

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Lampé Nóra**

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

**DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2022.**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Dr. Lampé Nóra**

**Témavezető: Dr. Juhász Béla**



**DEBRECENI EGYETEM  
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2022.**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	1
<b>2. Bevezetés és célkitűzés</b> .....	5
<b>3. Irodalmi áttekintés</b> .....	7
3.1. A metabolikus szindróma kritériumrendszere .....	7
3.2. A metabolikus szindróma prevalenciája .....	9
3.3. A metabolikus szindróma genetikai meghatározottsága .....	9
3.4. metabolikus szindróma patogenezise .....	10
3.5. A metabolikus szindróma társbetegségei .....	15
3.6. Metabolikus szindróma terápiás lehetőségei .....	16
3.7. BGP-15 .....	20
3.8. $\beta$ -receptorok .....	21
3.9. A PDE enzimek jelátviteli szerepe .....	23
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	25
4.1. Etikai engedélyek .....	25
4.2. Felhasznált anyagok, állatok, trabecula .....	25
4.3. Vizsgálatok kivitelezése .....	26
4.4. Statisztikai elemzés .....	36
<b>5. Eredmények</b> .....	38
5.1. Első kísérleti elrendezés - Izolált trabecula vizsgálata .....	38
5.1.1. Jobb pitvari minták kontrakciós ereje .....	38
5.1.2. Adenozinra adott válasz .....	40
5.1.3. Isoproterenolra adott válasz .....	41
5.1.4. Propranololra és BGP-15-re adott válasz .....	42
5.1.5. A betegadatok és a minták viselkedésének kapcsolata .....	45
5.2. Második kísérleti elrendezés – BGP-15-kezelt nyulak vizsgálata .....	47
5.2.1. Diasztolés funkció .....	47
5.2.2. Szérum lipid paraméterek .....	51
5.2.3. Endotélium-függő vazorelaxáció .....	51
5.2.4. cGMP szint .....	54
5.2.5. In vitro PDE1 gátlás .....	54
5.2.6. PKG-tengely .....	54

<b>6.</b>	<b>Megbeszélés</b> .....	60
<b>7.</b>	<b>Összefoglalás</b> .....	66
<b>8.</b>	<b>Summary</b> .....	67
<b>9.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	68
9.1.	A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom.....	68
9.2.	A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények és egyéb publikációk.....	81
<b>10.</b>	<b>Tárgyszavak</b> .....	83
<b>11.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	84
<b>12.</b>	<b>Függelék</b> .....	86

# 1. Rövidítések jegyzéke

5'-AMP	Adenosine-5'-monophosphate, Adenozin-5'-monofoszfát
5'-GMP	Guanosine-5'- monophosphate, Guanozin-5'-monofoszfát
ACE	Angiotensin-converting enzyme, Angiotenzin-konvertáló enzim
Ach	Acetylcholine, Acetilkolin
Ado	Adenosine, Adenozin
ANP	Atrial natriuretic peptide, Pitvari nátriuretikus peptid
Ao	Aortic diameter, Aortaátmérő
APLAX	Apical long axis, Apikális pozíció
apoB	Apolipoprotein B,
ARB	Angiotensin II receptor blocker, Angiotenzin II receptor blokkoló
AT	Angiotensin, Angiotenzin
ATL	Adipose triglycerid lipase, Adipóz triglicerid lipáz
ATP	Adenosine-5'- triphosphate, Adenozin-5'-trifoszfát
BGP-15	O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl) nicotinic acid amidoxime, (O-(3-piperidin-2-hidroxi-1-propil) nikotinsav amidoxim)
BMI	Body mass index, Testtömeg index
Ca <sup>2+</sup>	Calcium, Kalcium
CaCl <sub>2</sub>	Calcium-chloride, Kalcium-klorid
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, Ciklikus adenozin-monofoszfát
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate, Ciklikus guanozin-monofoszfát
CO <sub>2</sub> :	Carbon dioxide, Szén-dioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, Krónikus obstruktív tüdőbetegség
CV	Cardiovascular, Kardiovaszkuláris
DecT	Deceleration time, Decelerációs idő
DM	Diabetes mellitus, Diabétesz mellitus
DPP4-gátló	Dipeptidyl Peptidase-4 inhibitor, dipeptidil peptidáz-4 gátló
E/c görbe	Concentration-effect curve, Koncentráció-hatás görbe
E	Effect, Hatás
EC <sub>50</sub>	Median effective dose, Félmaximális hatás
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Etilén-diamin-tetraecetsav
EF	Ejection Fraction, Ejekciós frakció

eNOS	Endothelial nitric oxide synthase, Endoteliális nitrogén monoxid szintáz
ET	Ejection time, Ejekciós idő
F	Force, Erő
FFA	Free fatty acid, Szabad zsírsav
FS	Fraction shortening, Frakcionált rövidülés
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GLP-1	Glucagon-like peptid 1, Glükagonszerű polipeptid-1
GLS	Global Longitudinal Strain, Globális Longitudinális Strain
GLUT4	Glucose transporter type 4, Glükóz transzporter 4
HbA1c	Hemoglobin A1c
HC	Hypercholesterolaemia, Hiperkoleszterinémia
HCl	Hydrochloric acid, Sósav
HDL	High density lipoprotein, Nagy sűrűségű lipoprotein
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A
HOMA index	Homeostatic modell assessment
HR	Heart rate, Szívfrekvencia
HSA	Hormone-sensitive lipase, Hormon szenzitív lipáz
Hsp	Heat shock protein, Hősokk fehérje
IDF	International Diabetes Federation, Nemzetközi Diabétesz Szövetség
IGF1R	Insulin-like growth factor receptor 1, Inzulinszerű növekedési faktor receptor 1
IGT	Impaired glucose tolerance, Károsodott glükóz tolerancia
IL	Interleukin
ISO	Isoprenaline, Isoproterenol, Isoprenalin
IVCT	Isovolumic contraction time, Izovolumetriás kontrakciós idő
IVRT	Isovolumic relaxation time, Izovolumetriás relaxációs idő
K <sup>+</sup>	Potassium, Kálium
KCl	Potassium chloride, Kálium-klorid
LA	Left atria, Bal pitvar
LDL	Low-density lipoprotein, Alacsony sűrűségű lipoprotein
LOX	Lectin-like oxidized LDL receptor, Lektin-szerű oxidált alacsony denzitású lipoprotein receptor

LV	Left ventricle, Bal kamra
LVOT	Left ventricle outflow tract, Bal kamrai kiáramlási traktus
MAPSE	Mitral annular plane systolic excursion, Mitrális anulus szisztolés csúcskitérés
MESA:	Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium chloride, Magnézium-klorid
MPI	Myocardial Performance Index, Miokardiális teljesítmény index
NA	Norepinephrine, Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Sodium, Nátrium
NaCl	Sodium chloride, Nátrium-klorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NaF	Sodium fluoride, Nátrium-fluorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodium dihydrogen phosphate, Nátrium-dihidrogén-foszfát
NaHCO <sub>3</sub>	Sodium bicarbonate, Nátrium-hidrogénkarbonát
NCEP-ATP III	National cholesterol education third Adult Treatment Panel, Nemzeti Koleszterin Program – Felnőttkori Kezelési Panel III,
NO	Nitric Oxide, Nitrogén-monoxid
ANPR-A és B	Natriuretic peptide receptor A and B, Nátriuretikus peptid receptor A és B
O <sub>2</sub>	Oxygen, Oxigén
OGTT	Oral glucose tolerance test, Orális glükóz tolerancia teszt
PCOS	Polycystic ovary syndrome, Policisztás ovárium szindróma
PDE	Phosphodiesterase, Foszfodiészteráz
PG	Pressure gradient, Nyomásgradiens
PKA	Protein kinase A, Protein kináz A
PKG	Protein kinase G, Protein kináz G
PLB	Phospholamban, Foszflambán
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, Fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ , peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor $\alpha$
PROP	Propranolol
p-VASP	Phospho(Ser239)-VASP, Foszfo(Ser239)-VASP
PW	Pulsed wave Doppler

ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktív oxigén gyökök
RyR2	Ryanodine receptor, Rianodin receptorok
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	Standard error of the mean, Átlagtól való eltérés, Szórás
SERCA2a	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, Szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz
sGC	Szolubilis guanil-cikláz, Soluble guanylyl cyclase
SR IVR	Strain rate during the isovolumic relaxation period, Izovolumetriás relaxációs periódus alatti stain rate
SGTL2-gátló	Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, nátrium-glukóz kotranszporter 2 gátló
TAPSE	Tricuspidal annular plane systolic excursion, Trikuszpidális anulus szisztolés csúcskitérés
TDI	Doppler imaging, Szöveti Doppler tissue,
Tei-index	Megegyezik az MPI rövidítéssel
TNF	Tumor necrosis factor, Tumor nekrozis faktor
V	Velocities, Sebesség
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein, Vazodilátor-stimulált foszfoprotein
VLDL	Very low density lipoprotein, Nagyon alacsony denzitású lipoprotein
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

## 2. Bevezetés és célkitűzés

A metabolikus szindrómáról több, egymással összefüggő anyagcserezavar együttes fennállása esetén beszélünk, melyek közé tartozik a hipertónia, centrális obezitás, inzulin rezisztencia, aterogén diszlipidémia. A szindróma szoros összefüggést mutat a diabétesz mellitusszal és bizonyos kardiovaszkuláris megbetegedésekkel. Hátterében a genetikai hajlam mellett szerzett faktorok is szerepet játszanak, kiváltképp az obezitás, mely az egyik legnagyobb rizikótényező. Utóbbi prevalenciája világszerte magas, illetve folyamatos növekedést mutat. A metabolikus szindróma kezelése napjainkban előtérbe került, hiszen a populációban egyre nagyobb incidenciával kell számolni [1]. A későbbi életminőség, valamint a szövődmények elkerülése miatt rendkívül fontos a korai diagnózis, a terápia felállítása. Elsődleges az életmód változtatás, a diéta és a rendszeres testmozgás bevezetése, dohányzás, alkoholfogyasztás kerülése [2, 3]. Noha e változtatások a korai stádiumban elegendőek, a későbbiekben szükségessé válhat gyógyszeres beavatkozás is. A rendelkezésre álló készítmények lehetőségei korlátozottak, nem kívánt hatásokkal rendelkeznek, ami újabb hatóanyagok bevonását, fejlesztését teszi szükségessé.

Vizsgálataink során egy, a második klinikai fázisvizsgálaton túljutott, magyar fejlesztésű gyógyszerjelölt, a BGP-15 (O-(3-piperidin-2-hidroxi-1-propil) nikotinsav amidoxim) hatásait vizsgáltuk. Számos területen bizonyították már a BGP-15 protektív hatásait, többek között szívelégtelenségben [4], súlyos izomdisztrófiában [5] policisztás ovárium szindrómában [6]. Emellett ismert, hogy már kisebb dózisban is inzulinérzékenyítő hatással rendelkeznek. A BGP-15 hatásmechanizmusa ugyanakkor a számos kutatás ellenére máig nem ismert teljes egészében. Ennek oka, hogy több útvonalon keresztül hat, melyek szövetenként is eltérhetnek. Inzulinérzékenyítő hatásának, valamint egyes izomdisztrófiák elleni védelmének [5, 7] hátterében a hősokk fehérjék expressziójának fokozása áll [8-10]. A reaktív oxigénradikálok mitokondriumot károsító hatását, ezzel összefüggésben bizonyos mitokondriális megbetegedések gyakoriságát is csökkenti [11].

Kardiális vonatkozásban meg kell említeni poli-ADP-polimeráz gátló (PARP-gátló) [12], inzulinszerű növekedési faktor receptor 1 (IGF1R) foszforilációját fokozó [4], valamint a membránban található lipidraftokra gyakorolt, membrán fluiditását fokozó tulajdonságait [13]. Intézetünk vizsgálatai szerint a BGP-15 a foszfolambán foszforilációnak fokozásán keresztül a SERCA2a pumpa működését is támogatja [14].

Jelen értekezés alapjául szolgáló első kísérleti elrendezésünkben a BGP-15 szívizom kontrakciós erőre gyakorolt hatásait vizsgáltuk, humán izolált fülcse trabeculán. A vizsgálatokhoz nyitott szívűtűtékből származó mintákat alkalmaztunk. Megfelelő előkészítést követően a BGP-15 különböző koncentrációjú oldatának inotrópiára gyakorolt hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a nem szelektív  $\beta$ -blokkoló propranolollal.

Második kísérleti elrendezésünk során hiperkoleszterinemiás New Zealand nyulakat kezeltünk BGP-15-tel. A vizsgálat I. protokolljában az aterogén táppal kezelt állatok egyszeri i.v. BGP-15 bolus injekciót kaptak, míg a II. protokollban a folyamatos aterogén táp mellett folyamatos p.o. BGP-15 kezelésben részesültek. Elemeztük a szívfunkciós értékeket, endotél funkciót, illetve molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk.

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

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A metabolikus szindróma kritériumrendszere

A metabolikus szindróma egy tünet együttes, melyet magas vérnyomás, hiperglikémia, abdominális elhízás és diszlipidémia jellemez, melyek növelik a 2-es típusú diabétesz mellitus és kardiovaszkuláris megbetegedések gyakoriságát [15]. Emellett más társbetegségekkel is összefüggést mutat, így a véralvadási, proinflammatorikus állapottal, nem alkoholos zsírmáj kialakulásával, illetve reprodukciós problémákkal [16]. A betegség első hivatalos definícióját a WHO adta meg 1998-ban [17], azonban a későbbiekben több kritériumrendszer kialakítására is sor került, melyeket az 1. táblázatban foglaltam össze [18].

Metabolikus szindróma kritériuma	WHO (1998)	NCEP-ATPIII (2001)	IDF (2005)	Harmonizáció (2009)
	Glükóz intolerancia, károsodott glükóz tolerancia vagy diabétesz és /vagy inzulin rezisztencia és 2 vagy több kritérium	Bármely 3 kritérium	Centrális obezitás és 2 kritérium	Bármely 3 kritérium
Abdominális elhízás	-		Csípő körfogat etnikum-specifikus értékek	
Csípő körfogat	-	>102 cm férfiak >88 cm nők		≥90 cm férfiak ≥80 cm nők
BMI	>30 kg/m <sup>2</sup>			
Triglicerid	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl
HDL koleszterin	<35 mg/dl férfiak <39 mg/dl nők	<40 mg/dl férfiak <50 mg/dl nők	<40 mg/dl férfiak <50 mg/dl nők	<40 mg/dl férfiak <50 mg/dl nők
Vérnyomás	≥140/≥90 mmHg	≥130/≥85 mmHg	≥130/≥85 mmHg	≥130/≥85 mmHg
Éhomi vércukor 2 órás plazma glükóz	Glükóz intolerancia, károsodott glükóz tolerancia vagy diabétesz	≥110 mg/dl	≥100 mg/dl	≥100 mg/dl
Mikroalbuminuria	Vizelet albumin ráta ≥20µg/perc Vizelet albumin/kreatinin ráta ≥30 mg/g			

### 1. táblázat: a metabolikus szindróma kritériumrendszere

megj.: Centrális obezitás: csípő körfogat európai férfiak esetén  $\geq 94$  cm, európai nők esetén  $\geq 80$  cm más csoportok esetén etnikum specifikus értékekkel (amennyiben a BMI  $>30$  kg/m<sup>2</sup> a csípő körfogatot nem szükséges mérni)

Látható, hogy a WHO kritériumrendszerében az inzulinrezisztencia egy fontos előjele a metabolikus szindrómának, mely azonosítható 2-es típusú cukorbetegség, kóros éhomi vércukor vagy károsodott glükóz tolerancia esetén. Ezek más rizikótényezőkkel párosulhatnak, így a megnövekedett testtömeg index-szel (body mass index, BMI), diszlipidémiával, hipertóniával vagy mikroalbuminuriával.

Az USA Nemzeti Koleszterin Program – Felnőttkori Kezelési Panel III (National cholesterol education (NCEP) third Adult Treatment Panel (ATP III)) alapján legalább 3 rizikótényező megléte az 5-ből (magnövekedett csípőkerület, magas triglicerid, alacsony HDL szint, emelkedett vérnyomás, illetve magas éhomi glükóz szint) már komoly kockázatot jelent az egyénre nézve. Tehát az NCEP-ATPIII kritériumrendszere alapvetően egy olyan anyagcserezavar együtteseként értelmezi a metabolikus szindrómát, mely háttérében az elhízás, fizikai inaktivitás, valamint egyéb genetikai tényezők állnak.

A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation, IDF) néhány új kritériumot adott meg 2005-ben. A WHO és NCEP-ATPIII rendszerével megegyezően szintén előtérben helyezi csípő körfogatát, azonban ezt etnikum specifikussá árnyalja. A többi kritériumot az NCEP-ATPIII-hoz hasonlóan adja meg.

A legújabb a Harmonizációs diagnosztikai kritériumrendszer (2009), mely kialakításában szerepet játszott a Nemzetközi Diabétesz Szövetség (IDF), a Nemzeti Szív-Tüdő-Vér Intézet (National Heart, Lung, Blood Institute), az Amerikai Szív Egyesület (American Heart Association), a Szív Világszövetség (World Heart Federation), Nemzetközi Érelmeszesedési Társaság (The International Atherosclerosis Society) és a Nemzetközi Elhízástudományi Társaság (International Association for the Study of Obesity). A találkozó során az egyes szervezetek olyan rendszer kialakítását tűzték ki célul, mely a többi kritériumot egyesíti [18].

### 3.2. A metabolikus szindróma prevalenciája

A diabéteszes állapot és a kardiovaszkuláris megbetegedések prevalenciája a nemek között eltérő. Míg előbbi a nők, utóbbi a férfiak esetén mutat magasabb morbiditást és mortalitást. Azonban a metabolikus szindróma nemek közötti megoszlása nagyban függ attól, hogy mely kritériumrendszer alapján vizsgáljuk (NCEP-ATP III vagy a WHO osztályozási rendszerét használva) [19]. Noha egyes rizikófaktorai eltérő jelentőségűek a morbiditás és mortalitás szempontjából, az elhízás a legtöbb kritériumrendszerben (WHO, NCEP, IDF) egyaránt kiemelt rizikótényező [19]. Fokozott kockázatot jelent továbbá a magas éhomi glükóz szint [20, 21], a magas vérnyomás [22, 23] és az alacsony HDL szint [21-23]. Újabb kutatásokban előtérbe került a lipoprotein a (Lpa), a kardiovaszkuláris megbetegedések egy független rizikófaktora, mely részt vesz az intima gyulladáshoz vezető folyamatokban és habsejt képződésében, így fokozva az ateroszklerózis és a trombózis kialakulását. Metabolikus szindrómában szerepe még nem tisztázott, több tanulmány alapján emelkedett szérumszint mérhető a szindrómában szenvedőknél. Ennek értéke azonban populációs eltérést mutat [24-26].

A metabolikus szindróma incidenciája jelentősen növekedett az elmúlt években, sőt egyre több tanulmány foglalkozik azzal, hogy a gyermekeket és tinédzserkorúakat is nagy számban érinti a betegség. Az idősebbekhez hasonlóan, a fiatalok esetén is akut hiperinzulinémia alakul ki, mely gyorsan glükózintoleranciához, végül diabéteszhez vezet [27-29].

### 3.3. A metabolikus szindróma genetikai meghatározottsága

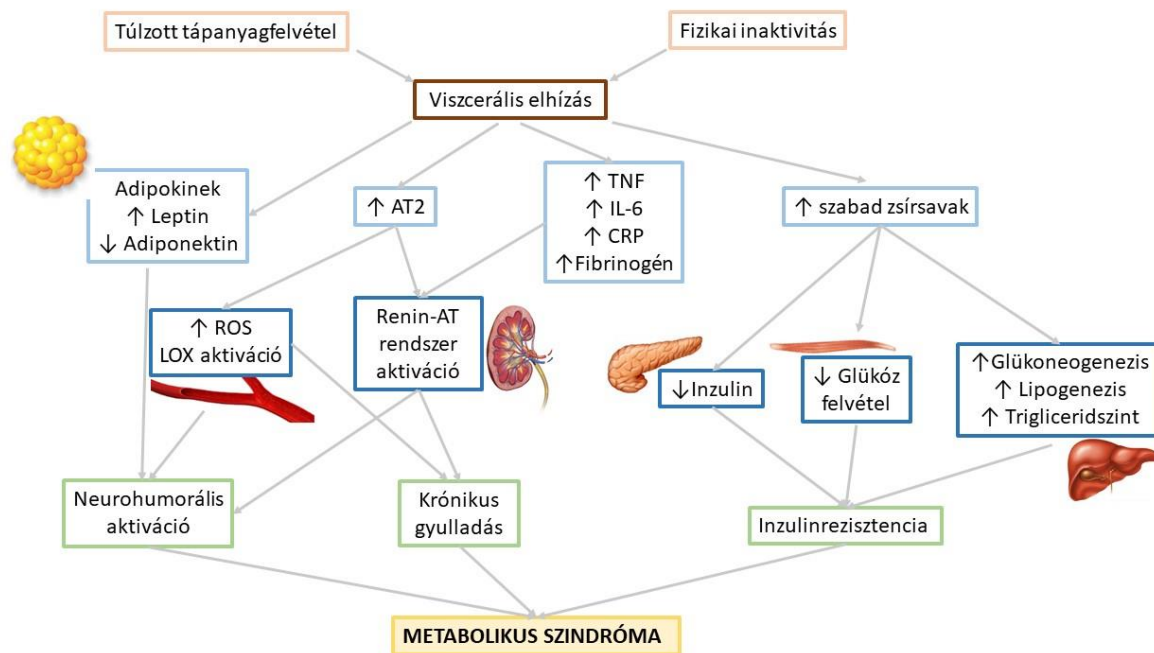
Egyre több kutatás támasztja alá, hogy a metabolikus szindróma kialakulásában genetikai meghatározottság is szerepet játszik, azonban a betegség komplexitása miatt nehéz összefüggéseket találni. Korábban a genetikai faktorok igazolására a családi halmozódás volt a legfőbb bizonyíték, azonban újabban fény derült pl. a 11- $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz, az adiponektin és a  $\beta$ -3 adrenerg receptort kódoló gének meghatározó szerepére a kórkép kialakulásában [30, 31]. Ismert a szindrómát leíró 5 szubfenotípus szoros genetikai meghatározottsága (testsúly, BMI, HDL), ám egyes vizsgálatok az inzulin rezisztenciát, az abdominális elhízást, a diasztolés vérnyomást és a trigliceridszinteket inkább környezeti tényezőként írták le [32]. Újabb kutatások az endoteliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) gén metabolikus szindróma kialakulására gyakorolt hatásának szerepét vizsgálják, mivel korábbi eredmények alapján az endotéliumból felszabaduló nitrogén monoxid segíti az izomszövet

glükózfelvételét a GLUT4 transzlokációjának fokozásával [33]. A pontos mechanizmus még nem teljesen ismert, azonban eNOS knockout egerekben a szervetlen nitrátok javították a metabolikus szindróma paramétereit a nitráthomeosztázis megőrzésével [34].

### 3.4. metabolikus szindróma patogenezise

A metabolikus szindróma patogenezisében az inzulinrezisztencia kulcsszerepet játszik [35, 36], melyhez nagyon gyakran társul megnövekedett abdominális viszcerális zsírszövet [37] [38] (1. ábra). Mivel kutatásai eredményeinkben az inzulinrezisztencia és a 2-es típusú diabétesz kiemelt szerepet kap, kialakulásuk folyamatát is részletesebben kívánom ismertetni.

