphodiesterase enzyme
BGP-15
metformin
pioglitazone

9. Köszönetnyilvánítás

Hálasan köszönöm Dr. Juhász Béla témavezetőmnek, hogy PhD hallgatójává fogadott, és tanácsaival nem csupán a szakmai munkában, hanem az élet egyéb területein is ellát, valamint odafigyelésével és baráti hozzáállásával napról-napra egyengeti magam és kollégáim pályafutását.

Köszönöm Dr. Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, hogy munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben minden lehetséges támogatás mellett végezhetem, és hogy szakmai felkészültségével példát állít munkatársai számára.

Óriási hálával tartozom közvetlen munkatársamnak, Dr. Kozma Mariannak, aki nem múló kreativitásával segíti a kutatások létrejöttét, barátságával és humorával pedig napról-napra támogat. Köszönet illeti közvetlen kollégámat, Dr. Varga Balázst a szakmai segítségéért és őszinte barátságáért.

Hálasan köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet jelenlegi és volt munkatársainak a magas szintű szakmai munkát és támogatást. Köszönöm Szegváriné Erdős Andrea és Oláh Krisztina kitartó segítségét a kísérletek elvégzésében.

Óriási köszönettel tartozom Dr. Gesztelyi Rudolfnak a kísérletek és a statisztikai elemzések során nyújtott segítségéért, valamint Dr. Kertész Attilának, akitől megtanulhattuk az echokardiográfia rejtelmeit.

Hálás vagyok kollaborációs partnereink, a DE Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, Dr. Tóth Attila és Dr. Papp Zoltán Professzoroknak, illetve Dr. Kovács Árpádnak, Dr. Fülöp Gábornak és Dr. Csípő Tamásnak segítségükért és ötleteikért. Köszönet illeti a DE Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait.

Köszönöm TDK hallgatóinknak, és volt munkatársainknak, a Gyógyszerésztudományi Kar alkalmazottainak őszinte támogatásukat. Köszönöm barátaim, Dr. Gaál Balázs és Dr. Pék Ádám tanácsait és segítségét.

Hálasan köszönöm a kitartó támogatást és szeretetet feleségemnek, Dr. Priksz Zsuzsának, és családom minden tagjának.

Munkámat ajánlom szeretett Nagypámnak, Priksz Mihálynak.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.



10. Függelék