Az inzulin szervezetünk nélkülözhetetlen szabályozója, részt vesz az aminosav felvételben, fehérjeszintézisben, proteolízisben, zsírszövetek triglicerid lipolízisben, lipoprotein lipáz aktivitásában, VLDL (nagyon alacsony denzitású lipoprotein, very low density lipoprotein) triglicerid szekréciójában, izom és zsírszövet glükózfelvételében, izom és máj glikogén szintézisében és az endogén glükóz termelésben. Fiziológias körülmények között a megemelkedett vércukorszint a  $\beta$ -sejtek inzulinszekréciójának emelkedését vonja maga után. Az inzulin és a glükóz együttes jelenléte fokozza a sejtek glükózfelvételét, ezáltal glikolízisét vagy a máj, izom és zsírszövet glikogén szintézisét, ugyanakkor gátolja a hepatikus glükoneogenezist. A glükóztranszporterek közül az egyik legfontosabb szerepe a főként izomban és zsírszövetben megtalálható GLUT4 transzporternek van. Ez utóbbi az inzulin hatására a citoszólból a membránba transzlokálódva biztosítja a sejtek glükózfelvételét, mely a folyamat sebességmeghatározó lépése [39].



**1. ábra: A metabolikus szindróma patogenezise [1]**

AT2: Angiotenzin II; TNF: Tumor nekrozis faktor; IL-6: Interleukin 6; ROS: reaktív oxigén gyökök; LOX: lektin-szerű oxidált alacsony - denzitású lipoprotein receptor 1

Az egyén inzulinérzékenységét p.o. glükóz vagy i.v. inzulin beadásával tudjuk vizsgálni [40]. Az inzulinérzékeny fenotípus általános jellemzője a normál testsúly, abdominális, viszcerális elhízás hiánya, aktív életmód, zsírszegény diéta. Rezisztensek esetén általában károsodott glükóz toleranciával/metabolizmussal, emelkedett éhomi glükóz szinttel és/vagy hiperglikémiával kell számolnunk. Jellemző a csökkent inzulinérzékenység/aktivitás, csökkent inzulin mediálta glükóz clearance és/vagy csökkent endogén glükóz termelés. Általános fenotípusa túlsúlyos/obez egyén döntően ülő életmóddal, kevés mozgással, zsírban gazdag diétával. Az elhízás prevalenciája az elmúlt évtizedekben világszerte nő, mely fokozza az inzulinrezisztenciát, a metabolikus szindróma, a 2-es típusú diabétesz, illetve a kardiovaszkuláris betegségek incidenciáját is. Noha nem minden túlsúlyos egyén anyagcsere folyamatai szenvednek zavart, többségükönél inzulinrezisztencia jelentkezik [41]. Elemzések szerint a metabolikus szindróma az elhízás epidémiája nélkül nem öltött volna ilyen méreteket [42], ám a fizikai inaktivitás és az aterogén diéta önmagukban is hozzájárulhatnak az inzulinrezisztencia kialakulásához [43].

Ebben az állapotában a szervezet igyekszik fenntartani a normaglikémiás állapotot a  $\beta$ -sejtek mennyiségének növelésével és/vagy az inzulin szekréció kapacitásának fokozásával. Noha e

kompenzációs mechanizmusok nem teljesen ismertek, több vizsgálat a glükóz szignalizációs folyamatait sejtik a folyamat fő mozgatójának [44], emellett genetikai tényezők szintén szerepet kapnak [45]. A 2-es típusú diabétesz hátterében az inzulin szekréciós kapacitás csökkenése, elvesztése áll, mely oka lehet a  $\beta$ -sejtek diszfunkciója, valamint a  $\beta$ -sejtek számának csökkenése [46]. Amennyiben a kompenzációs mechanizmusokkal kialakított növekvő  $\beta$ -sejt funkció és/vagy tömeg hosszabb ideig funkcióképes marad, a 2-es típusú diabétesz manifesztálódása időben eltolódik és hiperinzulinémiás állapot alakul ki. Az inzulinrezisztencia előrehaladásával azonban a  $\beta$ -sejtek kimerülnek, elveszítik funkciójukat [47, 48].

Az inzulin nem csupán a glükóz-, de a lipidháztartás szabályozásában is részt vesz, jelenlétében fokozódik a lipogenezis és gátlódik a lipolízis [49]. A zsírszövet inzulinrezisztenciája fontos a metabolikus szindróma patofiziológiájának szempontjából [42]. Kialakulása során a FFA (szabad zsírsav, free fatty acid) mobilizáció a zsírszövetben tárolt trigliceridből felgyorsul (lipolízis) [50]. Fiziológias körülmények között az inzulin gátolja a zsírsavszövet lipolízisét, ugyanakkor az inzulinrezisztencia kialakulása során az inzulin nem képes szuppresszálni a lipolízist, így több FFA szabadul fel és kerül a plazmába [42], ami erősíti az inzulinrezisztencia kialakulását, csökkenti a  $\beta$ -sejtek inzulin szekrécióját [51]. Különösen a nagyobb, kiterjedtebb zsírszövet eredményez megemelkedett FFA termelődést [52]. A folyamat elsődlegesen a HSA (hormon szenzitív lipáz) által mediált folyamat [53], ugyanakkor kutatások rámutattak az ATL (adipóz triglicerid lipáz, adipose triglycerid lipase) szerepére egyaránt. Ez a két hormon együtt a triglicerid lipolízis 95%-áért felelős [54]. Az inzulin rezisztencia és a hiperinzulinémia szorosan kapcsolódik a csökkent ATL és HSA mRNS és protein expressziójának csökkenéséhez, mely hatás a zsírszövet mennyiségétől függetlennek bizonyult [55], ráadásul az inzulin rezisztencia és a 2-es típusú diabétesz genetikai meghatározottsága kapcsolatot mutat a HSA génekkel [56].

Állatmodelleken mind a diétával mind a genetikailag kiváltott obezitás a NADPH oxidáz túlzott expressziója megfigyelhető, mely jól korrelál a metabolikus szindrómában tapasztalt oxidatív stressz növekedésével [57].

Mindezek mellett a zsírszövet a proinflammatorikus citokinek túlzott felszabadulásán keresztül szintén kapcsolódik a metabolikus szindróma patofiziológiájához. Ismert, hogy a nagyobb zsírsejtek képesek több citokin termelésére [58], melyek nem csupán más szövetekben (máj, izom) fontosak az inzulin hatásában, de parakrin módon lokálisan, a zsírszövetben is tudják azt befolyásolni [59]. A termelődő citokinek, mint például a TNF $\alpha$  (tumor nekrozis faktor), a monociták (makrofágok) vonzásával lokális gyulladást váltanak ki, mely lokális

inzulinrezisztenciához, később szisztémás gyulladáshoz és szisztémás inzulinrezisztenciához vezet. Emellett a TNF $\alpha$  maga is csökkenti az inzulinérzékenységet [49].

#### Inzulinrezisztencia a májban

A FFA mozgás növekedése károsítja a hepatikus inzulin hatást [60]. Ez magába foglalja a hepatikus glükóz kibocsátást, proinflammatorikus citokinek szintézisét és lipoprotein metabolizmust. Az inzulin fiziológias körülmények között számos olyan enzim génexpresszióját fokozza, melyek a triglicerid bioszintézis központi elemei [61], valamint csökkenti a VLDL, triglicerid és apolipoprotein (apo) B termelődését és szekrécióját. Az inzulin egy másik intrahepatikus hatása, hogy növeli az apo B degradációt [62]. Inzulinrezisztens betegek májában a FFA áramlás, a trigliceridszintézis és tárolás emelkedett, a felesleges triglicerid pedig VLDL-ként szekretálódik [63], mely folyamat közvetlen következménye az inzulin rezisztenciával együtt járó diszlipidémia [62]. A máj VLDL túltermelése mellett a lipoprotein lipáz változásai szintén összefüggést mutatnak a metabolikus szindrómával [64]. A hipertrigliceridémia típusosan kapcsolódik a HDL (magas denzitású lipoprotein, high density lipoprotein) koleszterin csökkenéséhez.

#### Inzulinrezisztencia az izomban

Az izomban a megemelkedett plazma FFA szint megtöri a glükóz zsírsav ciklust [65], mely károsodás kiterjed az inzulin mediálta glükóz transzportra is [65]. Feltételezhető, hogy a vázizomban akkumulálódó triglicerid közvetlen szerepet játszik az inzulin rezisztencia etiológiájában [66]. A teljes test inzulinérzékenységének értéke fordítottan korrelál a triglicerid mennyiségével [66]. Mindezek mellett az inzulinérzékenység károsodását követően a testmozgás vagy a súlyvesztés az izom triglicerid összetételét csupán kismértékben vagy egyáltalán nem változtatják [67, 68].

#### Kardiovaszkuláris megbetegedések kockázata metabolikus szindrómában

Ismert az inzulinrezisztens betegek hipertóniára és diabéteszes kardiomiopátiára való fokozott hajlama [69], melynek hátterében számos mechanizmus áll. Ugyanakkor az éhomi inzulin vagy a HOMA index (homeostatic modell assessment) értékelésekor az inzulinrezisztencia csak kismértékben kapcsolódott a metabolikus szindrómában kialakuló hipertónia prevalenciájához

[70]. Normál testsúlyú embernek i.v. adva maga az inzulin vazodilatátor hatást vált [71], illetve másodlagosan sóvisszatartást okoz a vesében [72]. Az inzulinrezisztencia kialakulása során az inzulin vazodilatáló hatása megszűnhet [73], ugyanakkor a sóreabszorpcióra gyakorolt renális hatása megtartott marad [74]. Emellett az inzulin fokozza a szimpatikus idegrendszer hatását, mely hatás valószínűleg ugyancsak megtartott marad az inzulinrezisztencia kialakulásakor [75]. A krónikusan megnövekedett testsúly és zsírszövetmennyiség jelentős neurohumorális változásokhoz vezethetnek. A FFA-k vazokonstriktor hatást mediálhatnak [76]: az FFA áramlása a portális vénákban szintén szimpatikus idegrendszer aktiválásán keresztül emeli a vérnyomást [77-79], ez pedig a szívfrekvencia, áramló vértérfogat, végdiasztolés térfogat, kardiális output, vérnyomás, renális sóvisszatartás emelkedését vonja maga után [78]. Továbbá a zsírszövet angiotenzinogén forrás [80], így nem meglepő a renin-angiotenzin rendszer aktiválása [81, 82], ugyanis megnövekedett zsírszövet az angiotenzin II prekursor angiotenzinogén expresszió fokozásához vezet [83, 84]. Kiemelendő továbbá az adipocitokinek [85], proinflammatorikus citokinek szintjének változása [86, 87]. Újabb vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy az adipocita eredetű rezisztin és leptin szintén kapcsolódhat az inzulinrezisztens betegek hipertóniájának patogeneziséhez [88, 89].

A metabolikus szindrómában a hipertónia mellett inzulinrezisztens betegek esetén a diabéteszes kardiomiopátia kialakulása a másik fenyegető kardiovaszkuláris probléma. A diabéteszes populációban ugyanis 2-5-ször gyakoribb a szívelégtelenség kialakulása [90, 91]. Ez egy olyan bal kamrai diszfunkció, mely más rizikófaktoroktól függetlenül alakul ki diabéteszes betegekben. A diasztolés diszfunkció mellett jellemzője a szívizom hipertrófia, előrehaladottabb állapotban pedig szisztolés funkcióromlás kísérheti [92]. A Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) adatai közvetlen kapcsolatot találtak a végdiasztolés térfogat és a testtömeg között mind férfiak mind nők esetében [93].

A folyamatok háttérben álló molekuláris folyamatok komplexek és nem teljesen tisztázottak, annak ellenére, hogy a szakirodalom már számos, az obezitás és a kardiális diszfunkció kapcsolatát feltáró útvonalat ismer. Részben a SERCA2a és rianodin (RyR2) receptorok expressziójában és az emiatt fellépő miokardiális  $Ca^{2+}$  háztartásban bekövetkező eltérések adják a kutatások fő csapásirányát [94, 95]. Az endoplazmatikus retikulumot ért stressz [96] hatására a SERCA2a pumpa aktivitása csökken, mely szerepe a  $Ca^{2+}$  retikulumba történő visszajuttatása lenne. A kardiomiocitákban ez megnyúlt relaxációs időhöz vezet, mely következményesen hozzájárul a diasztolés diszfunkcióhoz és a miociták apoptózisához [97].

Továbbá előtérbe került a miokardiális titin, mely szintén egy potenciális target lehet az obezitás-kapcsolt kardiális diszfunkció kezelésében [94, 98, 99].

Mindezekon túl ismert az elhízás mikrokeringésre gyakorolt káros hatása is. Metabolikus szindrómában, a mikrokeringésben bekövetkező funkcionális és strukturális változások a szöveti oxigénellátás és metabolizmus egyensúlyának megbomlásához vezethet a szív [100] [101, 102], vese [103], agy [104] és vázizomzat esetén egyaránt [105, 106]. A mikrovaszkuláris diszfunkció hátterében egyrészt a már említett angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválása, másrészt nitrogén-monoxid biohasznosulásának csökkenése, illetve bizonyos vazokonstriktorok, mint az endotelin-1, prosztaglandin H<sub>2</sub>, tromboxán A<sub>2</sub> termelésének/érzékenységének fokozódása áll [79, 100, 107]. A feszültségfüggő K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> csatornák megváltozott expressziója szintén metabolikus szindróma velejárója [100, 108-110].

Az egészséges szív az energiát szinte minden formában képes felvenni és feldolgozni, akár glükózáról akár hosszú zsírsavláncokról van szó. Ugyanakkor elhízás és metabolikus szindróma esetén megfigyelhető a miokardium fokozott zsírsavfelvétele és oxidációja, valamint ezzel párhuzamosan a károsodott zsírsavleadás és hasznosítás [111, 112]. A folyamat nemek közötti megoszlása egyenlőtlen, nők esetén nagyobb arányban jelentkezik [113, 114], mely részben magyarázhatja a nők kardiális szövődényekkel szembeni fogékonyságát diabétesz esetén [115]. Ezzel összefüggésben a kapcsolódó ateroszklerotikus megbetegedések prevalenciája szintén magas [116-118]. Hátterében a már korábban említett citokinek, illetve adipokinek állhatnak, melyek hatását leírták az elhízással összefüggő kardiovaszkuláris megbetegedések esetén, így az inzulin érzékenységre (leptin, adiponektin, rezisztin), gyulladásra (IL-8, leptin), koagulációra (plazminogén aktivátor inhibitor 1), vaszkuláris funkcióra és ateroszklerózisra (leptin, rezisztin, TNF- $\alpha$ , adiponektin) [119-122].

### 3.5. A metabolikus szindróma társbetegségei

A metabolikus szindrómában szenvedő betegek háromszor nagyobb eséllyel szenvednek el iszkémiás szívbetegséget és stroke-ot, valamint öt-hatszor valószínűbb egyéb kardiovaszkuláris probléma kialakulása és az ezekkel összefüggő mortalitás [123]. Maga a metabolikus szindróma valamennyi tünete és társbetegsége növeli a kardiovaszkuláris megbetegedéseket [124, 125]. Természetesen több rizikófaktor együttes megléte még nagyobb kockázatot jelent, bár nők esetén a fizikai inaktivitás és obezitás önmagában is fokozza a koszorúér megbetegedések

gyakoriságát [126]. Az NCEP-ATPIII hangsúlyozza, hogy a CV megbetegedések kockázata csökkenthető az LDL szint csökkentésével [127], emellett a morbiditás összefüggést mutatott még a HDL szinttel, a vérnyomással, illetve a csípő körfogattal is [128]. A metabolikus szindróma prevalenciája több tekintetben hasonlít a 2-es típusú diabéteszére [129, 130]. A koszorúér megbetegedések rizikója is hasonló: diabéteszesek esetén 2-4-szeres a nem diabéteszesekkel összehasonlítva. A diabéteszes állapotot a betegek 75-85%-ban inzulinrezisztencia, hiperinzulinémia, hiperlipidémia és elhízás előzi meg [131]. A San Antonio Szív munkacsoportja három módszert talált, melyekkel a 2-es típusú diabétesz kialakulását előre tudja vetíteni: 1. Orális glükóz tolerancia teszttel (OGTT) a károsodott glükóz tolerancia kimutatása (impaired glucose tolerance, IGT); 2. az NCEP-ATPIII szerinti kritérium alapján a metabolikus szindróma jelenlétének meghatározása; 3. a módosított WHO kritériumrendszer alapján a metabolikus szindróma jelenlétének meghatározása. A tanulmány alapján az IGT kimutatása bizonyult a legjobb előrejelzőnek (43%), majd az NCEP (31%) végül a WHO (30%) definíció [132]. Ford és munkatársai a WHO és NCEP kritériumrendszere szerint megállapították, hogy a populáció 30-52% tartozik a diabéteszes rizikócsoporthoz [133]. A metabolikus szindrómában szenvedők gyakran inzulinrezisztensek, mely végül 2-es típusú diabétesz kialakulásához vezet, noha sokan közül csupán az abdominális elhízással rendelkeznek a rizikótényezők közül [134]. A metabolikus szindróma nem szükségszerű velejárója az IGT, ugyanakkor IGT az NCEP egyéb rizikófaktoraival 70%-ban potenciális diabéteszes beteg azonosítható [132]. Metabolikus szindrómában szenvedőknél 5-ször, metabolikus szindrómával és inzulin rezisztenciával egyaránt érintettek esetén 6-7-szer gyakoribb a 2-es típusú diabétesz kialakulásának esélye [135, 136]. Mindezeket túl a metabolikus szindróma és a közvetlenül kapcsolódó kardiovaszkuláris megbetegedések, illetve 2-es típusú diabétesz további szövődmények táptalaja lehet, így (a teljesség igénye nélkül) a nem alkoholos zsírmáj, policisztás ovárium szindróma (PCOS), obstruktív alvási apnoe szindróma, hipogonadizmus, lipodisztrófia, illetve különböző mikrovaszkuláris betegségek [16].

### 3.6. Metabolikus szindróma terápiás lehetőségei

#### Életmódváltás

A metabolikus szindrómában szenvedő betegek esetén a terápia elsődlegesen az inzulin érzékenység fokozását (ezáltal a 2-es típusú cukorbetegség késleltetését vagy elkerülését),

valamint a kardiovaszkuláris kockázatsökkentést célozza [137]. A betegség kezelésében nélkülözhetetlen az életmódváltás, terápiás diéta tartása, valamint a rendszeres, megfelelő testmozgás [2]. A kalóriabevitel csökkentése mellett azonban a bevitt táplálék összetételére is nagy hangsúlyt kell fektetni, kerülendő az egyszerű szénhidrátok és telítetlen zsírok túlzott bevitele [16]. A vércukorszint kiegyensúlyozása érdekében a zsírszegény diéta mellett a rostban gazdag (gyümölcs, zöldség) táplálék bevitele központi szereppel bír [43]. Emellett az alkoholfogyasztás mérséklése, a dohányzásmentes életmód szintén javítja a beteg állapotát [3]. Azonban a szindróma későbbi stádiumában kialakult diabétesz, kardiovaszkuláris szövődmények esetén az életmódváltás nem elegendő az állapot romlásának megelőzésére, lassítására [2]. Ilyen esetekben elkerülhetlenné válik a gyógyszeres terápia bevezetése, mérlegelve a lehetséges mellékhatásokat [2, 138].

#### Antidiabetikumok

Az antidiabetikumok közül elsődlegesen választandó az inzulinérzékenyítő metformin ([139, 140], mely mind a fiatalkorban (10 év felett) mind a felnőttkorban kialakuló metabolikus szindróma esetén jó eredménnyel alkalmazható. Inzulinérzékenyítőként főleg az inzulinrezisztencia és 2-es típusú diabétesz esetén kerül előtérbe (kiváltképp, ha policisztás ovárium szindróma is kialakult), ám obez betegeknél a kardiovaszkuláris kockázat csökkentését egyaránt leírták. Ugyanakkor a testsúlyt és BMI értékeket nem befolyásolja számottevően. Főként gasztrointesztinális mellékhatások jellemzik, ritkán azonban laktacidózis alakulhat ki, mely az életet veszélyeztető állapot lehet. A gyomor-bélrendszeri panaszok a dózis fokozatos emelésével, nyújtott felszívódású készítmények adagolásával általában megelőzhetőek, mérsékelhetőek [141]. A modern antidiabetikumok közül előtérbe kerültek a DDP4-gátlók (dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, dipeptidil-peptidáz gátlók) (sitagliptin, viltagliptin, linagliptin), melyek újabb eredmények szerint a HbA1c érték csökkentése mellett, jótékony hatással vannak a szérum triglicerid és LDL szintjére, a testsúlyra, valamint a vérnyomásra egyaránt [142], így metabolikus szindrómában alkalmazásuk kifejezetten előnyös lehet. Az SGLT2 inhibitorok (sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, nátrium-glükóz kotranszporter-2-gátló) hasonlóan kedvező hatásokkal rendelkeznek, azonban renális hatásai miatt alkalmazása körültekintést igényel [143]. Eredménytelen metformin terápia esetén kerülnek előtérbe a szulfanilurea származékok [144], a tiazolidindionok [139] és a GLP-1 (glükagonszerű polipeptid-1, glucagon-like peptid 1) receptor agonisták is [141]. Ugyanakkor a tiazolidindionokat összefüggésbe hozták a folyadékretenció kialakulásával [145], így

kardiovaszkuláris megbetegedéssel kombinált diabétesz esetén alkalmazásuk veszélyeket rejthet. Főként kombinációs terápiában használatos az  $\alpha$ -glükózidáz-gátlók közé tartozó akarbóz, mely csökkenti más antidiabetikumok szükséges dóziséját [146].

### Vérnyomáscsökkentők

Az amerikai [147] és európai [148] irányelvek alapján, a metabolikus szindrómában szenvedő betegek vérnyomásának céltartománya  $<130/80$  Hgmm. A magas vérnyomással párosult metabolikus szindróma esetén elsődleges választandó készítmények az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlók, az angiotenzin II receptor blokkolók (ARB), valamint az  $\alpha$ -1 receptor blokkolók, hiszen ezek nem rontják a metabolikus paramétereket [149]. Legalább két, komplement hatásmechanizmussal rendelkező vérnyomáscsökkentő alkalmazása javasolt [147, 148]. Megjegyzendő, hogy a hagyományos  $\beta$ -blokkolók kerülendők, hiszen a szénhidrát- és lipidanyagcsere kifejtett hatásukkal fokozhatják az inzulinrezisztencia mértékét [150-152] (hasonló hatással rendelkeznek egyes diuretikumok is) [150]. Emellett növelhetik az éhomi glükóz, triglicerid és VLDL szinteket, a HDL csökkentése mellett [153-155], valamint elősegítik a testsúlygyarapodást [156-158].

A  $\beta$ -blokkolók metabolikus mellékhatásainak mechanizmusa nem teljesen tisztázott. A szénhidrát- és lipidanyagcsere folyamatok a perifériás szövetre (izomszövet, máj, zsírszövet, hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjei, zsigerek) lokalizáltak, endogén katekolaminok, adrenalin, noradrenalin felhasználásával,  $\alpha$  és részben  $\beta_2$  receptorokon keresztül alakulnak ki [159-161]. A lipoprotein-lipáz [153, 155], HSA [162] és lecitin-koleszterin acetiltransferáz [153, 163], valamint más, a lipid- és szénhidrátmetabolizmusban résztvevő enzimrendszerek szintén katekolamin útvonalon hatnak. Amennyiben az adrenerg receptorokat antagonistákkal blokkoljuk, a katekolamin hatások részben visszafordíthatóak [164-166].

A  $\beta$ -blokkolók egy heterogén gyógyszer-csoport, melyek csökkentik a vérnyomást és a perctérfogatot a szívfrekvencia és a miokardiális kontrakció csökkentésén keresztül [167] [168]. Emellett a kompetitív módon gátolják a szimpatikus idegrendszer tónusát, valamint mérséklék a plazma renin aktivitását, tovább erősítve vérnyomáscsökkentő hatásukat [169] [170]. Az egyes hatóanyagok nagymértékű eltérést mutatnak az intrinszik szimpatomimetikus aktivitás meglétében vagy hiányában,  $\beta_1$  szelektivitásukban, membrán stabilizáló képességükben,  $\alpha_1$  receptor blokkoló hatásukban, antioxidáns tulajdonságaikban, a hatásuk időtartamában és potenciájában, lipofil/hidrofil tulajdonságaikban [164, 165, 167, 171]. Emiatt

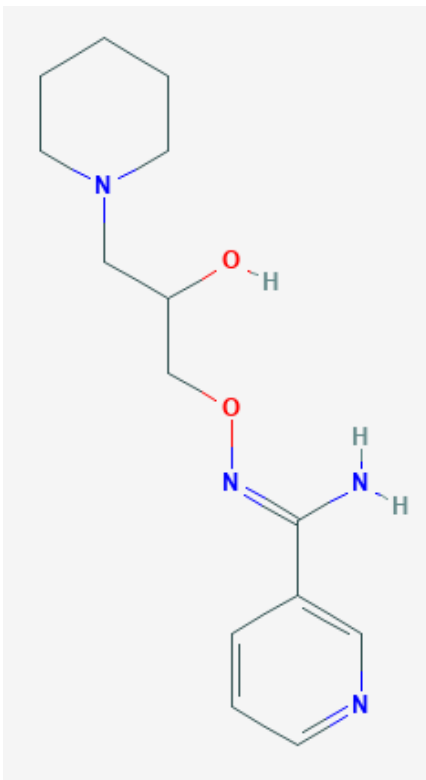
a metabolikus mellékhatások is eltérően jelentkeznek. A karvedilol [172, 173] [174] és a nebivolol [175-178], mint újabb, harmadik generációs hatóanyagok már vazodilatáló hatással rendelkeznek. Újabb tanulmányokban nem befolyásolták negatívan a szénhidrát- és lipidanyagcserét [179, 180], sőt a plazma leptin [181] és adiponektin [175] szintjét is emelték, melyeknek fontos szerepe van az inzulinérzékenységben. Mindezek mellett antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek, mely a feltételezések szerint az oxidatív stressz csökkentésén keresztül javítják az inzulinérzékenységet, valamint a pankreász  $\beta$ -sejtjeinek diszfunkciós állapotát [182-184].

### Antihyperlipidémias szerek

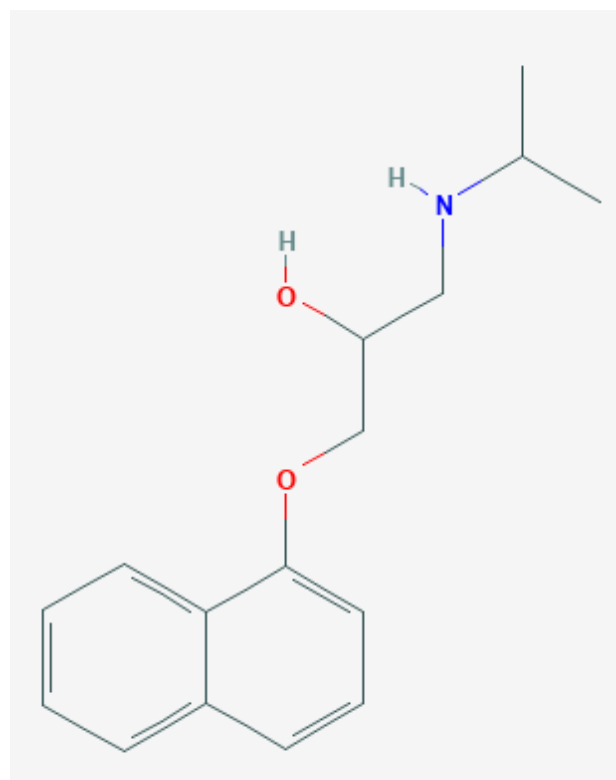
A metabolikus szindrómában szenvedőknél a kardiovaszkuláris rizikó csökkenthető az LDL és HDL szintek befolyásolásával. A választandó terápia a diszlipidémia típusától függ. Magas triglicerid szint esetén az elsődlegesen választandó szerek a fibrátok, főként a fenofibrát és bezafibrát alkalmazása került előtérbe. A fibrátok a PPAR $\alpha$  (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor  $\alpha$ ) agonistái, emellett a lipoprotein-lipázt is stimulálják [185]. Eredménytelen monoterápia esetén megfontolandó a kombinációs terápia nikotinsavval [185]. Magas LDL szint esetén a HMG-CoA-reduktáz inhibitor (3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A) statin terápia javasolt (atorvastatin, rozuvastatin, simvastatin) [141], mely hatóanyagok az endogén koleszterintermelés csökkentésével fokozzák az LDL receptorok expresszióját, így az LDL vérből történő felvételét. Az LDL szint csökkentésével összefüggésben hozzájárulnak az ateroszklerotikus plakkok stabilizálásához, csökkentik a gyulladást, javítják az endotél funkciót. Általában jól tolerálhatók, ugyanakkor egyeseknél a máj- és izomtoxicitás jelentkezhet [186]. Kombinációjuk ezetimibbel csökkentheti a szükséges statin dózist, így a mellékhatások kialakulásának valószínűségét [187].

### 3.7. BGP-15

Vizsgálataink középpontjában a BGP-15 (O-(3-piperidin-2-hidroxi-1-propil) nikotinsav amidoxim) állt, egy magyar fejlesztésű, a propranololra szerkezetileg hasonlító gyógyszerjelölt (2.ábra [188]), mely diabétesz indikációban a II. klinikai fázisvizsgálaton túljutott, bizonyítottan nem toxikus hatóanyag. Fejlesztésének célja eredetileg különböző citosztatikumok, így a ciszplatin nefro- és neurotoxikus mellékhatásainak mérséklése volt (100-200 mg/ttkg p.o.), azonban fény derült inzulinérzékenyítő hatására is, amelyet már jóval kisebb mennyiségben (akár 200 mg pro dosi) kifejt. A BGP-15 mindezek mellett számos egyéb területen is rendelkezik protektív hatásokkal, így szívelégtelenségben [4], súlyos izomdisztrófiában [5], policisztás ovárium szindrómában, [6] de vizsgálták bőrvédő hatását akut fénykárosodás esetén is [189]. Hatásmechanizmusa sokrétű, a kutatások ellenére máig nem teljesen tisztázott. Az első általánosan elfogadott és bizonyított hatás a BGP-15 hősokk fehérje expressziót indukáló hatása volt. A hősokk fehérjék (más néven chaperon, gardedám- vagy stresszfehérjék) a szervezetben meghatározott feladatokat látnak el, jelenlétük már a fehérjék szintézisének is nélkülözhetetlen [190].



2. ábra: a BGP-15 szerkezete



3. ábra: a propranolol szerkezete

A BGP-15 a Hsp70 család expresszióját fokozza [8-10] ebből következően javítja az inzulinérzékenységet [7], illetve lassítja a súlyos izomdisztrófiák kialakulását [5]. Ezzel összefüggésben, a BGP-15 az oxidatív stressz okozta mitokondriális megbetegedések gyakoriságát is csökkenti, mivel gátolja a reaktív oxigén gyökök által indukált mitokondrium depolarizációt, illetve a következményes mitokondriális reaktív oxigéngyök felszabadulást [11].

A kardioprotektív hatását az egyes szakirodalmak eltérő mechanizmusokkal támasztották alá. Fokozott Hsp70 expresszió a szívizomban nem mutatható ki [4], így a kardiális hatásokat egyes vizsgálatok a PARP-gátló [12], más kutatások az IGF1R foszforilációját fokozó tulajdonságával magyarázták, ugyanis az IGF1R foszforilációja alacsony mértékű (hím Mst1 Tg és nőstény dnPI3K egerek szaporításával nyert) szívelégtelenség+pitvarfibrilláció modellben [4]. A BGP-15 emellett a membránban található lipidraftokra is hat, fokozza a membrán fluiditását, segíti a membrán-kapcsolt receptor proteinek működését, ezáltal befolyásolva bizonyos anyagok átjutását a membránon [13]. Intézetünk több kutatása irányult a BGP-15 hatásának feltérképezésére. Egy korábbi vizsgáltunkban a BGP-15 vegyületet hasonlítottuk össze metforminnal, valamint pioglitazonnal diabéteszes kardiomiopátia modellen. Goto-Kakizaki patkányokon Doppler echocardiográfiás vizsgálatot, Western blot analízist, inzulinszint ellenőrzést, illetve izolált érgyűrű preparátumon endotélfunkciós méréseket végeztünk. Tapasztalataink szerint a BGP-15 nem javította jelentősen az endotélfunkciót, ugyanakkor a kezelt csoport megtartott diasztolés paraméterekkel rendelkezett. Western blot eredményeinkből következik, hogy a BGP-15 fokozza a foszfolambán foszforilációját, elősegítve ezzel a SERCA2a (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) pumpa működését, mely alapvetően meghatározza a diasztolés funkciókat [14].

A továbbiakban a kutatásaink alapját képező, a BGP-15 kardiovaszkuláris hatásainak hátterében feltételezett mechanizmusokat ismertetem.

### 3.8. $\beta$ -receptorok

Mivel a BGP-15 kardiális hatásainak molekuláris háttere nem ismert, ugyanakkor a propranolollal jelentős strukturális hasonlóságot mutat, előtérbe került a két vegyület

inotrópiára gyakorolt hatásának összehasonlítása, feltételezve, hogy a BGP-15 szintén rendelkezhet  $\beta$ -blokkoló hatással. Emiatt került sor a  $\beta$ -receptorok részletesebb ismertetésére.

Az adrenerg receptorcsaládon belül, hét transzmembrán doménnel rendelkező,  $\alpha$  és  $\beta$  receptortípusokat különböztetünk meg, újabb besorolásuk szerint  $\beta$ ,  $\alpha_1$  és  $\alpha_2$  receptor típust, a  $\beta$ -receptorokon belül pedig  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , valamint  $\beta_3$  altípusokat. Az egyes receptor altípusok eltérő mértékben expresszálódnak az egyes szöveteken [191]. Vizsgálataink szempontjából a  $\beta$ -receptorok jelentősek, így a továbbiakban ezeket ismertetem részletesen.

### $\beta$ -receptorok jelátvitel

A  $\beta$ -receptorok egyes altípusai  $G_s$  fehérjéhez kapcsolnak, így a cAMP szint növelésén keresztül fejtik ki hatásukat. Mivel eltérő mértékben expresszálódnak az egyes szövetekben, így a cAMP szint emelkedése is eltérő hatásokat közvetít. A  $\beta_1$  receptorok döntően a szívszöveten, valamint a vesében találhatóak, így aktiválódásuk esetén emelik a szívfrekvenciát, fokozzák a renin felszabadulását. A  $\beta_2$  simaizmon relaxációt közvetít, míg a  $\beta_3$  zsírszövetben fordul elő nagyobb mennyiségben, ahol fokozza a lipolízist [191].

### $\beta$ -receptor agonisták

$\beta$ -receptor agonisták az úgynevezett szimpatomimetikumok közé sorolhatók, vagyis a szimpatikus idegrendszer jelátvitelét erősítik. A szimpatomimetikumokat többféle szempont alapján csoportosíthatjuk, így a hatásmódjuk szerint megkülönböztetünk direkt és indirekt szimpatomimetikumokat, a receptor típusa alapján pedig az  $\alpha$ -, a  $\beta$ -receptoron, vagy a két típuson egyaránt ható szereket. Szimpatomimetikumok közé tartozik többek között az adrenalin és a noradrenalin, ezek minden adrenerg receptoron hatást fejtenek ki. Szelektív  $\beta_2$  receptor agonista hatással rendelkezik a hörgőtágító hatású formoterol, salmeterol stb. Mindhárom  $\beta$ -receptor altípuson agonista hatással rendelkezik az isoprenalin (isoproterenol), ugyanakkor nincs hatása az  $\alpha$  receptorokon.  $\beta_1$  receptoron jellemzően pozitív ino- illetve kronotrop hatással bír,  $\beta_2$  receptoron hatva vasodilatációt okoz, míg  $\beta_3$  receptoron keresztül pedig fokozza a lipolízist [192, 193].

### $\beta$ -receptor antagonisták

Azokat a készítményeket, melyek a fiziológiás agonistákkal (adrenalin, noradrenalin) ellentétes hatást közvetítenek,  $\beta$ -receptor antagonistáknak,  $\beta$ -szimpatolitikumoknak nevezzük. A klinikumban a  $\beta_1$  receptorok gátlása a szívfrekvencia, illetve a vérnyomás csökkentését célozza, a  $\beta_2$  receptorok gátlása általában egy nem kívánt mellékhatás. A  $\beta$ -receptor blokkolók között megkülönböztetünk szelektív  $\beta_1$  és nem szelektív receptor blokkolókat. Ezen vegyületek alapszerkezete az isoproterenoléhoz hasonló, így nem meglepő, hogy képesek az isoproterenol hatását kompetitív módon gátolni. A korábban kifejlesztett nem szelektív blokkolószerkezetek mint a pindolol, propranolol, timolol alkalmazása vérnyomáscsökkentőként mára háttérbe szorult, elavulttá vált. Mivel mind a  $\beta_1$  mind a  $\beta_2$  receptort blokkolják, így a frekvencia csökkentése mellett nem kívánt mellékhatásként bronchokonstriktiót okozhatnak. Ezért alkalmazásuk asztmás, COPD-s betegeknél kontraindikált [194]. A csak  $\beta_1$  receptort blokkoló antagonisták szelektivitásában is jelentős különbségek mutatkoznak:

nebivolol > bisoprolol > betaxolol > metoprolol > atenolol > carvedilol [195].

A nebivolol a ma ismert legszelektívebb  $\beta$ -blokkoló, a gyógyászatban széleskörűen használják. A vizsgálatainkban a BGP-15-tel (2. ábra [188]) molekulászerkezetét tekintve hasonló propranololt (3. ábra [196]) alkalmaztunk, melynek negatív ino-, krono- és dromotrop hatásai közül a kontrakciós erő változását detektáltuk, szem előtt tartva, hogy  $\beta$ -blokkoló hatása mellett L típusú  $Ca^{2+}$  áramlás, valamint nagyobb koncentrációban  $Na^+$  csatorna gátló hatással is rendelkezik [197].

### 3.9. A PDE enzimek jelátviteli szerepe

Egy másik feltételezett mechanizmus a cGMP-PKG (ciklikus guanozin-monofoszfát, protein kináz G) útvonal stimulálása, melyet PDE (foszfodiészteráz) enzim gátló hatás szempontjából vizsgáltunk. Diasztolés szívelégtelenségben csökken e jelátviteli útvonal aktiválódása, mely a kardiomiociták passzív feszültségének növekedéséhez vezet [198]. Az endotélből felszabaduló NO (nitrogén-monoxid) a szolubilis guanil-cikláz (sGC) enzim aktiválásával emeli a cGMP, ezáltal PKG szinteket, mely utóbbi fehérje foszforiláción keresztül gátolja a  $Ca^{2+}$  felszabadulást, ezáltal a miozin könnyűlánc kinázt és az az által kiváltott vazokonstriktiót, így okozva vazorelaxációt. A NO bioelérhetőségének csökkenése endotél diszfunkcióhoz vezethet, proinflammatorikus, protrombikus valamint vazokonstriktor folyamatokat indít el [199]. Emellett a NO kardiomiocitákba diffundálva a szívfunkciók modulálásában is részt vesz, így a

diabétesz, elhízás, atheroszklerózis által generált folyamatok hozzájárulnak a diasztolés diszfunkció kialakításához [200]. A cGMP a NO útvonal mellett a pitvari nátriuretikus peptidek (ANP) hatására is szintetizálódhat, de bármely útvonal gátlása hipertóniát, szívizomhipertrófiát okoz [201, 202]. A PKG mindezek mellett a VASP (vazodilátor-stimulált foszfoprotein) foszforilálásán keresztül a sejtmigrációban, sejt-sejt adhéziós kölcsönhatásban, valamint a kamrai remodelációban is részt vesz [203]. Mivel a VASP foszforilálását kizárólag a PKG végzi a Ser239 aminosav targeten, így a p-VASP (foszfo-VASP) mennyiségéből a PKG aktivitásra lehet következtetni [204]. A PKG a VASP mellett a relaxációs folyamatokat a titinen keresztül is befolyásolja, mely a miociták passzív feszülésének meghatározója. A titin rugalmasságának szempontjából kiemelkedő a PKG target titin N2-bus régió foszforiláltsága [205].

A diasztolés mechanizmusok másik fontos útvonala a SERCA2a pumpa, mely feladata a  $Ca^{2+}$  endoplazmatikus retikulumba történő visszapumpálása [206]. Alapállapotban a pumpát a PLB (foszflambán) gátolja, mely foszforilálódása a pumpáról történő leválásával jár, lehetővé téve annak aktiválódását [207]. A  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatására a cAMP-függő (ciklikus adenosin-monofoszfát) PKA (protein kináz A) a PLB foszforilálásán keresztül fokozza a SERCA pumpa működését [208]. Mivel azonban a PKG szintén képes a PLB foszforilálására, a cGMP-PKG útvonal is ezt a mechanizmust indítja el, hozzájárulva az elernyedési folyamatokhoz [209].

A cGMP a PKG aktiváción túl egyes kationcsatornák és cGMP-kapcsolt foszfo-diészteráz (PDE) enzimek szabályozásában is részt vesz [210]. A PDE enzimek cAMP-t és cGMP-t 5'-AMP-vé és 5'-GMP-vé bontják, kontrollálva ezzel intracelluláris szintjeiket. A PDE gátlók cGMP szint emelésén keresztül kialakuló kardioprotektív hatását több tanulmányban is bizonyították. A PDE5 gátlása a NO-sGC útvonalon keresztül [211-215], míg a PDE9 az ANP útvonalon keresztül csökkentette a kardiális hipertrófiát [216]. Hasonlóan, a PDE1A gátlása szintén cGMP-függő úton mérsékelte a hipertrófia kialakulását [217]. Az ismert 11 PDE enzim közül [218] a kardiovaszkuláris rendszerben eddig 9 féle PDE izoformát azonosítottak (PDE1-9) [216]. A PDE4 és PDE8 a cAMP, míg a PDE5, PDE6, PDE9 cGMP-re specifikusak. A PDE 1,2,3 mind a cAMP mind a cGMP bontására képesek [218]. A PDE1 három altípus közül az egészséges szívben nagy mennyiségben a PDE1C található (mely nagyobb affinitást mutat a cAMP iránt), ugyanakkor a cGMP iránt nagyobb affinitású PDE1A kardiális szintjének szignifikáns emelkedését írták le patológiás elváltozások esetén [219].

Kutatócsoportunk tollából származó eredmény a SERCA2a pumpa fokozott aktivitásának detektálása BGP-15 kezelésben [14], melynek hátterében a PDE gátlás lehet a fő útvonal.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Etikai engedélyek

A humán minták vizsgálatán alapuló munkánkat a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének Szívsebészeti Tanszékével együttműködve végeztük. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács jóváhagyta (etikai engedély szám: ETT TUKEB 39762-3/2016/EKU). Az engedély nem csupán a minta felhasználására, de a MedSol medikációs rendszerbe történő belépésre is kiterjedt, így a donor ambuláns háttere visszakövethető volt. A mintavételt a betegek írásbeli és szóbeli tájékoztatása, valamint írásbeli beleegyezése előzte meg. A nyitott szívűtéten átesett betegekből származó minta a kanüláció során egyébként is eltávolításra került volna, így a mintavétel extra kockázatot nem jelentett a betegeknek. Noha kutatásainkhoz bal kamrai szövet lett volna ideális, az etikai és operációs szempontoknak megfelelően jobb pitvari szövetdarabot volt lehetőségünk vizsgálni.

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

### 4.2. Felhasznált anyagok, állatok, trabecula

Első kísérleti elrendezés - izolált trabecula vizsgálata

Az első kísérleti elrendezésben felhasznált anyagok közül a propranolol, az isoproterenol, illetve kutatásunk fő tárgya, a BGP-15 már ismertetésre került a korábbi fejezetben. Ezeken túl minden izolált trabecula vizsgálatnál alkalmaztunk adenzint, mely a metodika szempontjából elengedhetetlennek bizonyult. Tapasztalataink szerint az adenzinnal történő kezelés a minták minőségét, vitalitását nagymértékben javította.

Mesterséges intersticiális folyadékként Krebs (NaCl: 118mM, KCl: 4.7mM, CaCl<sub>2</sub>: 2.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1mM, MgCl<sub>2</sub>: 1.2mM, NaHCO<sub>3</sub>: 24.9 mM, glükóz: 11.5mM, aszkorbisav: 0.1 mM) oldatot alkalmaztunk minden izolált szervi vizsgálatunkban (így a második kísérleti elrendezésben is) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## Második kísérleti elrendezés – BGP-15-kezelt nyulak vizsgálata

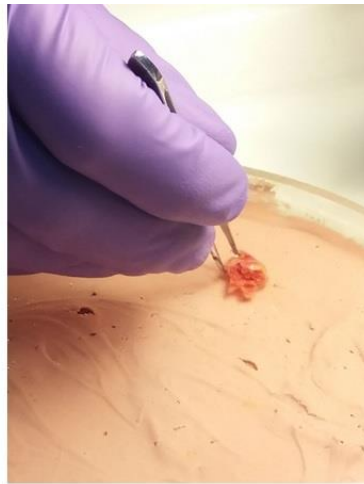
Állatkísérleteink során hím New Zealand típusú nyulakat (2700-3200 g) alkalmaztunk (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA, USA). Az állatokat 12-12 órás nappal-éjszaka ciklusban tartottuk, a vizsgálatok megkezdése előtt 2 hetes adaptációs időt biztosítottunk. A hiperkoleszterinémia, esetleges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

### 4.3. Vizsgálatok kivitelezése

#### Első kísérleti elrendezés - izolált trabecula vizsgálata

##### Trabecula preparálása

A minták nyitott szívsebészeti műtétekből (főként bypass és billentyűműtétek) származtak. A szövetdarab a kanüláció során, még a cardioplegia előtt került eltávolításra. A mintát hideg, karbogénnel dúsított Krebs-oldatot (4°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH= 7,4) tartalmazó főzőpohárban, rövid időn belül (5 perc) a kísérlet helyszínére szállítottuk. Ezt követően a szövetdarabot egy 4°C hőmérsékletű, karbogénnel dúsított Krebs oldatot tartalmazó preparálókádba helyeztük és óvatosan kimetszetünk egy 0.5-1.5 mm széles, 3-6 mm hosszú izomköteget a pitvardarab belső (endocardiummal borított) felszínéről. A megtisztított trabecula két végét sebészi fonal segítségével, egy 10 ml térfogatú szervkád (TSZ-04, Experimetria, Budapest) aljához és egy a szervkád fölötti transzducerhez (SD-01, Experimetria, Budapest) rögzítettük, 10 mN nyugalmi feszülés mellett. A szervkád szintén Krebs-oldatot tartalmazott (pH=7,4; 36 °C), melyet karbogénnel (95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub>) oxigenizáltunk a kádhoz tartozó pipán keresztül. Az izomrostot platinaelektroddal, a küszöbfeszültség másfélszeresével (7-20 V, 1 Hz, 2 ms impulzusszélesség), pontszerűen ingereltük, melyhez programozható stimulátort (ST-02, Experimetria, Budapest) és erősítőt (PST-02, Experimetria, Budapest) használtunk. A kontrakciós erőt az izometriás összehúzódások amplitúdójával jellemeztük, melynek méréséhez transzducert és jelerősítőt (SG-01D, Experimetria, Budapest), rögzítéséhez pedig poligráfot (R-61 6CH, Medicor, Budapest) alkalmaztunk (4. ábra).



**4. ábra: A preparálás folyamata.** A kapott mintát a preparálás során 4°C-os, oxigenizált Krebs oldatban tartottuk, majd a trabeculát a szervtartó kádba helyeztük, ahol biztosítottuk a megfelelő hőmérsékletet (35,5°C), valamint a folyamatos oxigén- és tápanyagellátást.

#### Oldatok készítése

A vizsgálat napján adozinból, isoproterenolból, propranololból és BGP-15-ből 10 mmol/l-es törzsoldatokat készítettünk. Oldószerként Krebs oldatot alkalmaztunk az isoproterenol kivételével, ahol is fiziológiás sóoldatot használtunk. A törzsoldatokból 10x tovafutó hígítási sort készítettünk.

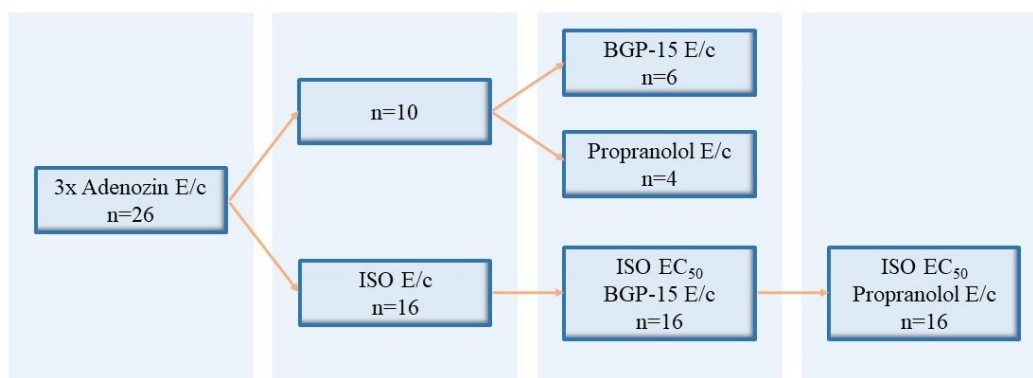
## Protokoll

Vizsgálataink során 2 protokollt alkalmaztunk, melynek az előkészítése, illetve kezdeti elemei megegyeztek (5. ábra).

A preparátumokat 45 percen keresztül inkubáltuk folyamatos oxigénellátás mellett. Többszöri, előmelegített Krebs oldattal történő mosással biztosítottuk a megfelelő tápanyagellátást.

Az inkubációs idő letelte után a preparátumokon három, egymást követő adеноzin koncentráció-hatás (E/c) görbét vettünk fel (0.1  $\mu\text{mol/l}$ -től 1 mmol/l-ig), melyeket először 30, ezután 15 perces mosási periódus különített el. A két első adеноzin E/c görbe a preparátum edzését szolgálta (megfigyeléseink szerint a minták működése jelentősen javult hatásukra), míg a harmadik célja (a további edzés mellett) a minta adеноzinnal szembeni válaszkészségének felmérése volt. A harmadik adеноzin E/c görbét egy újabb 15 perces mosás követte.

I. Protokoll – Indirekt hatás: a BGP-15 indirekt (prestimulált) hatásának tanulmányozásához az adеноzinos kezelést követően isoproterenol E/c görbét vettünk fel 1 nmol/l-től 0.1 mmol/l-ig. Mivel az isoproterenol erősen aritmogén hatású, így nem minden esetben pipettáztuk a mintára a töményebb koncentrációkat is. Amikor már nem nőtt tovább a kontrakciós erő, esetleg egyenetlenné vált, az isoproterenolt Krebs oldattal kimostuk a szervkádból. Ezt az E/c görbét is mosás követte (30 perc). Az isoproterenol E/c görbéje alapján kiszámoltuk a pozitív inotropia szempontjából félhatásos koncentrációt, majd a mosási periódus letelte után ezt a dózist pipettáztuk a mintánkra. Miután a hatás stabilizálódott, a preparátumokon BGP-15 E/c görbét vettünk fel (0.1  $\mu\text{mol/l}$ -től 1 mmol/l-ig). Ezt mosás és 50 perc inkubáció követte. Ezután ismét bemértük az isoproterenol félhatásos koncentrációját, majd a hatás kialakulása és stabilizálódása után propranolol E/c görbét vettünk fel (10 nmol/l-től 0.1 mmol/l-ig).



**5. ábra: Humán trabeculán végzett protokoll sematikus ábrája.** E/c: koncentráció-hatás görbe; ISO: Isoproterenol; EC50: félmaximális koncentráció; BGP-15: O-(3-piperidin-2-hidroxi-1-propil) nikotinsav amidoxim hidroklorid

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

#### A koncentráció-hatás görbék kiértékelése

Az egyes E/c görbék kiértékeléséhez az egyes regisztrátumoknak két kritériumnak kellett megfelelni:

1. A nyugalmi kontrakciós erő legyen legalább 1 mN. Az inkubációs idő elején a minták kontrakciós ereje jellemzően csekély volt, a harmadik adenzin E/c görbét követően viszont jelentősen megemelkedett és ebben az állapotban stabilizálódott, így ezt definiáltuk nyugalmi kontrakciós erőként. Ha valamilyen okból a kontrakciós erő elenyésző maradt (nem érte el az 1 mN-t), a mintát kizártuk a kísérletből.
2. Az ingerelt pitvari trabecula aktivitása legyen szabályos. Szabálytalan működés esetén a minta kizárásra került.

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

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

$$E = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100\%$$

ahol: E: a hatás;  $F_0$ : kiindulási kontrakciós erő; F: az aktuális kontrakciós erő.

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

$$E = \frac{F - F_0}{F_0} \cdot 100\%$$

ahol: E: a hatás;  $F_0$ : kiindulási kontrakciós erő; F: az aktuális kontrakciós erő. (Természetesen ez utóbbi jelenséggel csak az indirekt protokollban kellett számolni, hiszen direkt protokoll alkalmazásakor nem volt isoproterenol E/c görbe.)

Ritkán és átmenetileg előfordult, hogy adenzinra, BGP-15-re és propranololra pozitív inotróp választ, illetve az isoproterenolra negatív inotróp választ kaptunk, ám ezeket figyelmen kívül hagytuk.

Második kísérleti elrendezés – BGP-15-kezelt nyulak vizsgálata

Állatok kezelése

I. Protokoll: hiperkoleszterinémias (HC, n=10, magas koleszterintartalmú táp), illetve a korban azonos kontroll (n=6, standard táp) nyulakat alkalmaztunk. A hiperkoleszterinémias állatokat 16 héten keresztül 1%-os koleszterintartalmú aterogén táppal etettük, ezt követően vettük fel a kezdeti értékeket. Ketamin-xilazin (30/3 mg/ttkg i.m.) altatás mellett regisztráltuk az echokardiográfiás kiindulási értékeket, majd az állatok 10 mg/ttkg BGP-15 i.v. bolust (fiziológias sóoldatban oldva) kaptak fülvénán keresztül. A disztribúcióra 20 perc várakozási időt adtunk, majd újra echokardiográfiás vizsgálatnak vetettük alá az állatokat. A statisztikai elemzéshez az alábbi négy alcsoportot hoztuk létre:

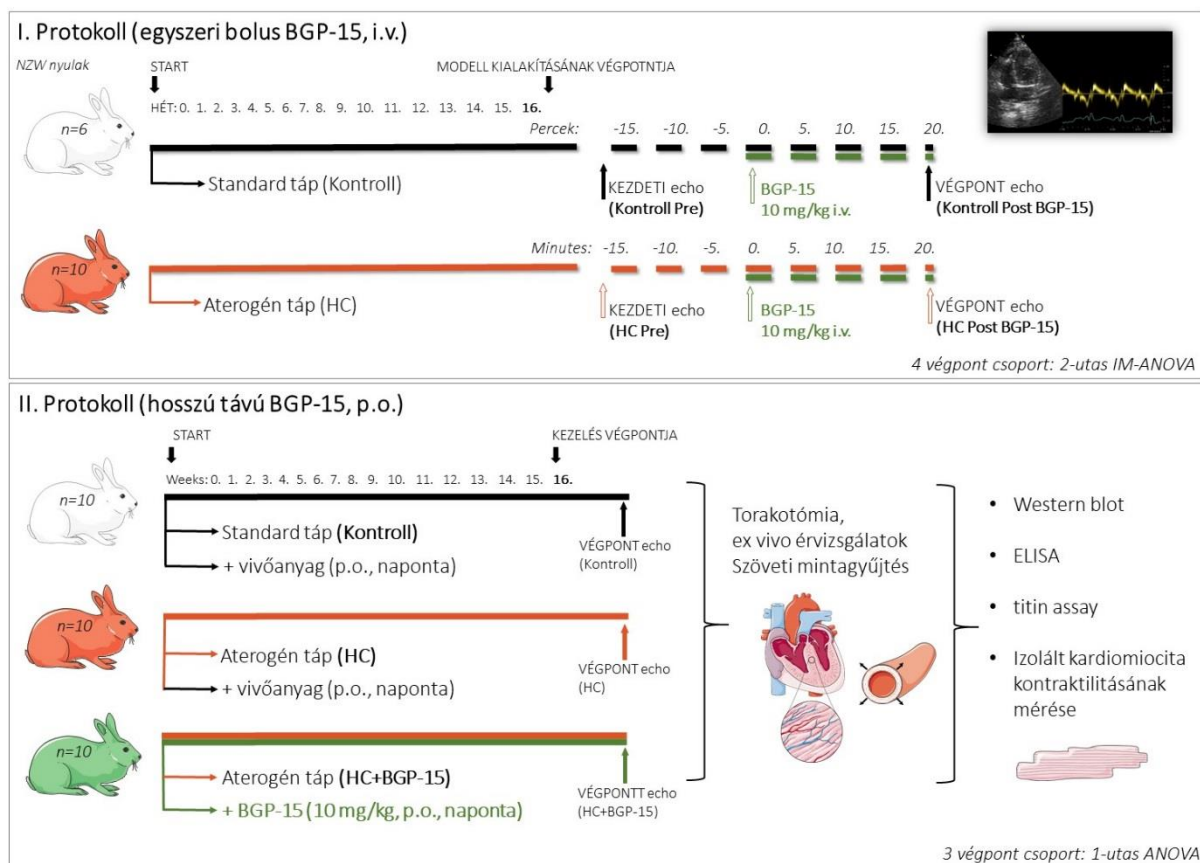
- 1) Kontroll csoport kiindulási körülményekkel (Kontroll Pre)
- 2) Az előzővel megegyező Kontroll csoport BGP-15 kezeléssel (Kontroll Post BGP-15)
- 3) HC állatok kiindulási körülményekkel (HC Pre)
- 4) Az előzővel megegyező HC csoport BGP-15 kezeléssel (HC Post BGP-15).

II. Protokoll: vizsgálatunkat egy másik populáción végeztük. 3 csoportot alakítottunk ki:

- 1) Kontroll csoport (n=10): standard táp
- 2) Hiperkoleszterinémias csoport (HC, n=10)
- 3) BGP-15 kezelt hiperkoleszterinémias csoport (HC+BGP-15, n=10).

Utóbbi két csoport 4 hónapon keresztül kapott aterogén tápot (1% koleszterinnel dúsítva). A HC+BGP-15 csoport napi 10 mg/ttkg orális BGP-15 kezelésben részesült (sóoldat formájában). A kísérlet végpontján echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk, melyet fülvénán keresztül történő vérvétel követett. Másnap az állatokat elaltattuk, thoracotomiát követően az aorta

thoracitát további *ex vivo* vizsgálatokhoz eltávolítottuk. A szívét jéghideg (4°C-os) Ca<sup>2+</sup>-mentes Krebs oldatba helyeztük, valamint folyékony nitrogénben fagyasztott szövetmintákat gyűjtöttünk későbbi molekuláris biológiai és izolált kardiomiocita vizsgálatokhoz. Az egyes szervek (tüdő, vese) tömegét megmértük, meghatároztuk a tibia hosszát (n=5). 3 nyúl/csoport esetén a szívét és az aortagyököt 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz (6. ábra).



**6. ábra: Második kísérleti elrendezésünkben alkalmazott protokollok.** Az I Protokoll során az akut hatást tanulmányoztuk. Egészséges kontroll és 16 hetes aterogén tápon tartott nyulak esetén vizsgáltuk az egyszeri, i.v. bolusként beadott BGP-15 hatását. A két csoport (Kontroll, HC) időben azonos lefutású adatainak a két adott időpontban (BGP-15 injekció előtt és után) történő összehasonlításához két utas ismételt mérés ANOVA-t alkalmaztunk. A hosszú távú (krónikus) kezelés során az egészséges kontrollokat a HC és BGP-15 kezelt csoportokkal hasonlítottuk össze. A BGP-15-öt orálisan adtuk már az aterogén diéta kezdetétől. A három csoport végpontjait egyutas ANOVA-val illetve Tukey poszt-tesztel hasonlítottuk össze.

## Echokardiográfia

A transthoracalis echokardiográfiát ketamin-xilazin (30/3 mg/ttkg i.m.) anesztézia mellett végeztük. Az állatok mellkasszövetét eltávolítottuk, a vizsgálat során az adatgyűjtést az Amerikai Echokardiográfiai Társaság ajánlásai alapján végeztük [220, 221]. Vidid E9 típusú

ultrahangos képalkotó eszközt használtunk, 12 S-D típusú transzdúccerrel (GE Healthcare, New York, NY, USA). A felvételeket paraszternális hossz tengelyi és rövidtengelyi illetve csúcsi metszetben készítettük el. Az ejekciós frakciót (EF), frakcionált rövidülés (fraction shortening, FS), miokardiális falvastagságot szisztolé és diasztolé esetén, bal pitvar (left atrial, LA) nagyságát, aortaátmérőt (Ao), mitrális- és trikuszipidális annulus szisztolés csúcskitérését (MAPSE, TAPSE) M módban állapítottuk meg. Meghatároztuk a szívfrekvenciát (heart rate, HR), a verőtérfogatot (stroke volume, SV), a perctérfogatot (cardiac output, CO) és a kalkulált bal kamra tömegét. Pulsed wave Doppler (PW) és szöveti Doppler (tissue Doppler imaging, TDI) echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk, mely alapján képet kaptunk a korai (E) és késői (A) mitrális beáramlási csúcshullámokról, ezek arányáról (E/A) és a decelerációs időről (deceleration time, DecT). A falmozgásokat a mitrális annulus szeptális részén TDI  $e'$  és  $a'$  hullámok, valamint ezek arányával ( $e'/a'$ ) kalkuláltuk, az  $E/e'$  érték mellett. Mindezeket túl meghatároztuk az ejekciós időt (ejection time ET), izovolumetriás kontrakciós és relaxációs időt (isovolumic contraction and relaxation time, IVCT, IVRT), valamint a Tei-indexet (miokardiális teljesítmény index, Myocardial Performance Index, MPI), utóbbit az  $IVRT+IVCT/ET$  képlet alapján. Az aorta billentyűk vizsgálatokor a bal kamrai kiáramlási traktus (left ventricle outflow tract, LVOT) nyomás- (pressure gradient, PG) és sebességértékeit (velocities, V) is meghatározhattuk. Speckle tracking echokardiográfiát offline, apikális pozícióból (apical long axis, APLAX) és négy kamrai nézetből EchoPAC PC software (ver. 112, GE Healthcare, New York, NY, USA) Q-analysis/2D Strain opcióban kivitelezttük. A kamrai falszegmenseket manuálisan jelöltük ki, majd az izovolumetriás relaxációs periódus alatti stain rate (SR IVR), valamint a Globális Longitudinális Strain-t (GLS) és a kalkulált  $E/SRIVR$  arányt megállapítottuk.

#### Szérum paraméterek és morfológia

A vérmintákat a kísérlet végpontján, 12 órás éhezést követően, fülvénából vettük. A szérum paramétereket a Roche Cobas Integrated felhasználásával határoztuk meg (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Az állatokon testsúlymérést követően, mély anesztézia mellett thoracotomiát hajtottunk végre. A szívet, tüdőt, májat és vesét eltávolítottuk (n=5/csoport), tömegüket analitikai mérlegen mértük meg. 5 állatból izoláltuk a bal kamrát, tömegét meghatároztuk és normalizáltuk a tibia hosszára. A bal kamrát 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz. A vesét, tüdőt és májat egy éjszakán keresztül 60°C-on hagytuk, majd a nedves/száraz szövet arányát

kalkuláltuk. További 5 állat bal kamra mintáit a thoracotomiát követően azonnal kimetsztük, 4°C-os  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Krebs oldatba helyeztük, majd folyékony nitrogén segítségével gyorsfagyasztottuk és a molekuláris biológiai és az izolált miocita vizsgálatokig -80°-on tároltuk. Az aorta thoracicát kimetsztük, a disztális részét további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá, míg a proximális részt 4%-os formalin oldatban tároltuk a szövettani vizsgálatokhoz.

### Szövettan

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

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

### Izolált érgyűrű vizsgálata

Thoracotomiát követően az aorta thoracica disztális végéből egy 2 mm vastagságú szakaszt metsztünk ki, melyet azonnal 4 °C-os Krebs oldatba helyeztünk. Ezt követően a mintát preparálókádban megtisztítottuk, értartó drótok („vállfák”) segítségével teflon szervatartóra rögzítettük, majd 36°C-os Krebs oldatot tartalmazó szervkádba helyeztük (pH=7,4), 10 mN nyugalmi feszülés mellett. A minták oxigénellátását a pipán beáramló karbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) biztosította. A minták kontrakciós értékeit transzdúcer segítségével (SD-01; Experimetria Ltd., Hungary) mértük, illetve SPEL Advanced Isosys software (SOFT-02; MDE GmbH, Heidelberg, Germany) segítségével regisztráltuk és értékeltük. A mintákon három E/c görbét

vettünk fel: noradrenalin (NA), acetilkolin (Ach) és adenozin-5'-trifoszfát (ATP) felhasználásával. Az Ach és ATP koncentráció-hatás görbék előtt az érgyűrűket prekontraháltuk a noradrenalin félmaximális (EC<sub>50</sub>) koncentrációjával, melyet az előzetesen regisztrált noradrenalin E/c görbe alapján határoztunk meg. A noradrenalin E/c görbe után egy 75 perces mosási periódust iktattunk be, a többi esetben 45 perceseket. Az azonos állatból származó minták értékeit átlagoltuk (4 gyűrű/állat).

Noradrenalin esetében a kontrakciós erő növekedését, ATP esetén a csökkenését (relaxáció) vettük válasznak. Ach esetében a relaxációt vettük figyelembe, ha az érgyűrű feszülése az adott dózis bemérését követően kisebb, illetve kontrakcióval számoltunk (még hozzá a kontrakció maximális értékével), ha nagyobb értéken stabilizálódott.

A kiértékelés Ach és ATP esetén az alábbi képlet segítségével történt:

$$E = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100\%$$

ahol: E: a hatás; F<sub>0</sub>: kiindulási kontrakciós erő; F: az aktuális kontrakciós erő. (Ez a képlet a kontrakciót negatív relaxációnak értelmezi.)

Noradrenalin esetén a következő képlettel kalkuláltunk:

$$E = \frac{F - F_0}{F_0} \cdot 100\%$$

## Western blot

Minden fehérjeizoláláshoz 300 mg mély-fagyasztott miokardium mintát használtunk fel. A szövetet porítást követően a következő összetételű oldatban homogenizáltuk: 25 mM Tris-HCl, pH=8,25 NaCl, 4 mM Na-ortovanadát, 10 mM NaF, 10 mM Na-pirofoszfát, 10 nM okadaic-sav, 0,5 mM EDTA, 1mM PMSF, proteázinhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az összfehérje koncentrációt QuantiPro™ BCA Assay Kit segítségével határoztuk meg (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A fehérjéket (10 µg/zseb) SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk elektro-blottolással (40 mA 120 perc). A 3%-os BSA blokkolást követően, a membránokat 4°C-on a következő primer antitestekkel inkubáltuk (zárójelben az alkalmazott hígítás): anti-szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz 2a (SERCA2a; 1:2500), anti-hősokk fehérje 72 (Hsp72; 1:5000), anti-vazodilatátorral stimulált foszfoprotein

(VASP; 1:1000), anti-foszfo(Ser239)- vazodilatátorral stimulált foszfoprotein (p-VASP; 1:1000), anti-foszfodiészteráz 9a (PDE9A; 1:2000), anti-foszfodiészteráz 5a (PDE5A; 1:1000), anti-foszfolambán (PLB; 1:2000), anti-foszfo(ser16)-foszfolambán (p-PLB; 1:2000), anti-gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, mint háztartási fehérje; 1:20000) (Sigma-Aldrich-Merck KGaA és Abcam Plc, Cambridge, UK). Az antitesteket a gyártói előírásoknak megfelelő hígításokban alkalmaztuk. Az előhíváshoz tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesteket, valamint kemilumineszcens reagenst használtunk (WesternBirght™, ECL, Advansta Inc, Menlo Park, CA, USA). A detektálást és a kiértékelést Image Studio Digits ver. 5.2. software-rel (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) rendelkező C-Digit® blot scanner segítségével végeztük. Az adatokat három független vizsgálat alapján átlagoltuk (n=6 minta/csoport). A fehérje expressziót a kontroll csoporthoz viszonyítottan, a pixelsűrűség százalékos eltéréseként adtuk meg (a kontrollt tekintettük 100%-nak).

#### A miokardium cGMP-tartalmának meghatározása

A bal kamrai cGMP kvantifikációjához direkt kompetitív immunoesszét alkalmaztunk (Abcam Plc., Cambridge, UK). A cGMP abszorbancia-koncentráció görbét követően, a mintákat (n=4/csoport, dupla mérés minden esetben) 0,1M HCl-ban homogenizáltuk. A vizsgálat során a gyártói protokollt követtük. A tormaperoxidáz-kapcsolt cGMP mennyiségét, egy G-fehérje bevont 96-os plate-hez kötöttük, majd az optikai sűrűség (450 nm, plate olvasó, FLUOstar Optimam BMG Labtech. Ortenberg, Germany) alapján meghatároztuk a mennyiséget. A miokardiális minták cGMP mennyiségét a gyártói egyenlet felhasználásával kalkuláltuk, és pmol/mg szövet értéként fejeztük ki.

#### Titin esszé

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

## In vitro kolorimetriás PDE1 kit

A BGP-15 PDE1 gátló képességét specifikus kolorimetriás vizsgálattal (Abcam Plc., Cambridge, UK) határoztuk meg. A vizsgálat alapja a cGMP hasítása PDE1 által 5'-GMP-vé, amelyet az 5'-nukleotidáz enzim tovább hasít GMP-vé és foszfáttá, és a foszfát mennyiségét Malachit Green reagenssel határozzák meg. A görbe elkészítése után (abszorbancia - 5'-GMP koncentráció) egy 96 lyukú plate-re loadoltuk a vizsgálati puffert, 0,5 mM cGMP szubsztrátot, 5'-nukleotidáz enzimet (5 kU/ml), PDE1 enzimet (4 mU/ $\mu$ l), és a tesztvegyületet (BGP-15). A BGP-15-öt 40, 100, 200 és 500  $\mu$ M koncentrációban vizsgáltuk. Az üres lyukak csak a vizsgálati puffert tartalmazták (a háttér kivonásához). Pozitív kontrollként 40  $\mu$ M izobutil-1-metil-xantint (IBMX, IC50 PDE1 esetén = 25  $\mu$ M) alkalmaztunk. A negatív kontroll csak a reagens mixet tartalmazta, hatóanyagok nélkül. 50 perc, 37°C-os inkubációt követően módosított Malachit Green vizsgálati reagenst adtunk minden egyes lyukhoz. További 20 perc inkubáció után az abszorbanciát Varioskan LUX spektrométerrel (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mértük 620 nm-en, és kiszámítottuk a keletkezett 5'-GMP mennyiségét. A „teszt” lyukakban a PDE1 aktivitást a „kontroll” PDE1 aktivitásra normalizáltuk, amelyet 100%-osnak tekintettünk. Az adatokat egyutas ANOVA-val végeztük, Tukey utótesztel.

## 4.4. Statisztikai elemzés

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

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

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

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

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

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

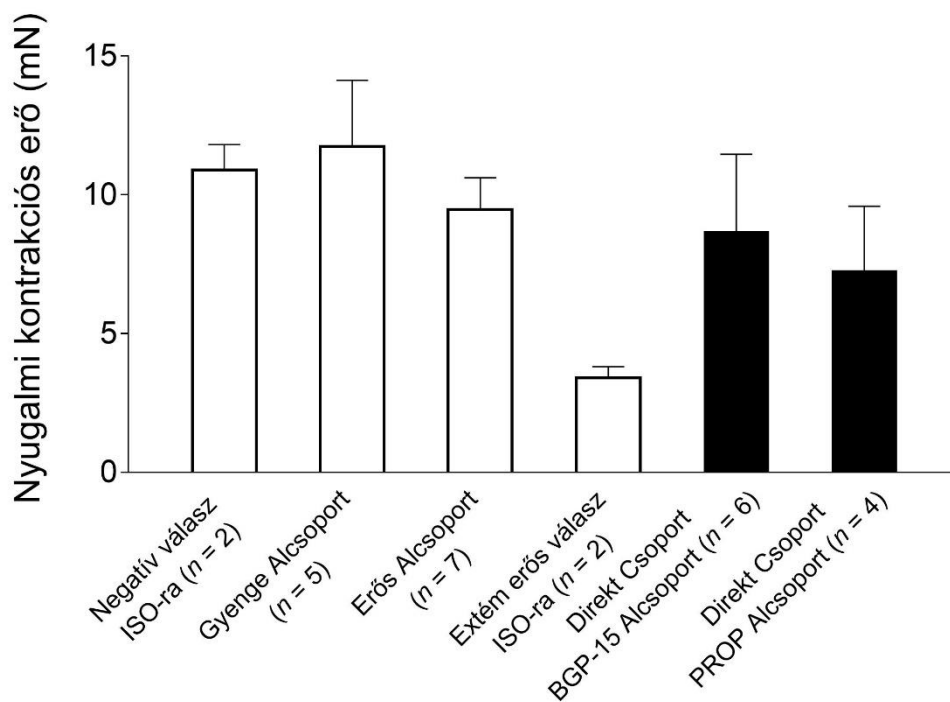
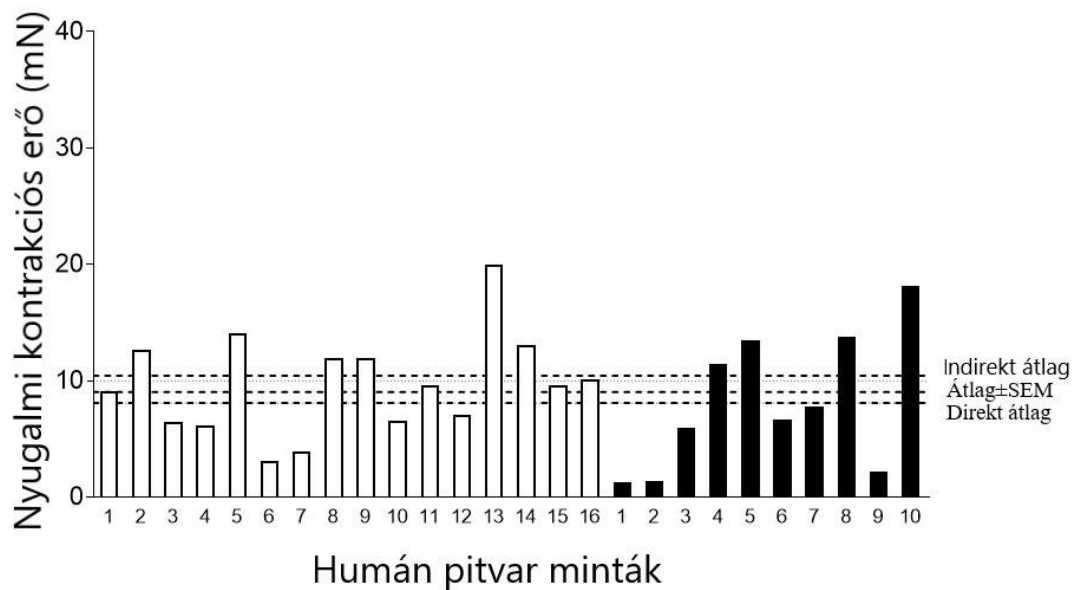
## 5. Eredmények

### 5.1. Első kísérleti elrendezés - Izolált trabecula vizsgálata

#### 5.1.1. Jobb pitvari minták kontrakciós ereje

A direkt (n=10) és indirekt (n=16) minták homogénnek bizonyultak a nyugalmi kontrakciós erő tekintetében. A direkt csoport (melyben a mintákat nem kezeltük isoproterenollal) két alcsoportjában (BGP-15: n=6 és propranolol: n=4) szintén nem volt különbség a nyugalmi kontrakciós értékek között.

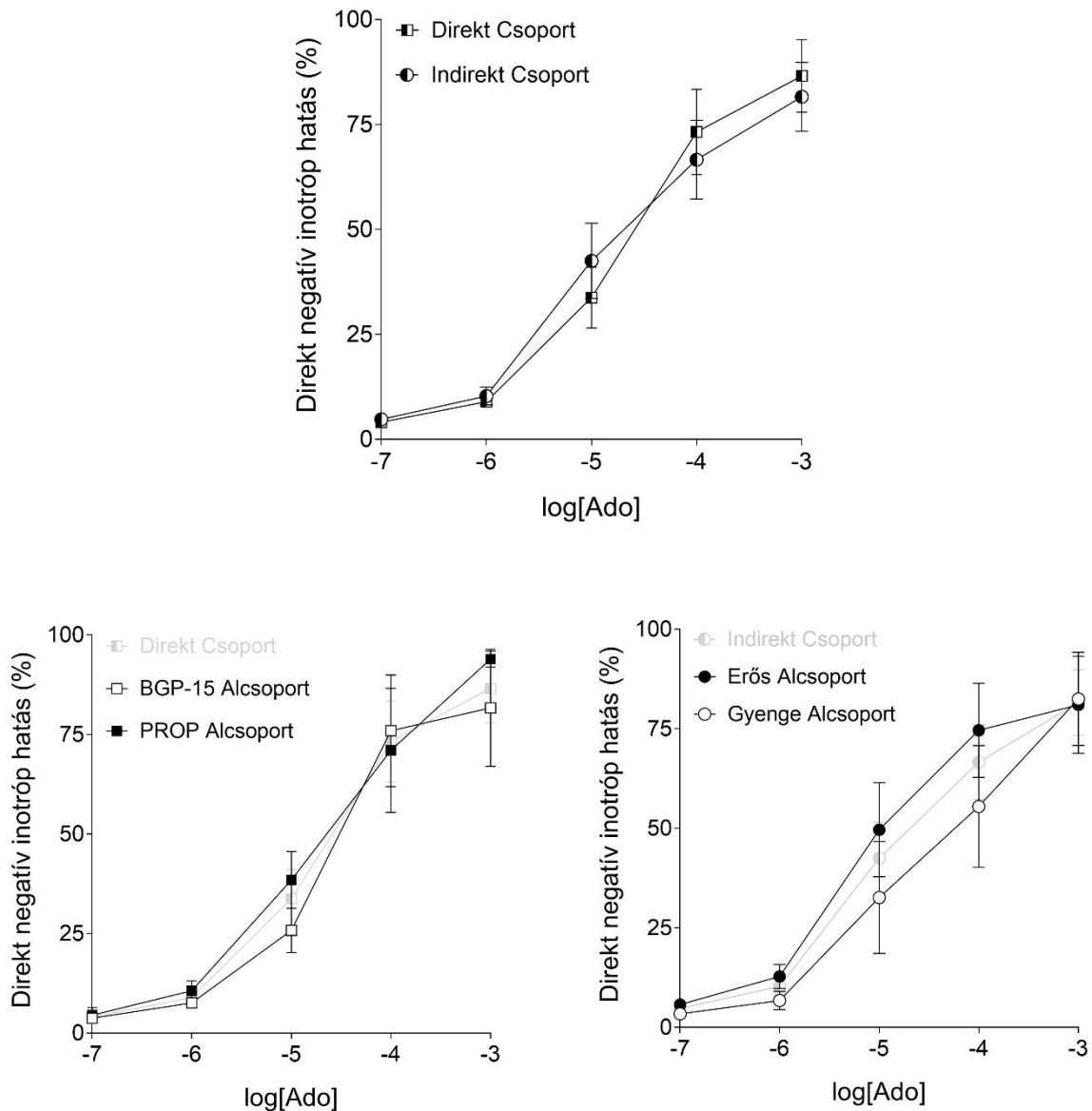
Azon minták esetén, melyek isoproterenol kezelésben részesültek, az ISO-ra adott válasz alapján négy típust különítettünk el: konzekvensen negatív inotróp választ adó (n=2), gyenge pozitív inotróp választ adó (n=5), erős pozitív inotróp választ adó (n=7), valamint extrém erős pozitív választ adó (n=2).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



**7. ábra: Humán jobb pitvari minták kontrakciós ereje a harmadik adenzin E/c görbét követő mosási periódus végén.** Fent: a direkt és indirekt minták egyedi kontrakciós erői, lent: a csoportátlagok (átlag±SEM) kerültek ábrázolásra. Üres oszlopok: indirekt csoport, sötét oszlopok: direkt csoport. E/c: koncentrációs-hatás; SEM: standard error of the mean. (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)

### 5.1.2. Adenozinra adott válasz

A minták adenozinra adott válaszait a 3. adenozin E/c görbe alapján értékeltük. Az adenozin direkt negatív inotróp hatása minden csoportban hasonló volt, mutatva a minták homogenitását, hiszen az adenozin E/c görbéig minden minta azonos beavatkozásokon ment keresztül (8. ábra).



**8. ábra: Adenozin hatása humán jobb pitvari mintákra indirekt és direkt csoportok esetén, a harmadik adenozin E/c görbét követően.** Az X tengely az adenozin koncentráció logaritmusát tünteti fel, míg az Y tengely a kontrakciós erő százalékban kifejezett csökkenését. (Mivel az ISO kezelés a protokoll későbbi szakaszában következett, itt minden minta esetén a direkt negatív inotróp hatás látható). A jelölések az adenozin hatásának átlagát mutatják az egyes csoportok és alcsoportok esetén. A BGP-15, PROP, Erős, Gyenge csoport elnevezések a protokollok későbbi szakaszaira utalnak. SEM: standard error of the mean. (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)

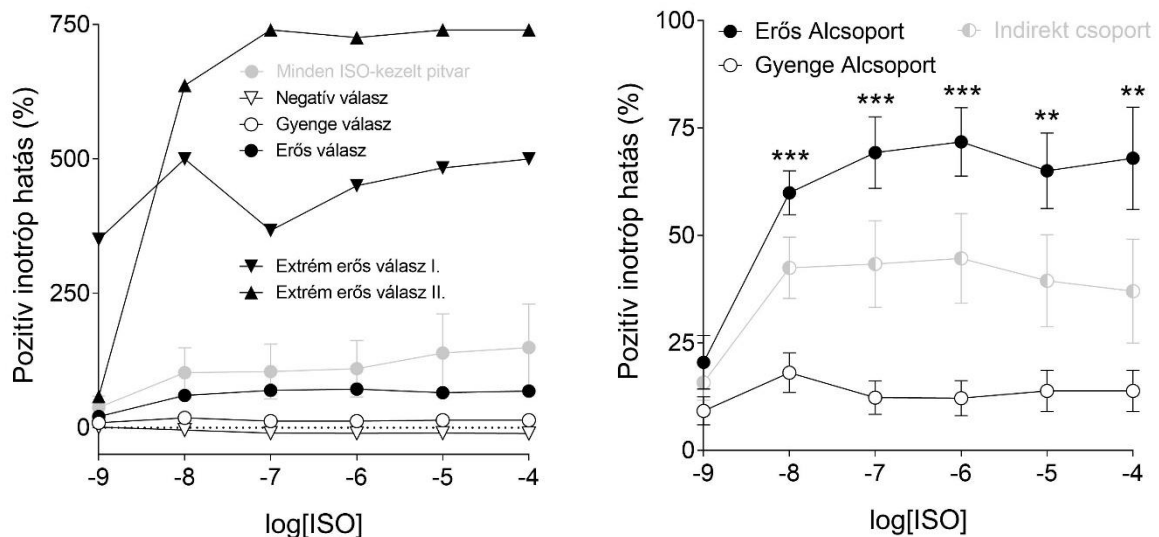
### 5.1.3. Isoproterenolra adott válasz

Az isoproterenolra a minták (kettő kivételével) pozitív inotróp választ adtak. A pozitív válaszokat erősségük alapján osztályoztuk:

- A) gyenge válasz: ha a válasz maximuma nem érte el az 50%-ot (azaz a nyugalmi kontrakció kevesebb, mint 50%-kal emelkedett)
- B) erős válasz: ha a maximum 50-100% között volt
- C) extrém erős válasz: ha a maximum nagyobb volt, mint 100%.

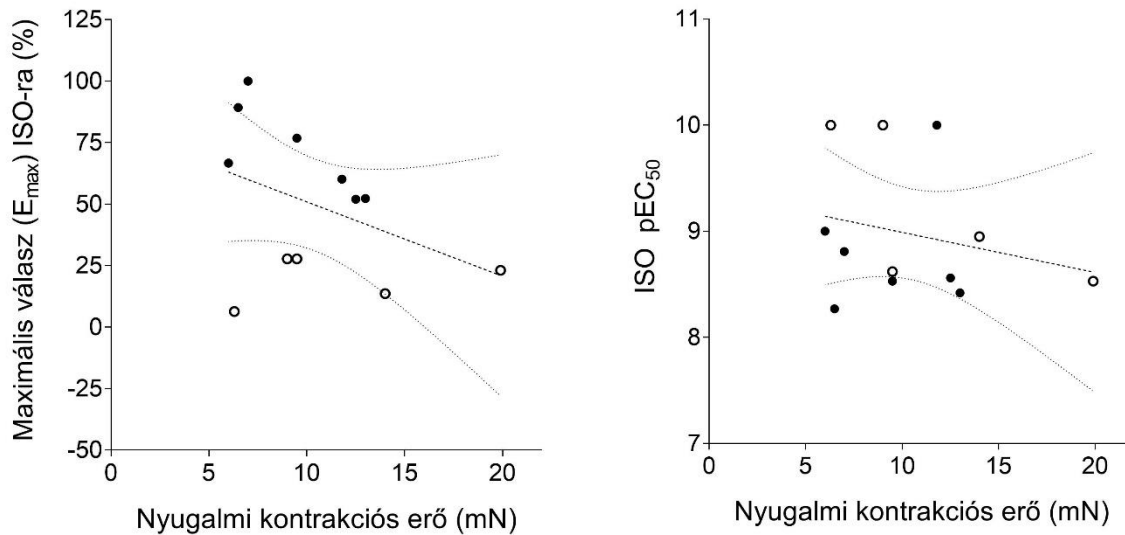
Az előzőekben leírtaknak megfelelően a negatív inotróp és extrém erős pozitív inotróp választ adó mintákat kizártuk a további elemzésből.

Szinte minden isoproterenolra adott válasz esetén szignifikáns volt a különbség az erős és a gyenge csoportok között (9. ábra).



**9. ábra: Isoproterenol (ISO) hatása a humán jobb pitvari mintákra.** Az X tengely az isoproterenol koncentráció logaritmusát, míg az Y tengely a nyugalmi kontrakciós erő százalékban kifejezett emelkedését mutatja. A jelölések az ISO hatásának átlagát mutatják az egyes adathalmazok esetén ( $\pm$ SEM), illetve a bal ábrán láthatjuk két minta egyéni válaszát ISO-ra (extrém erős válasz I. és II.). Jobb oldalon az Indirekt csoport két alcsoportját láthatjuk. A csillagok a két alcsoport közötti szignifikáns eltérést mutatják az adott ISO koncentráció esetén (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ); SEM: standard error of the mean. (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)

Mindkét csoport esetén az isoproterenol hatásának fő jellemzői (a maximális válasz és a félhatásos koncentráció) negatív korrelációt mutattak a nyugalmi kontrakciós erővel, ami nem volt szignifikáns (Pearson  $r = 0.41$ ,  $p = 0.19$ ; Spearman  $r = 0.32$ ,  $p = 0.31$ ) (10. ábra).

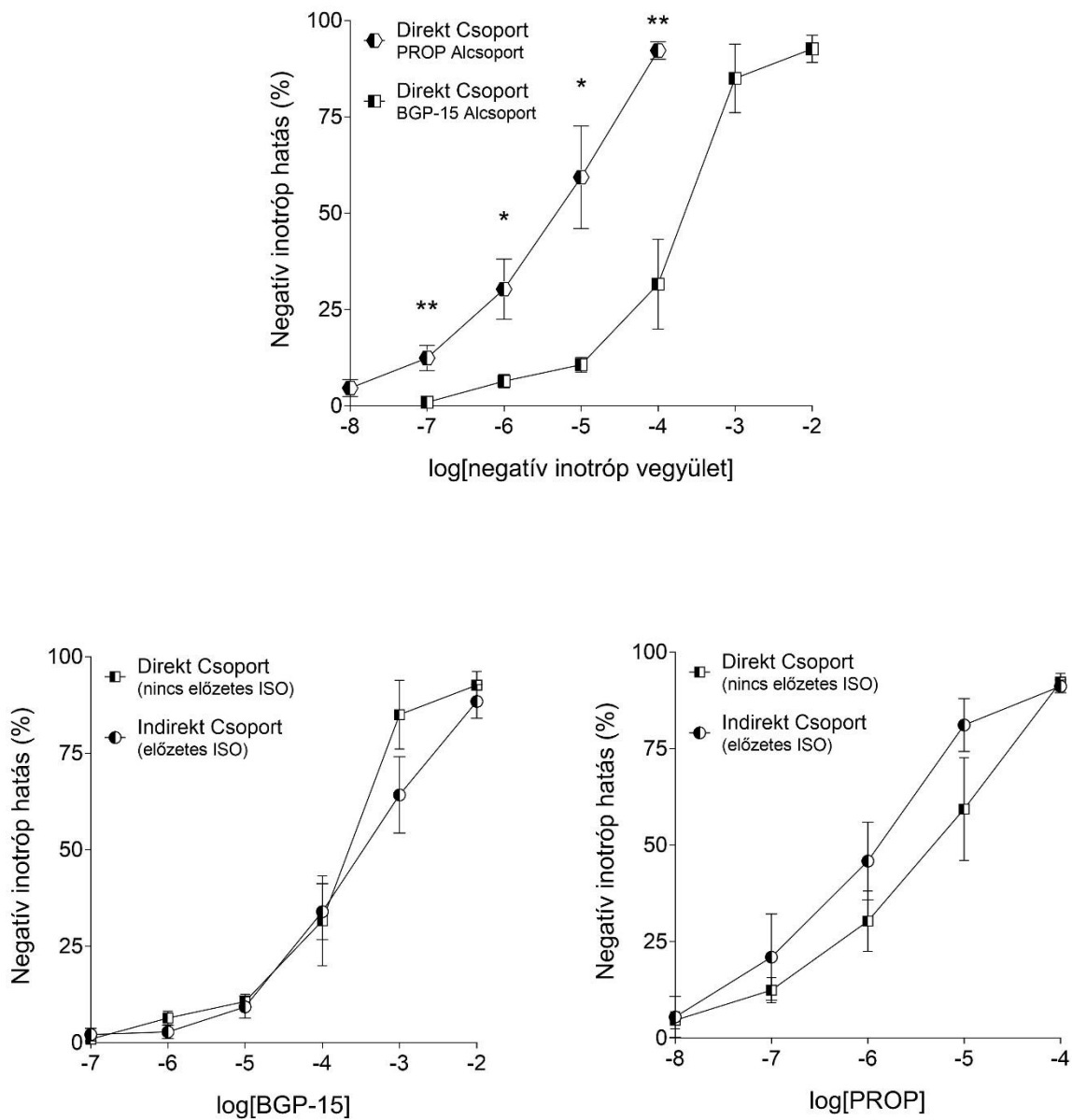


**10. ábra: A humán pitvari minták nyugalmi kontrakciós erejének kapcsolata az isoproterenolra adott maximális pozitív inotróp válasszal (balra), továbbá az ISO potenciájával (az ISO félmaximális koncentrációjának negatív logaritmusával, jobbra)** Fekete körszimbólumok az Erős alsó csoport mintáit, a fehér körszimbólumok a Gyenge alsó csoport mintáit jelölik. A pontozott vonal az illesztett egyenest ábrázolja, míg a pontozott görbék a 95%-os konfidencia határokat. (Mivel nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció az egyes paraméterek között, a regressziós egyenesek és görbék csak illusztrációk.) (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)

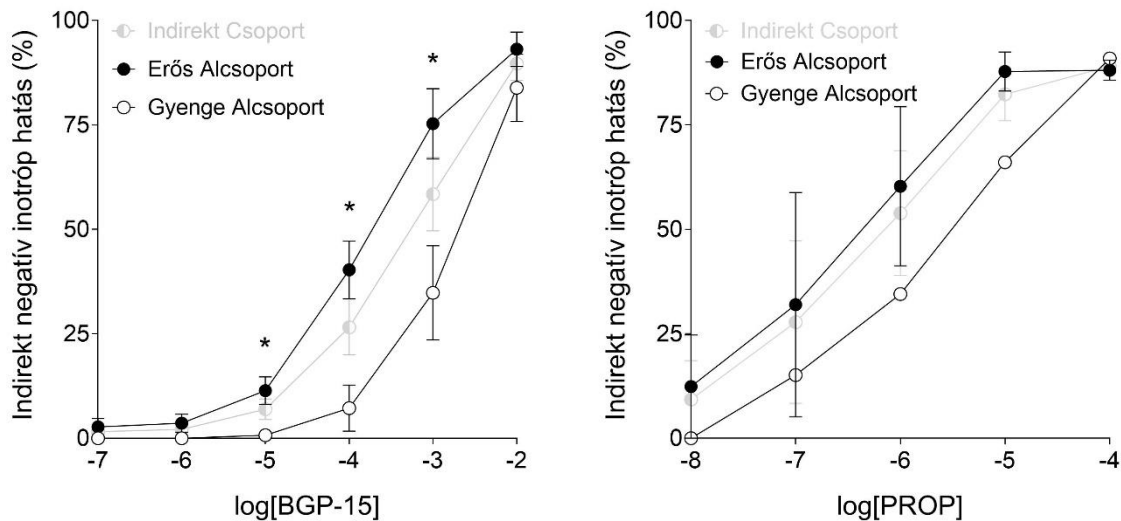
#### 5.1.4. Propranololra és BGP-15-re adott válasz

Mind a propranolol, mind a BGP-15 erőteljes, koncentráció-függő negatív inotróp hatást fejtett ki az ingerelt mintáinkra, direkt és indirekt protokoll esetén egyaránt (11. és 12. ábra). Ez a két hatás több hasonlóságot is mutatott (például a hatás maximumát tekintve), azonban néhány fontos különbség is megfigyelhető a propranolol és a BGP-15 hatása között.

A legnagyobb különbséget a két vegyület potenciáljában tapasztaltuk: a BGP-15 kevésbé bizonyult potensnek a propranolollal összehasonlítva (mind a direkt, mind az indirekt hatás tekintetében) (11. ábra). Ugyanakkor a BGP-15 erőteljesebb direkt negatív inotróp hatást fejtett ki, míg propranolol esetén jelentősebb az indirekt negatív inotróp hatás, ami főleg a nagyobb koncentrációknál figyelhető meg (11. ábra). Emellett a BGP-15 indirekt negatív inotróp hatása közepes és nagyobb koncentrációk esetén kifejezettebb volt azokon a mintákon, melyek isoproterenolra is erőteljesebb választ adtak. Ezzel ellentétben a propranolol esetén nem volt szignifikáns különbség az isoproterenolra adott válaszok alapján kialakított két csoport között (egy ilyen tendencia azonban megfigyelhető) (12. ábra).



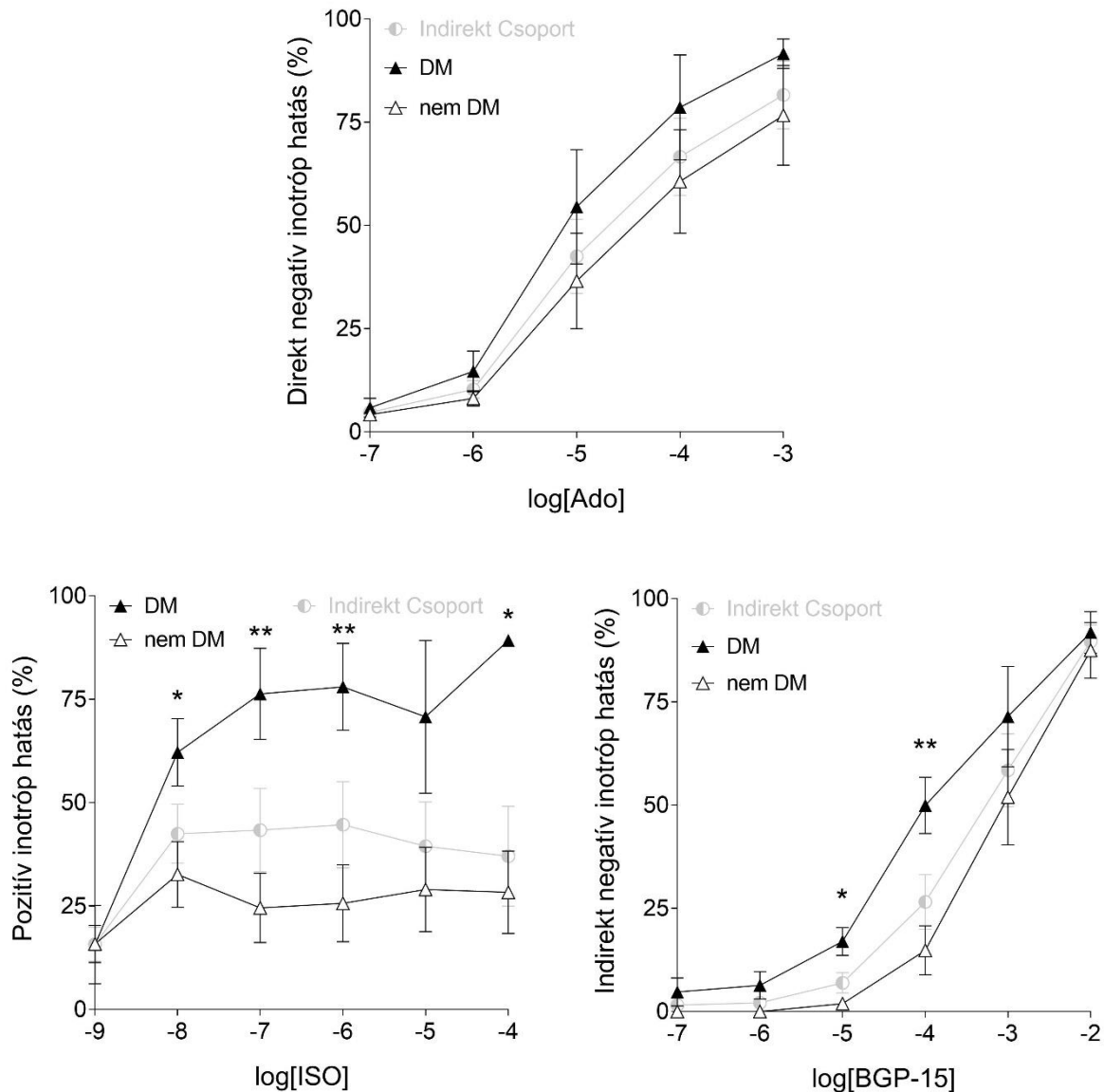
**11. ábra: A BGP-15 (fent és balra) és a pranolol (PROP, fent és jobbra) hatása a humán jobb pitvari mintákra ISO előstimulációval (Indirekt csoport) vagy anélkül (Direkt csoport). Az X tengely az adott vegyület koncentrációját logaritmusban adja meg, az Y tengely pedig a kontrakciós erő százalékos csökkenését). A jelölések a csoportok átlagértékeit reprezentálják ( $\pm$ SEM). A csillagok az egyes csoportok válasza közötti szignifikáns eltéréseket mutatják (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). SEM: standard error of the mean. (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)**



**12. ábra: A BGP-15 (balra) és a propranolol (jobbra) hatása a humán jobb pitvari mintákra ISO prestimulációt követően (Indirekt csoport).** A mintákat az ISO-ra adott válasz alapján csoportosítottuk (Erős és Gyenge alcsoport). Az X tengely az adott vegyület koncentrációjának logaritmusát adja meg, az Y tengely pedig a kontrakciós erő százalékos csökkenését. A jelölések az egyes alcsoportok átlagértékeit mutatják ( $\pm$ SEM). A csillagok a két alcsoport közötti szignifikáns eltéréseket jelölik (\*:  $p < 0.05$ ). SEM: átlagtól való átlagos eltérés; (Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)

A diabétesz mellitus BGP-15-re gyakorolt hatásának megismeréséhez kettébontottuk az indirekt csoport adenozin, ISO és BGP-15 görbéit a betegek anamnézisében szereplő diabéteszes állapot szerint. Az eredmények nagymértékben egybevágtak a korábbi megfigyeléseinkkel, mely alapján a Gyenge és Erős alcsoportot létrehoztunk. Az ISO és a BGP-15 szignifikánsan nagyobb hatást fejtett ki diabéteszes minták esetén összehasonlítva a nem diabéteszes mintákkal (12. ábra). Ennek oka minden jel szerint a nagy átfedés az indirekt csoport Erős alcsoportja és a diabéteszes csoport között. Az indirekt csoport 12 mintájából 7 adott erős választ az isoproterenolra, ebből a 7 erős választ adóból pedig 4 anamnézisében szerepelt a diabétesz. Ezzel ellentétben az ISO-ra gyenge választ adó csoport 5 mintájából egyik sem bizonyult diabéteszesnek. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a diabétesz mellitus az egyik fő (ha nem a legfőbb) oka a minták emelkedett ISO érzékenységének.

Sajnálatos módon az alacsony mintaszám nem teszi lehetővé annak differenciálást, hogy az 1. vagy a 2. típusú diabétesz mellitus (esetleg mindkettő) felelős-e a leírt jelenségért. Ugyanakkor az általunk felhasznált mintákban a 2. típusú diabétesz mellitus túlsúlyát tapasztalhatjuk: 7/9/22 (2. típusú diabétesz mellitus/minden diabéteszes beteg/minden beteg; a direkt és az indirekt csoportokban összesen), illetve 3/4/12 (csak az indirekt csoport esetén).



**13. ábra:** Az adenozin (Ado; fent), az isoproterenol (ISO; balra) és a BGP-15 (jobbra) hatása a humán jobb pitvari mintákra az Indirekt csoportban az ismert (mindkét típusú) diabétesz mellitus megléte (DM) vagy hiánya (nem DM) alapján való dichotomizálást követően. Míg az adenozin hatása direkt, a BGP-15 hatása indirekt (vagyis előzetes ISO prestimulációt kapott a minta). Az X tengely az adott vegyület koncentrációjának logaritmusát adja meg, az Y tengely pedig a kontrakciós erő százalékos csökkenését (Ado, BGP-15), illetve emelkedését (ISO). A jelölések az egyes alcsoportok átlagértékeit mutatják ( $\pm$ SEM). A csillagok a diabéteszes (DM) és nem diabéteszes (nem DM) adathalmazok közötti szignifikáns eltéréseket jelölik (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). SEM: standard error of the mean (*Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével*)

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

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

± 15,4), akiknek a pitvarmintái az ISO kezelésre nem adtak szokatlan választ, alkották az indirekt csoportot.

A fontosabb betegségek és gyógyszerek kapcsolatát a nyugalmi kontrakciós erővel, valamint az isoproterenolra adott válasszal a 2. táblázat foglalja össze.

Mindegyik mintaadónk több súlyos betegségben is szenvedett és számos gyógyszert szedett. Ezen tényezők közül a nitrátok (NO donorok) és a trimetazidin gyakoroltak jótékony hatást a minták kontrakciós erejére. A diabétesz mellitus és a hipertónia emelték, a protonpumpa gátlók viszont csökkentették az ISO-ra adott választ. Ezek közül egyik összefüggés sem bizonyult szignifikánsnak (2. táblázat).

	<b>Kontrakció ereje</b> (Direkt + Indirekt; n=22)		p	<b>ISO-ra adott válasz</b> (Indirekt; n=12)		p
	Kis (n=13) %	Nagy (n=9) %		Gyenge (n=5) %	Erős (n=7) %	
Nem (nő)	15,4	22,2	>0,99	0	14,3	>0,99
<b>Betegségek</b>						
DM	46,2	33,3	0,67	0	57,1	0,08
Hiperlipidémia	46,2	44,4	>0,99	40	57,1	>0,99
Iszkémia	84,6	77,8	>0,99	40	85,7	0,22
Hipertónia	69,2	77,8	>0,99	20	85,7	0,07
Szívelégtelenség	46,2	33,3	0,67	20	71,4	0,24
Billentyűprobléma	46,2	33,3	0,67	20	57,1	0,29
<b>Gyógyszerek</b>						
Trombocitagátlók	76,9	66,7	0,66	60	42,9	>0,99
Antikoagulánsok	38,5	33,3	>0,99	42,9	14,3	0,56
β-blokkolók	84,6	100	0,49	100	71,4	0,47
ACE-gátlók	61,5	88,9	0,33	60	71,4	>0,99
Ca <sup>2+</sup> csatorna blokk.	15,4	22,2	>0,99	20	14,3	>0,99
NO donorok	15,4	44,4	0,18	0	14,3	>0,99
Diuretikumok	46,2	66,7	0,41	40	57,1	>0,99
Trimetazidin	15,4	44,4	0,18	0	28,6	0,47
Statinok	76,9	66,7	0,66	40	57,1	>0,99
Inzulin	15,4	11,1	>0,99	0	28,6	0,47
Orális antidiab.	30,8	22,2	>0,99	28,6	0	0,47
PP gátlók	69,2	44,4	0,38	100	57,1	0,2
Kálium	23,1	22,2	>0,99	20	28,6	>0,99
Benzodiazepinek	15,4	22,2	>0,99	20	14,3	>0,99
Allopurinol	7,7	22,2	0,54	0	14,3	>0,99

**2. táblázat: A mintát adó betegek nemének, betegségeinek, alkalmazott gyógyszereinek kapcsolata a pitvari minták kontrakciós erejével illetve az ISO-ra adott válaszával.** Kis: kis kontrakciós erő; Nagy: nagy kontrakciós erő; Gyenge: gyenge pozitív inotróp válasz isoproterenolra; Erős: erős pozitív inotróp válasz isoproterenolra; Direkt: Direkt csoport; Indirekt: Indirekt csoport; DM: Diabétesz mellitus (mindkét típus); Iszkémia: krónikus iszkémiás szívbetegség, angina pectoris, miokardiális infarktus (ST elevációval vagy anélkül), iszkémiás kardiomiopátia; Szívelégtelenség: kardiális dekompenzáció, pangásos szívelégtelenség, dilatatív kardiomiopátia; ACE blokkolók: angiotenzin-konvertáló enzim blokkolók; Ca<sup>2+</sup> csatorna blokk.: az L típusú kalcium csatorna blokkolói; NO donorok: a szervezet számára nitrogén-monoxidot biztosító vegyületek (pl. nitritek, nitrátok); Orális antidiab.: orális antidiabetikumok; PP gátlók: Protonpumpa gátlók. *(Saját eredmények, G.R. és E.T. segítségével)*

## 5.2. Második kísérleti elrendezés – BGP-15-kezelt nyulak vizsgálata

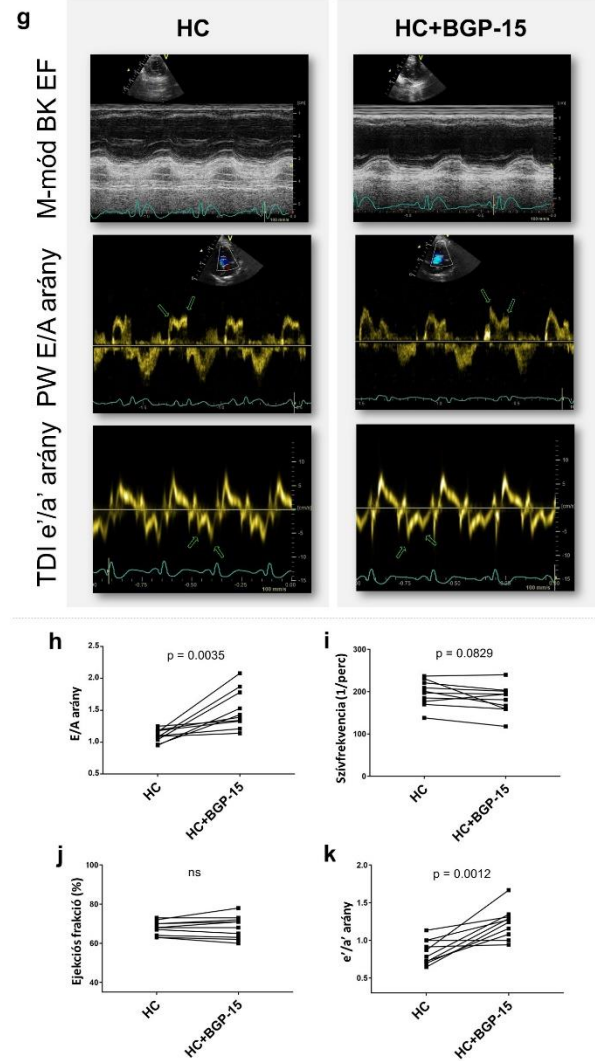
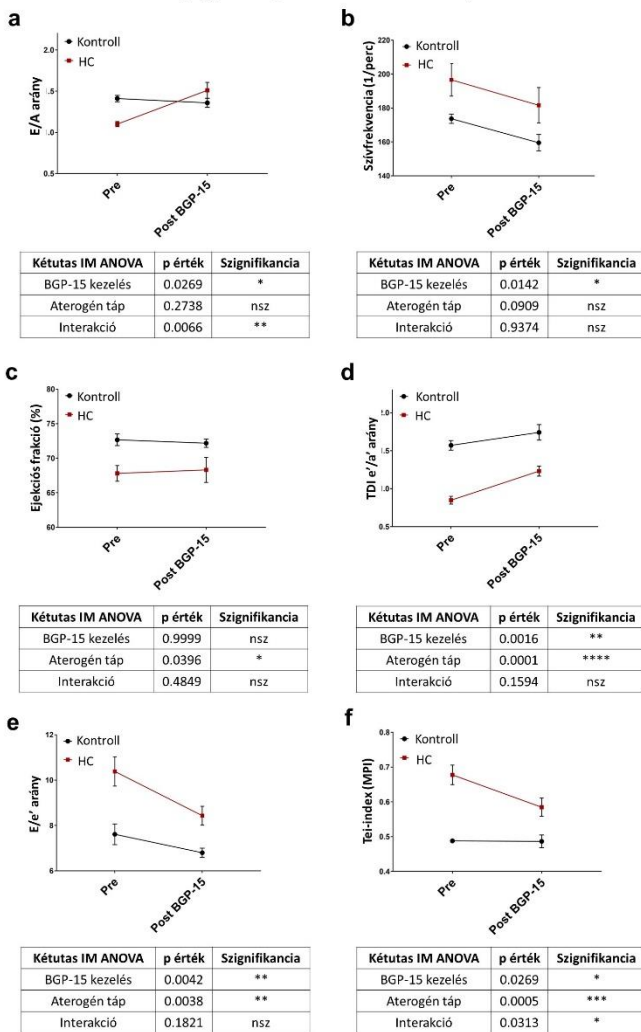
### 5.2.1. Diasztolés funkció

Az egyszeri, i.v. BGP-15 dózis echokardiográfiás hatásainak vizsgálatához 16 hétig aterogén tápon tartott, illetve az azonos korú kontroll állatokat vizsgáltuk. Az kiindulási (gyógyszermentes) értékeket mind a két csoport esetén két utas, ismételt méréses ANOVA teszttel hasonlítottuk össze a BGP-15 beadását követően kapott értékekkel (6. ábra). Ahogyan várható volt, a két csoport értékei eltérést mutattak (14. ábra). Az E/A és e'/a' arányokban csökkenést tapasztaltunk a 16 hetes aterogén kezelés hatására. Az E/e' arány és a Tei-index értékei emelkedtek a HC csoportban a kontrollhoz képest, ugyanakkor az ejekciós frakció csökkenést mutatott a II. protokoll és a korábbi tapasztalatainkkal összhangban [222]. Az ejekciós frakció változatlan maradt a BGP-15 injekciót követően. Ugyanakkor a BGP-15 szignifikánsan csökkentette a szívfrekvenciát ( $p=0,0142$ ), illetve HC nyulak esetén szignifikánsan növelte az E/A arányt ( $p=0,0008$ ) a kiindulási értékekhez képest. Mivel a transzmitrális E/A arány függ a szívfrekvenciától, a diasztolés funkciót több standard paraméter segítségével vizsgáltuk. Szöveti Doppler e' hullám sebessége és az e'/a' aránya szignifikánsan megnövekedett a BGP-15 beadását követően mind a két csoport esetén, de a változások még erőteljesebbek voltak a HC állatoknál (e' esetén  $p=0,0004$ ; e'/a' esetén  $p=0,0012$ ). Az E/e' aránya (mely a bal kamra telődés alatti nyomását jellemzi) csökkent a BGP-15 bolust követően mindkét csoportban, de nagyobb eltérés mutatkozott ebben az esetben is a HC állatok kezdeti és végpont értékei között ( $p=0,003$ ). A Tei-index jelentősen lecsökkent a gyógyszerbeadást követően ( $p=0,028$ ). Noha a HC csoport echokardiográfiás paramétereit a BGP-15 injekció jelentősen befolyásolta, azonban a kontroll állatok értékei közel változatlanok maradtak.

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

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

## I. Protokoll (egyszeri, i.v. bolus BGP-15)



**14. ábra:** Az egyszeri i.v. bolus BGP-15 kezelés hatása az echokardiográfiai paraméterekre kontroll és HC csoport esetén. Az a-f panelek a két utas ismételt mérés ANOVA analízis eredményét mutatják, interakciós faktorokkal.

(a) A diagram a transzmitrális E/A arányt mutatja a BGP-15 beadása előtt (Pre) és után (Post-BGP-15) a két csoport esetén.

(b) A szívfrequencia változásai egyes csoportok esetén

(c) A diagram az ejekciós frakció változásait mutatja

(d) Szöveti Doppler (TDI) e'/a' arányának diagramja

(e) E/e' aránya (bal kamra telődési nyomásviszonyainak mérőszáma)

(f) Kalkulált Tei-index az egyes csoportok esetén

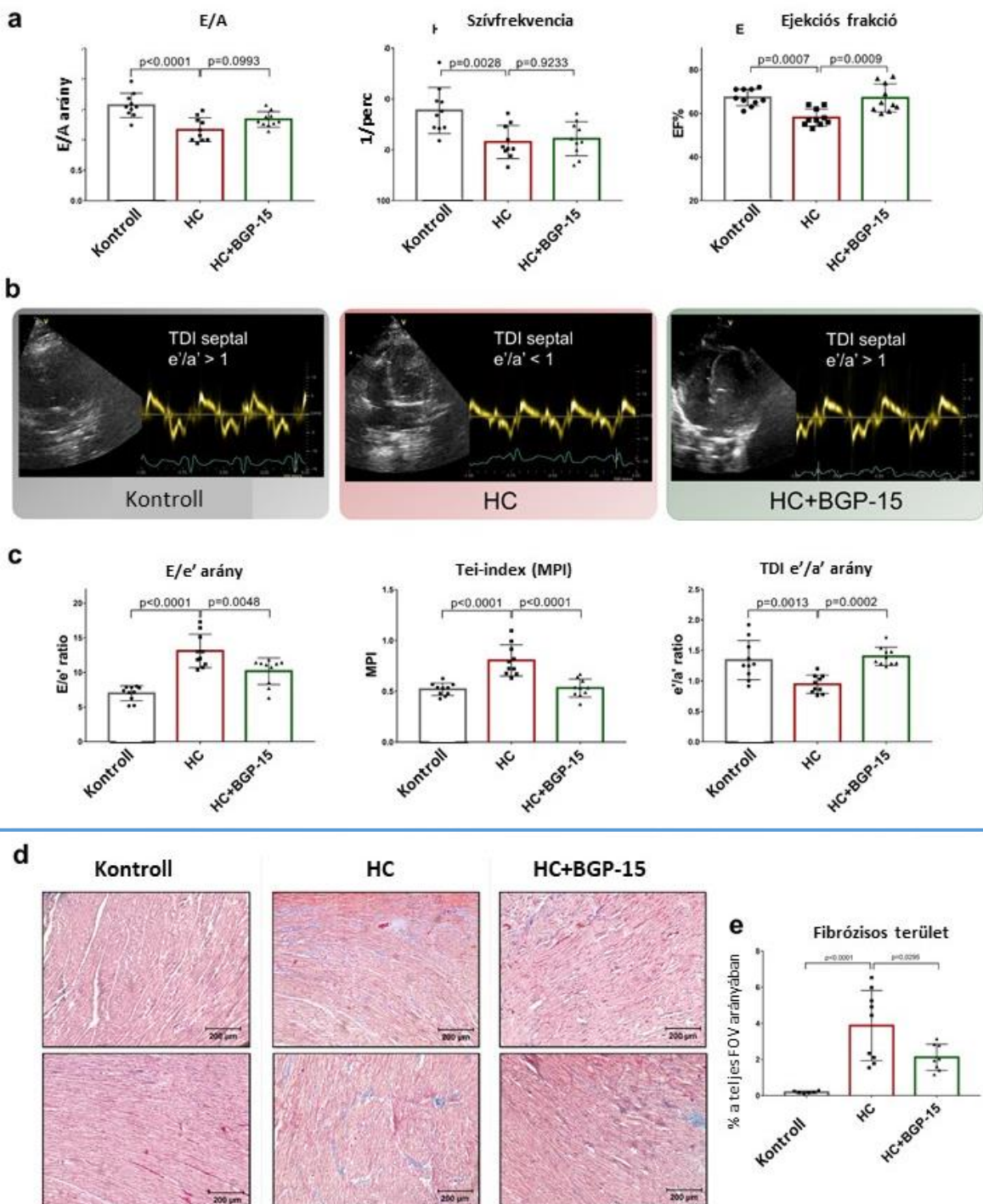
(g) HC állatok echokardiográfiai felvételei M-módban (hosszanti paraszternális metszet), transzmitrális pulsed wave (PW) Doppler (csúcsi, négy üregi nézet) és szöveti Doppler (TDI, csúcsi, négy üregi nézet) BGP-15 beadása előtt és után. A zöld nyilak a pulsed Doppler (PW) transzmitrális E,A és Doppler (TDI) szeptális e' és a' hullámokat mutatják.

(h)-(k) A diagramok a HC állatok BGP-15 kezelés beadása előtti és utáni értékeket hasonlítják össze E/A arány, szívfrequencia, ejekciós frakció és szöveti e'/a' arány esetén. Az egyszeri BGP-15 kezelés szignifikánsan növelte az E/A arányt és e'/a' arányt, valamint csökkentette az E/e' arányt Tei-indexet és szívfrequenciát. (Saját eredmények, J.B. és P.D. segítségével)

## Morfometria

A hosszú távú kezelést követően nem találtunk különbséget a morfometriás paraméterek tekintetében. A HC és HC+BGP-15 csoport állatainak súlygyarapodása az aterogén táppal magyarázható. Noha a HC+BGP-15 csoportban a szív tömege növekedett, a bal kamra mérete teljes szívhez viszonyítva csökkent. Az echokardiográfiából eredő morfometriás paraméterek,

## II. Protokoll (hosszú távú, per os BGP-15)



### **15. ábra: Hosszú távú BGP-15 kezelés hatásai az echokardiográfiás paraméterekre (II. Protokoll).**

#### **Echokardiográfia:**

- (a) A diagram a transzmitrális E/A arányt, szívfrekvenciát és ejekciós frakció változásait ábrázolja
- (b) Szöveti Doppler echokardiográfiás felvételek (TDI, csúcsi, négyüregi nézet) a vizsgálat végpontján
- (c) E/e' arány (bal kamra telődési nyomásviszonyainak mérőszáma), Tei-index és szöveti Doppler e'/a' arány diagramja

#### **Szövettan:**

- (d) Fibrózisos területek (kékkel) egyes kezelési csoportok esetén, Masson Trichoma festéssel
- (e) Fibrózisos terület nagysága (%)

Minden diagram esetén egy utas ANOVA tesztet, Tukey poszt-tesztet alkalmaztunk. SEM: standard error of the mean

*(Saját eredmények, J.B és P.D. segítségével)*

mint a bal kamrai szívizomtömeg index (left ventricle mass index, LVMI), bal kamrai végdiasztolés volumenindex (left ventricle end-diastolic volume index, LVEDVi) és relatív falvastagság (relative wall thickness, RWT%) között csupán tendencia látható a HC és a HC+BGP-15 csoportok között. A nedves-száraz szövetek aránya nem különbözött az egyes csoportok esetén. A Masson Trichome festési eljárás enyhe fibrotikus átrendeződést mutatott mind a HC mind a HC+BGP-15 csoportokban, ugyanakkor a fibrózis mértéke (mely a fibrózisos terület és a teljes vizsgálati mező százalékos aránya) enyhe csökkenést mutatott a BGP-15 kezelés hatására (15. ábra D-E)

#### 5.2.2. Szérum lipid paraméterek

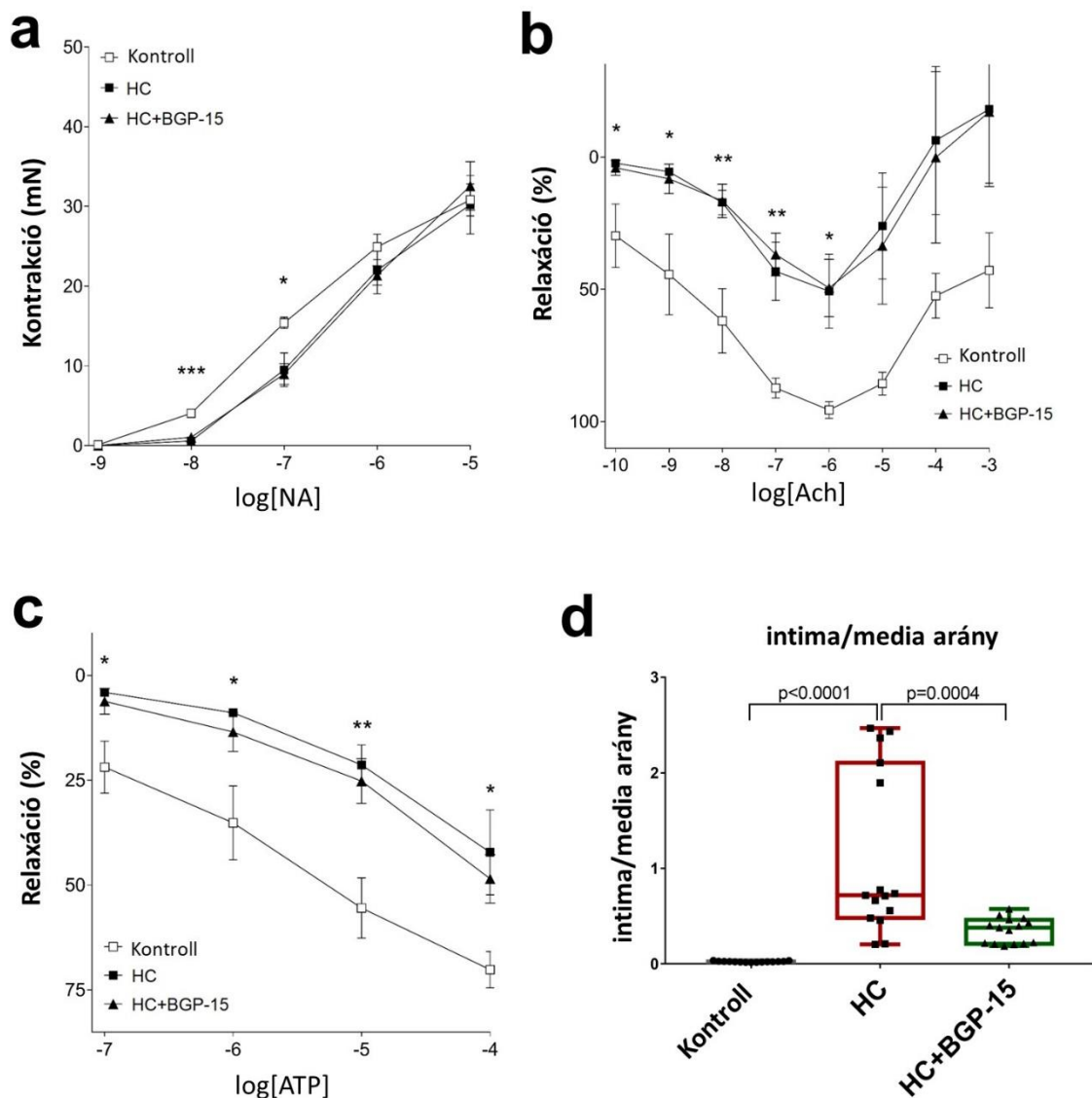
A II. protokollban 16 héten át alkalmazott aterogén táp következményeként hiperkoleszterinémia és diszlipidémia alakult ki. Emelkedett az összkoleszterin, LDL, HDL, ApoA és ApoB szintek mind a HC mind a HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollhoz képest. A BGP-15 kezelés nem tudta szignifikánsan csökkenteni a szérum lipid paramétereket, májenzim értékeket vagy a CK és CK-MB szinteket. Az oszteokalcin, mely egy kevésbé ismert, az ateroszklerózissal és koronária megbetegedésekkel negatívan korreláló marker [223, 224], szintén csökkenést mutatott a HC és HC+BGP-15 csoportokban a kontroll csoporttal szemben.

#### 5.2.3. Endotélium-függő vazorelaxáció

A II. protokoll során vizsgált izolált aortagyűrűk noradrenalin E/c görbéi tekintetében szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és a HC csoportok között 10 és 100 nmol/l koncentrációk esetén. A BGP-15 kezelés nem volt hatással az aterogén táp hatására

megváltozott noradrenalin érzékenységre (16. A ábra). Az Ach minden csoport esetén kezdetben vazorelaxációt váltott ki ( $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ ), nagyobb koncentrációknál viszont már vazokonstriktiót tapasztaltunk ( $> 1 \mu\text{mol/l}$ ). Az aterogén táppal kezelt csoport acetilkolinnal szembeni relaxációs készsége szignifikánsan elmaradt a kontroll csoportéhoz képest. A kialakult endotél diszfunkción a BGP-15 kezelés nem tudott javítani (16. B ábra). Az ATP mind a három csoport esetén vazorelaxációt okozott, ami a kontroll csoport esetén volt a legerőteljesebb. A BGP-15 az Ach-hoz hasonlóan ATP esetén sem enyhítette az aterogén táp endotél-funkcióra kifejtett károsító hatását (16. C ábra).

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



**16. ábra:** A noradrenalin (a), acetilkolin (b) és ATP (c) hatása izolált aorta thoracicára kontroll, HC és HC+BGP-15 kezeléseknél. Az X tengely az adott vegyület egyes koncentrációinak logaritmusát mutatja, az Y tengely a nyugalmi érték felőli kontrakciós erő (NA esetén), illetve a relaxáció mértékét (Ach és ATP esetén). Az szimbólumok a csoportok átlagértékeit jelölik  $\pm$ SEM. A csillagok a Kontroll és HC csoportok közötti különbségeket mutatják (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ). A HC és HC+BGP-15 között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést.

(d) A diagram az intima/media arányt mutatja

(*ex vivo* érgyűrű preparátum vizsgálata saját munka G.R segítségével, ateroszklerotikus plakkvizsgálat B.M. munkája)

#### 5.2.4. cGMP szint

Az egyes csoportok esetén speciális assay segítségével határoztuk meg a cGMP szinteket (n=4/csoport). A kontroll és HC állatok cGMP szintje nem különbözött jelentősen (10,49±1,584 vs. 12,94±2,301 pmol/mg), ugyanakkor a BGP-15 csoport állatai esetén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk (33,89±5,271 pmol/mg) a HC csoport állataival összevetve (p=0,0052, 17. B ábra).

#### 5.2.5. In vitro PDE1 gátlás

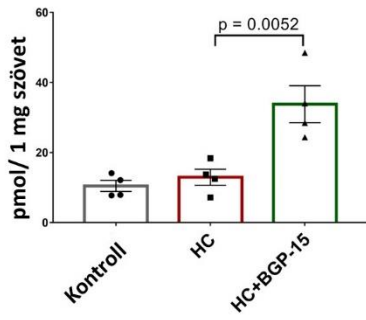
A BGP-15 enzimgátló képességének felmérésére foszfodiészteráz aktivitási vizsgálatot végeztünk. Gátlás nélkül (kontroll) 20 mU PDE enzim 2 nmol 5'GMP-t generált 200 µM cGMP-ből 37 °C-on 60 perc alatt. Egy nem specifikus PDE-inhibitor, az IBMX (3-izobutil-1-metil-xantin; 40 µM) szignifikánsan, 67%-ra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

#### 5.2.6. PKG-tengely

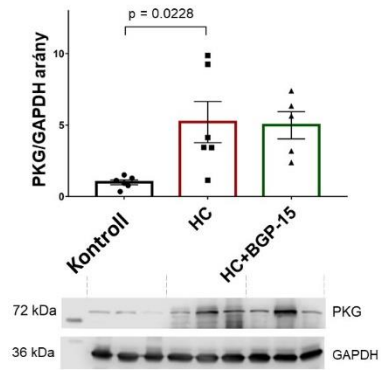
Western blot analízis segítségével derült fény a PKG útvonal sérülésére HC állatok bal kamrai miokardiumában. A hosszú távú BGP-15 fokozta a cGMP-PKG útvonal egyes kulcsmediátorainak expresszióját. A PKG expresszió szignifikánsan emelkedett mind HC, mind HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollhoz képest (p=0,0228, 17. B. ábra). A cGMP/PKG arányt a kontroll csoport szintjére normalizálva (100%), HC csoport esetén a kontrollhoz képest jelentős csökkenést (n=4, p=0,0052), míg HC+BGP-15 csoport esetén a HC állatokhoz viszonyítva emelkedést (p=0,0117, 17. C ábra) figyeltünk meg. A p-(Ser239)-VASP/VASP (PKG enzimaktivitás jelzője) ugyanezt a mintát mutatta kontroll vs. HC (p=0,0471), illetve a HC+BGP-15 vs. HC csoportok esetén (p=0,0173, 17. D ábra). Noha a SERCA inhibitor foszfolambán (PLB) szignifikáns csökkenést mutatott a HC+ BGP-15 csoportban a HC állatokkal összehasonlítva (p=0,0284, 18. C ábra), a SERCA vagy a PLB/SERCA arány nem mutatott különbséget a két csoport között (18. E ábra). Ezzel ellentétben, a Ser16 aminosavon foszforilált PLB (az összfoszfolambán szinthez viszonyítva) szignifikáns emelkedést mutatott a HC+BGP-15 csoportokban a HC csoporthoz képest (p=0,0274, 18. D ábra). A PDE9A szintje emelkedett mind a HC, mind a HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollal összevetve (p=0,0283 és p=0,0035, 18. B ábra). Ugyanakkor a

PDE5 expressziója (mely ugyancsak egy kardiális cGMP-specifikus foszfodiészteráz) emelkedett a HC ( $p=0,056$  vs. kontroll), de a HC-hoz viszonyítva csökkent a HC+BGP-15 csoportok esetén ( $p=0,025$ , 18. A ábra). A Hsp72 szintje nem mutatott jelentős különbséget az egyes kezelések esetén. Minden analízis esetén a sávokat GAPDH-ra mint háztartási fehérjére normalizáltuk, a jelintenzitást a kontrollhoz viszonyított százalékos értékben adtuk meg (melyet 100%-nak tekintettünk).

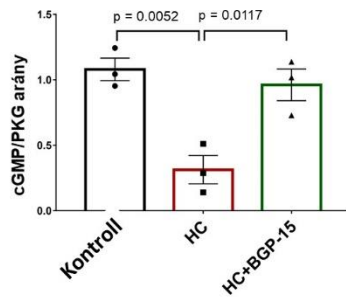
**a** Miokardiális cGMP szint



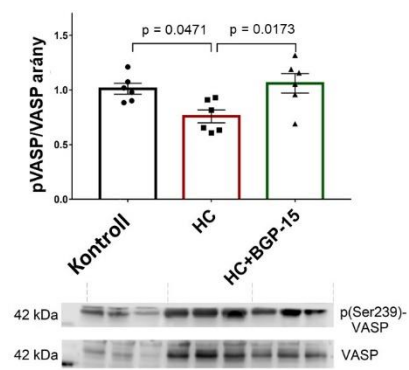
**b** PKG expresszió



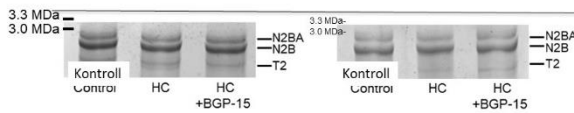
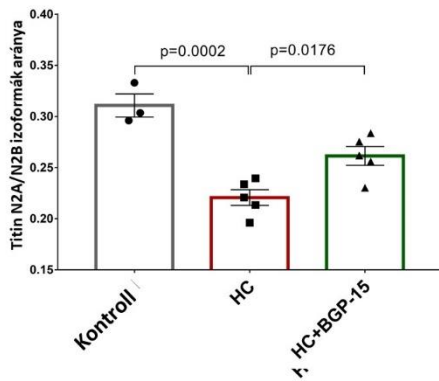
**c** cGMP/PKG arány



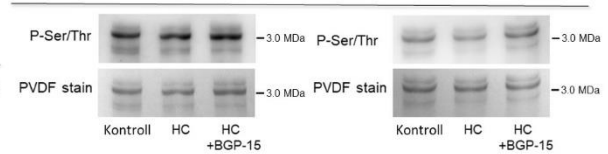
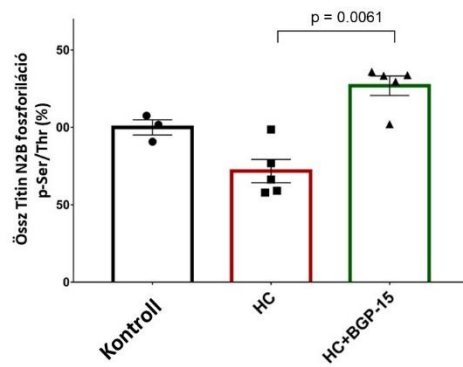
**d** pVASP/VASP arány



**e** Titin N2BA/N2B arány



**f** Titin N2-Bus foszforiláció



### 17. ábra:

(a) A miokardium cGMP szintjének változása egyes kezelések hatására. BGP-15 kezelés esetén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kezeletlen HC csoporttal összehasonlítva.

(b) Miokardiális minták protein kináz G expressziója (GAPDH-ra normalizálva). Fokozott PKG expressziót tapasztaltunk mind a HC mind a HC+BGP-15 csoportok esetén a kontrollhoz képest.

(c) A diagram a cGMP/PKG arányt mutatja az egyes kezelések esetén. Az arány csökkent HC kezelt állatokban a kontrollhoz képest, ugyanakkor jelentős emelkedést mutatott BGP-15 kezelés hatására HC csoporthoz viszonyítva.

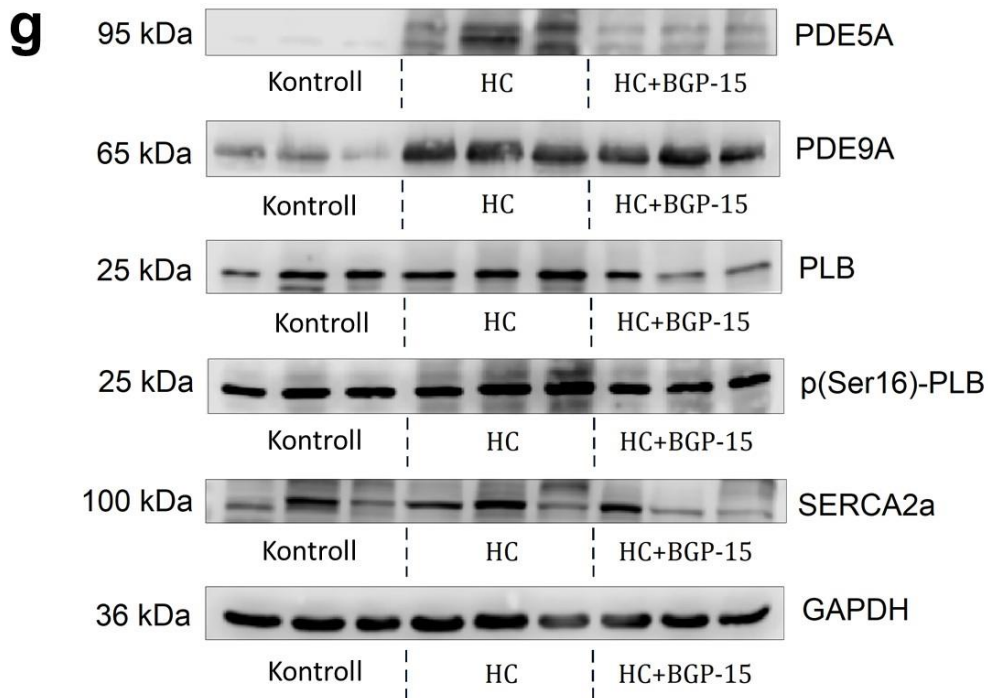
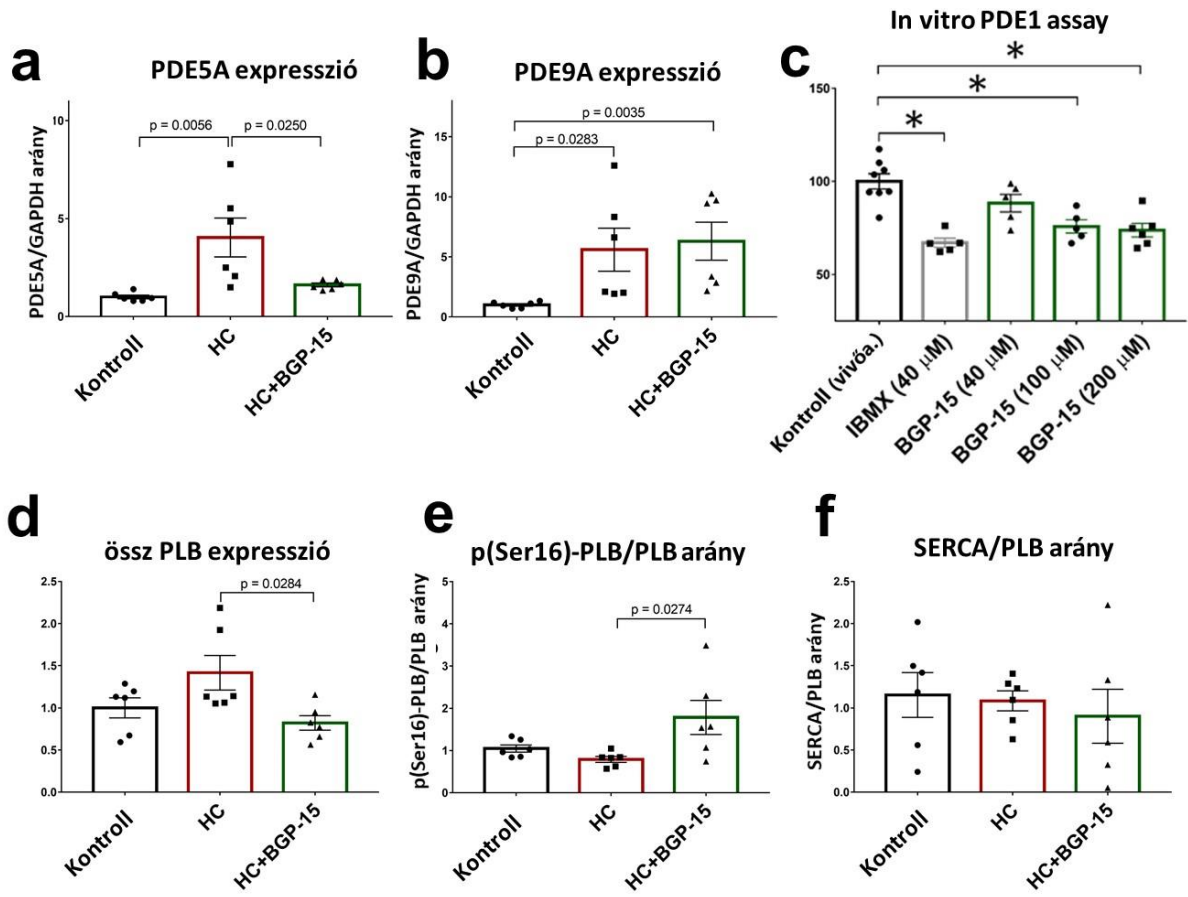
(d) Foszfo(Ser239)-VASP és VASP aránya (GAPDH-ra normalizálva). Az arány HC csoport esetén csökkenést mutatott, ám BGP-15 hatására emelkedett. A cGMP/PKG arányhoz hasonlóan itt ez is a PKG aktivitás fokozódását mutatja a BGP-15 kezelt csoport esetén.

(e) Titin N2A/N2B izoformák aránya jelentősen csökkent HC kezelt állatokban, ám növekedett HC+BGP-15 csoportban. Alatta reprezentatív Western blot felvételek.

(f) A titin N2-Bus foszforiláció (szerin és treonin pontokon) emelkedett BGP-15 kezelés hatására HC csoporttal összehasonlítva.

A titin izoforma analízis során kiderült, hogy a HC kezelés hatására emelkedett a merevebb N2B titin izoforma aránya a kontroll állatokhoz viszonyítva ( $p=0,0002$ ), mely ugyanakkor csökkent BGP-15 kezelés esetén ( $p=0,0159$  vs. HC). Enyhe csökkenés volt megfigyelhető a HC csoport titin N2-bus foszforilációjában, ám a PKG-függő össztitin N2-bus foszforilációban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk HC+BGP-15 csoport esetén ( $p=0,0061$  vs. HC), összhangban a miokardiális cGMP szintek és protein-kináz G aktivitással ( $p$ -VAPS/VAPS arány).

*(Western blot eredmények B.M. munkája)*



### 18. ábra:

- (a) A foszfodiészteráz 5A (PDE5A) expressziója miokardiális szövetben. Az expresszió emelkedett HC állatok esetén, ám csökkenést mutatott BGP-15 kezelt állatok bal kamrai mintájában.
- (b) A foszfodiészteráz 9A (PDE9A) expressziója miokardiális szövetben. Az expresszió mind HC mind HC+BGP-15 csoportokban emelkedett a Kontrollhoz képest.
- (c) A BGP-15 in vitro gátolja a PDE1 enzimet. Gátlás nélkül 20 mU PDE1 enzim 200  $\mu$ M cGMP-ből 2 nmol 5'GMP-t eredményez 37 °C 60 perc időtartam alatt. A nem specifikus PDE gátló (IBMX 40  $\mu$ M, n=5) csökkentette a PDE aktivitást. A BGP-15 dózisfüggő módon szintén gátolta a PDE aktivitást, mely a kontrollhoz képest 100  $\mu$ M (n=5) és 200  $\mu$ M (n=6) koncentrációk esetén szignifikánsnak mutatkozott.
- (d) Az össz foszfolambán (PLB) expressziója miokardiális szövetben. Az expresszió csökkenését tapasztaltuk BGP-15 kezelt csoportban a HC-hoz képest.
- (e) Fosfo(Ser16)-foszfolambán és össz foszfolambán aránya. A PLB foszforilációja jelentősen emelkedett a HC+BGP-15 csoportban a HC-hoz viszonyítva.
- (f) Szarko/endoplazmatikus retikulum Ca-ATP-áz 2a (SERCA2a) foszfolambánhoz (PLB) viszonyított aránya. Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között.
- (g) A vizsgált fehérjékből készült reprezentatív Western blotok nyúl bal kamrai mintákból. A fehérjeexpressziót GAPDH-ra normalizáltuk.

A csillagok a szignifikáns eltéréseket jelölik: \*:p<0,05; \*\*:p<0,01. SEM: standard error of the mean.

(P.D., J.B. és B.M. munkája)

## 6. Megbeszélés

A metabolikus szindróma világszinten egyre nagyobb teret hódít, a kapcsolódó 2-es típusú diabétesz és kardiovaszkuláris megbetegedések prevalenciája folyamatos növekedést mutat [1]. Genetikai faktorok mellett a hajlamosító tényezők között szerepel az elhízás, mozgásszegény életmód, helytelen táplálkozás, dohányzás, túlzott alkoholfogyasztás [2, 3, 225, 226] [227]. A kialakuló kardiovaszkuláris megbetegedések korai stádiumában az életmódváltás elegendő lehet, súlyosabb állapotok esetén azonban elkerülhetetlen a gyógyszeres beavatkozás. Hangsúlyozandó ugyanakkor, hogy minden széleskörűen alkalmazott terápiás lehetőség rendelkezik korlátokkal, enyhe vagy egészen súlyos mellékhatásokkal, bizonyos esetekben gyógyszeres interakcióhoz vezethetnek [228, 229]. A terápia eredménytelenségének hátterében sok esetben a rossz beteg compliance áll. Kutatásainkban a BGP-15 gyógyszerjelöltet vizsgáltuk, mely számos kardioprotektív hatással rendelkezik [4, 12, 230, 231], a II. klinikai fázisvizsgálat alapján biztonságosan alkalmazható humán gyógyszerjelölt [232].

A BGP-15 hatását több területen vizsgálták, eredményességét bizonyították, kardiovaszkuláris mechanizmusai azonban a tanulmányok ellenére máig nem teljesen ismertek. Metabolikus paraméterek tekintetében a BGP-15 bizonyos protektív hatásait a Hsp70 vagy Hsp72 hősokkfehérjék expressziójának fokozásán keresztül fejt ki [7-10, 233-236], ám a miokardiumban nincs mérhető Hsp expresszió [4], mely valószínűsíti a kardiovaszkuláris hatások Hsp-független útvonalát. Egyes kutatások a BGP-15 PARP-gátló hatásáról számoltak be, mely a reaktív oxigénradikálok felszabadulásának gátlásával védi a szívet az iszkémiareperfüzió okozta káros hatásoktól [12, 230]. A BGP-15 kezelést követően emelkedett az IGF1R foszforilációja, mely számos kardioprotektív folyamat mediálásához járul hozzá [4]. A leírt mechanizmusokkal összefüggésben a BGP-15 a lipid raftok remodellingjében is részt vesz; a membrán fluiditásának növelésével a membránhoz kapcsolt receptor fehérjék működését segíti [13, 236].

Kutatócsoportunk legújabb eredményei alapján, Goto-Kakizaki patkányokban a BGP-15 segít a diasztolés funkciók megőrzésében a foszfolambán foszforilációjának emelésén keresztül, mely fokozza a SERCA2A (szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz) pumpa aktivitását, így támogatva a relaxációs folyamatokat [14].

Ezen szakirodalmi adatok, valamint saját kutatási ismereteink, eredményeink alapján, előtérbe került a BGP-15 esetleges PDE gátló és/vagy  $\beta$ -blokkoló tulajdonságainak vizsgálata.

Legjobb tudomásunk szerint a jelen értekezésben tárgyalt humán kutatás volt az első, ami a BGP-15 inotróp hatását vizsgálta és hasonlította össze a nem kardioszelektív  $\beta$ -adrenerg antagonisták prototípusával, a szerkezetileg rokon propranolol inotróp hatásával. Az összehasonlítás alapját a két vegyület strukturális hasonlósága adja, melynek alapján feltételeztük, hogy a BGP-15 is rendelkezhet  $\beta$ -blokkoló aktivitással. Ezt a mechanizmust az alkalmazott vizsgálati módszerünkkel sem megerősíteni sem megcáfolni nem áll módunkban, a vizsgálat célja a kontrakciós erőre gyakorolt hatás összehasonlítása volt. Az általunk alkalmazott izolált, ingerelt humán pitvari trabecula modellen a kontraktilitás megbízhatóan, a kronotrópia befolyásoló hatásának kizárásával vizsgálható. Noha a bal kamrai kontraktilitás a szív működés legfontosabb paraméterei közé tartozik, etikai és sebészeti megfontolásokat szem előtt tartva pitvari miokardium vizsgálatára volt lehetőségünk. Az alkalmazott modelltől fakadó limitek ismertetése mellett kihangsúlyoznám annak erősségét is, hiszen a humán minták felbecsülhetetlen értéket képviselnek és maga a mintagyűjtés is nagy körültekintést és kitartást igénylő folyamat. Emellett a pitvari minták vizsgálata több tekintetben is hasznosnak bizonyul. A pitvarok pumpafunkciót javító működése (atrial booster pump function) a diasztolés kamrai telődésnél fontos szerepet tölt be, kiváltképp az idősök között [237, 238]. A pitvarok elégtelen mechanikai aktivitása a szisztolé végén reziduális vér pangásához, ezen keresztül pedig vérrögképződéshez vezethet. Ezzel összefüggésben pitvarfibrilláció során ötszörösére nő a szisztémás tromboembólia és stroke kialakulásának esélye [239].

Kísérleteink alapján kis koncentrációban ( $\leq 10 \mu\text{mol/l}$ ) alkalmazva a BGP-15 negatív inotróp hatása elhanyagolható volt (a direkt és az indirekt minták esetén egyaránt), ugyanakkor a koncentráció növelésével ( $\geq 1 \text{mmol/l}$ ) erőteljessé vált. Noha a BGP-15 és a propranolol negatív inotróp hatásának maximális értéke hasonló volt, a propranolol potensebbnek bizonyult ( $-\log EC_{50} = pEC_{50}$ ).

Felnőtt betegek esetén a BGP-15 inzulinérzékenyítő hatását 2-3 mg/kg/nap dózisban már kifejtette, ami mikromólos mennyiségnek felelhet meg a szervezetben [7, 233, 240, 241]. Ezt a megfigyelést kiegészítve azzal a tapasztalatunkkal, hogy a BGP-15 negatív inotrópia szempontjából gyakorlatilag hatástalan  $10 \mu\text{mol/l}$  koncentrációig, arra következtethetünk, hogy a BGP-15 már kialakuló jótékony metabolikus hatását ebben a koncentrációtartományban még nem kíséri a kontraktilitás számottevő csökkenése (pitvaron, de jó eséllyel a kamrai vonatkozásban sem).

Közepes koncentrációk esetén ( $10 \mu\text{mol/l}$  és  $1 \text{mmol/l}$  között) a BGP-15 indirekt negatív inotróp hatása a pitvar ISO érzékenységétől függött: csak azon a minták esetén fejtett ki a BGP-15

erőteljes negatív inotróp hatás, melyek az ISO-ra erőteljes pozitív inotróp választ adtak (12. ábra). Ezzel ellentétben a propranolol hatása kevésbé függött a pitvarminták  $\beta$ -adrenerg válaszkészségétől, bár az ISO-ra érzékenyebb minták erőteljesebb (bár statisztikailag nem szignifikáns) választ adtak propranololra is (12. ábra). A leírt jelenség a BGP-15 esetében kedvező lehet, hiszen a túlzott szimpatikus tónus alatt álló szív működését visszafoghatja a nyugalmi kontraktilitás érdemi befolyásolása nélkül, így csupán akkor van hatása, amikor éppen szükség van rá a szimpatikus túlsúly miatt. Ez bizonyos hasonlóságot mutat az antiaritmiás szerek (lidokain) negatív kronotóp hatásával, melyek hatékonyan tudják a szívet lassítani tachycardia esetén, bradikardiában viszont hatástalanok (kialakítva ezzel az ún. use-dependent hatást).

Megvizsgáltuk a pitvari minták funkciója (a kontrakciós erő és az ISO-ra adott válasz), valamint a páciensek állapota (nem, betegségek, alkalmazott gyógyszeres terápia) közötti összefüggéseket is. Megjegyzendő, hogy a mintadonorok komorbiditása, polifarmáciája megnehezíti eredményeink interpretálását. Vizsgálatunk szerint az ISO-ra adott válasz kapcsolatban áll a hipertóniával és a diabétesz mellitusszal (2. táblázat). Az ISO-ra erős választ adók többsége a (főként 2-es típusú) diabéteszes betegcsoportból került ki. Érdekes megfigyelés, hogy az ISO válaszkészség fordított összefüggést mutat a pitvari miokardium állapotával. Ezt a következtetést megerősítette, hogy minden vizsgált kóros állapot fokozta az ISO válaszkészséget (2. táblázat).

Következésképpen vizsgálatunkban a funkcionalitás felmérésére az ISO válaszkészség jobb jellemzőnek bizonyult, mint a pitvari minta nyugalmi kontrakciós ereje. Ennek oka az lehet, hogy az alkalmazott modellben a kontrakciós erőt a miokardium viabilitásától független faktorok (pl. a trabecula mérete, alakja) is meghatározták, ami gyengítette a miokardium funkciója és a nyugalmi kontrakciós erő közötti statisztikai kapcsolatot.

A diabéteszes és nem diabéteszes betegek mintáinak viselkedését összehasonlítva az eredmények és az ISO-ra adott válasz alapján végzett összehasonlítás nagymértékű hasonlóságot mutattak. A BGP-15 szignifikánsan nagyobb indirekt negatív inotróp hatást gyakorolt a diabéteszes betegek mintáira a nem diabéteszekéhez képest. Ez a megfigyelés egybevág azon eredményekkel, melyek szerint az inzulin rezisztencia növekedésével (tehát az inzulin hatásának csökkenésével) nő a szív  $\beta$ -adrenerg stimulált állapota [242, 243]. Ez a kapcsolat az inzulin és a  $\beta$ -adrenerg agonisták kölcsönösen egymás ellen dolgozó jelátviteléből származhat, ami hozzájárulhat az új típusú  $\beta$ -blokkolók inzulinrezisztenciát enyhítő hatásához a szívben ([242, 243]).

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

Az echokardiográfiai eredményeink alapján mind az egyszeri bolus, mind a hosszú távú orális BGP-15 kezelés megtartotta a szív diasztolés állapotát. A transzmitrális E/A arány 20 perccel a BGP-15 injekciót követően szignifikánsan megemelkedett, a szívfrekvencia pedig csökkent mind a két esetben. A E/e' arány (a bal kamra telődési nyomásának mutatója) szignifikánsan csökkent a BGP-15 kezelt állatokban. A szöveti e'/a' arány (mely független a szívfrekvenciától) szignifikánsan megemelkedett a BGP-15 injekciót követően, sugallva a BGP-15 direkt miokardiális relaxáló hatását. Hosszú távú hatását vizsgálva (II. protokoll) az állatok ketamin/xilazin altatása elengedhetetlen volt az echokardiográfias vizsgálatok kivitelezéséhez, így a BGP-15 első kísérletes elrendezésben tapasztalt negatív inotróp hatását jelen módszerrel nem tudjuk értékelni. A hosszú távú (16 hetes) BGP-15 kezelés az akuttal (egyszeri bolus) összehangban szintén szignifikánsan javította a diasztolés funkciókat, még a szívfrekvenciától független paraméterek esetén is, sőt a HC csoportban a pitvar megnagyobbodást is képes volt ellensúlyozni.

Noha az ejekciós frakció értékeiben az egyszeri BGP-15 kezelés nem változtatott sem a kontroll, sem a HC kezelt állatokban, hosszú távú kezelés esetén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a BGP-15 kezelt állatokban a HC csoport egyedeivel összehasonlítva, mely feltételezhetően a javuló diasztolés teljesítmény és alacsonyabb szívfrekvencia eredménye lehet, ám e jótékony hatások további vizsgálatokat igényelnek.

Echokardiográfias eredményeink tovább erősítették hipotézisünket, miszerint a rövid vagy középtávú aterogén táppal történő kezelés inkább a diasztolés paramétereket befolyásolja, ugyanakkor a szisztolés teljesítmény nagyrészt változatlan maradt.

Mivel szakirodalmi adatok alapján a diasztolés diszfunkció alapvető molekuláris hátterét a miokardiális szövet PKG szignalizációs útvonalának romlása adja, [198, 244] a BGP-15 diasztolés funkcióra gyakorolt jótékony hatásának feltárásához a cGMP-PKG kaskádot vizsgáltuk. A kardiomiocita hipertófia, intersticiális fibrózis, a miociták merevsége szubcelluláris szinten a PKG útvonalhoz köthetőek. Noha kísérleteink során emelkedett PKG1 (cGKI) enzim expressziót tapasztaltunk a HC állatok miokardiumában (valószínűleg egy

kompenzációs upreguláció eredményeként), a (pVASP/VASP, cGMP/PKG arányokból származó) PKG aktivitás a különböző diasztolés diszfunkció modellek szakirodalmi adataival összhangban szignifikáns károsodást mutatott [198, 245]. Vizsgálatunk egyik fő eredménye, hogy a BGP-15 kezelés emelte a cGMP szintet, ezáltal fokozta a sérült miokardium PKG aktivitását. A HC állatok esetében kimutattuk a károsodott endotél funkciót (endotél-függő vazorelaxációt), melyet a javuló kardiális státusz ellenére nem mérsékelte a BGP-15 kezelés. Szintén nem javította a lipidparamétereket és az ateroszklerózis állapotát, így feltételezhetően nem az érfal NO biohasznosulásának fokozásával fejti ki hatását. Noha jelen tanulmány kereteiben a szívizom emelkedett cGMP szintjét megállapítottunk, a szérum és a vaszkuláris cGMP szinteket nem állt módunkban meghatározni, így lehetséges, hogy a BGP-15 hatása szövetspecifikus, hiszen a cGMP-PKG útvonal eltérő effektor molekulákon hat a vaszkuláris simaizom és a miokardium esetén [246]. A cGMP szintjét egy foszfodiészteráz enzimsalád szabályozza, melyek közül a szívben expresszáldó PDE5A és PDE9A izoformák nagyfokú szelektivitást mutatnak a cGMP iránt a cAMP-vel szemben [247]. Károsodott szívizom PDE1A szintje is jelentősen emelkedik, mely ugyancsak nagyobb affinitást mutat cGMP-re cAMP ellenében [219]. A HC nyulak bal kamrájában emelkedett PDE9A és PDE5A expressziót tapasztaltunk és jöllehet az előbbi a BGP-15 kezelés hatására változatlan maradt, utóbbi szignifikáns csökkenést mutatott. Ezen túlmenően a PDE1 gátlást *in vitro* kolorimetriás PDE kit segítségével is igazoltuk. A hosszú távú BGP-15 kezelés hatására megemelkedett cGMP és PKG aktivitás részben a csökkenő PDE5, esetleg PDE1 expresszió következménye. Ugyanakkor valószínűtlen, hogy ez a folyamat szerepet játszik a BGP-15 akut hatásában, mivel a 20 perces disztribúciós idő nem elegendő ilyen mértékű változásokhoz a protein expresszióban. Noha a BGP-15 sokrétű hatásmechanizmusa továbbra is tele van rejtéllyel, eredményeink rávilágítanak a miofilamentum fehérjék megváltozott foszforilációjának és más PKG célpontok fontosságára a szívizomban.

A PKG szubsztrátok közül Western blot technikával vizsgáltuk a foszfolambán (PLB) expressziót, mely a kardiális relaxáció szabályozásában kulcsszerepet játszik. Kisméretű szabályozó fehérje, mely gátolja a SERCA pumpát, ezzel megnyújtva a miociták relaxációs idejét [207]. A PKG vagy PKA által, Ser16 (vagy PKA által Thr17) pozícióban foszforilált PLB SERCA pumpát gátló hatása megszűnik [209]. A BGP-15 kezelés hatására az össz PLB expresszió csökkent, valamint a Ser16 PLB aránya a PLB-hez viszonyítva megemelkedett. Ezen eredményeink korrelálnak az *in vivo* tapasztalatainkkal, ahol a megnyúlt IVRT a BGP-15 kezelés hatására normalizálódott.

A  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis rendellenességei mellett a diasztolés funkciót szintén befolyásolja a miofilamentum fehérjék és az extracelluláris mátrix változásai [248]. Masson's trichome festéssel fibrotikus átrendeződést mutattunk ki a HC csoport egyedeinek szívmintáiból, melynek mértéke a bal kamrában csökkent a BGP-15-kezelt csoport esetén. Ez összhangban áll a Sapra és munkatársai hipertrófiás BGP-15 kezelt egerek szívmintáiból származó eredményeivel [4].

Mindezek mellett a molekuláris vizsgálatok alapján a BGP-15 kedvezően befolyásolta a titin foszforilációját és izoformáját. Két fő izoformája együtt expresszálódik a sarcomérben: a merevebb N2B és a ruganyosabb N2BA titin, így az alacsony N2BA/N2B arány magasabb passzív tenzióval jár [249]. A titin-okozta merevség szintén megváltoztatható foszforilációval: mind a cAMP-függő PKA mind a cGMP-függő PKG képes a titint foszforilálni N2-Bus formában, fokozva a teljesítményét, ezáltal csökkentve a passzív merevséget [250]. A HC csoport állataiban a titin N2BA/N2B expresszió aránya szignifikánsan eltolódott az N2B irányába, emellett a titin N2-Bus foszforiláció csökkent, következményesen a kardiomiociták passzív merevsége emelkedett. Legjobb tudomásunk szerint a szakirodalomban ez a vizsgálat volt az első, melyben HC nyulakon ki tudtuk mutatni a titin izoformák változását. Kutatásunk egyik fő eredménye, hogy a megtartott funkcionális értékek és a miociták passzív csökkenő merevsége mellett, a BGP-15 kezelt állatokban a titin izoformák összetétele és az N2-Bus foszforiláció helyreállt. Összességében, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a BGP-15 kezelés diasztolés diszfunkciót ellensúlyozó hatása részben magyarázható a megtartott miofilamentum funkcióval, melynek háttérében a titin megnövekedett foszforilációja áll.

Második kísérleti elrendezésünkben tehát sikerült igazolni mind egyszeri intravénás, mind hosszú távú orális kezelés mellett a BGP-15 diasztolés diszfunkciót javító hatását ateroszklerózisos nyúlmodellen, mely hatás a vaszkuláris állapottól függetlennek mutatkozott. Sikerült igazolni a PDE5A expresszió csökkenését hosszú távú kezelés mellett, *in vitro* pedig a PDE1A gátló hatást, valamint a titin izoformák esetén az N2-Bus foszforiláció helyreállítását.

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

## 7. Összefoglalás

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

## 8. Summary

The metabolic syndrome is a serious, potentially life-threatening disease, treating it could be a lifelong process. The currently available therapies are limited, both in active agents, and overall effectiveness. During our research, we focused on BGP 15, a drug candidate already past the second clinical trial phase, which has numerous, already proven beneficial effects. In our first experimental setup, we verified BGP 15's negative inotropic effect on human trabecules we acquired from open heart surgeries. This effect is highly dependent on the previous isoproterenol precontraction (indirect group), it was only independent in the case of higher concentration. Our significant achievement is that the negative inotropic effect of BGP-15 showed connection to the existing diabetical state. The sample donors suffering from diabetes mellitus showed a significantly stronger positive inotropic reaction to isoproterenol, and BGP-15 had a stronger negative inotropic effect on these samples. In the second experimental setup, we used a hypercholesterolemic rabbit model to study the short (single i.v. bolus) and long term (p.o. for 16 weeks) effect of BGP-15 on the cardiac functions. Based on our experiences, BGP 15 improved diastolic functions, while having no effect on the vascular NO release. We validated BGP-15's cardiac effects with functional testing, and to understand the processes in the background, we conducted molecular biological tests. Based on the results, BGP-15 restored the titin isoforms, and increased the ratio of Ser16 phospholambane. It reduced the total phospholambane and increased cGMP level, which through PKG pathway plays an important role in the pathophysiology of heart failure. We proved the blocking effect of BGP-15 on the PEDA5A in vivo and on the PDE1 in vitro. Our studies prove multiple diastolic parameter of the heart failure could be improved by BGP-15, and these effects are expressed stronger on a diabetic heart. Given the seriousness of the metabolic syndrome as a cluster of metabolic abnormalities and the limitations of the available therapies, focusing on BGP-15 in future studies is something worth considering.

## 9. Irodalomjegyzék

### 9.1. A disszertáció elkészítéséhez felhasznált irodalom

1. Rochlani, Y., et al., *Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2017. **11**(8): p. 215-225.
2. Wagh, A. and N.J. Stone, *Treatment of metabolic syndrome*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2004. **2**(2): p. 213-28.
3. Deedwania, P.C. and N. Volkova, *Current Treatment Options for the Metabolic Syndrome*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2005. **7**(1): p. 61-74.
4. Sapra, G., et al., *The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5705.
5. Gehrig, S.M., et al., *Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 394-8.
6. Takahashi, N., et al., *Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10824.
7. Literati-Nagy, Z., et al., *Synergic insulin sensitizing effect of rimonabant and BGP-15 in Zucker-obese rats*. Pathol Oncol Res, 2013. **19**(3): p. 571-5.
8. Xing, B., et al., *Hsp70 plays an important role in high-fat diet induced gestational hyperglycemia in mice*. J Physiol Biochem, 2015. **71**(4): p. 649-58.
9. 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.
10. Chung, J., et al., *HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1739-44.
11. 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.
12. Szabados, E., et al., *BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(8): p. 937-45.
13. Gombos, I., et al., *Membrane-lipid therapy in operation: the HSP co-inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28818.
14. Bombicz, M., et al., *The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy*. Molecules, 2019. **24**(3).
15. Carella, A.M., et al., *Antihypertensive treatment with beta-blockers in the metabolic syndrome: a review*. Curr Diabetes Rev, 2010. **6**(4): p. 215-21.
16. Cornier, M.A., et al., *The metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2008. **29**(7): p. 777-822.
17. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
18. Yadav, D., et al., *Metabolic syndrome criteria and its association with type 2 diabetes and cardiovascular diseases*. Progress in Nutrition, 2020. **22**(2): p. 361-369.
19. Ardern, C.I. and I. Janssen, *Metabolic syndrome and its association with morbidity and mortality*. Appl Physiol Nutr Metab, 2007. **32**(1): p. 33-45.

20. Hunt, K.J., et al., *National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study*. *Circulation*, 2004. **110**(10): p. 1251-7.
21. Anderson, J.L., et al., *Which features of the metabolic syndrome predict the prevalence and clinical outcomes of angiographic coronary artery disease?* *Cardiology*, 2004. **101**(4): p. 185-93.
22. McNeill, A.M., et al., *The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(2): p. 385-90.
23. Girman, C.J., et al., *An exploratory analysis of criteria for the metabolic syndrome and its prediction of long-term cardiovascular outcomes: the Hoorn study*. *Am J Epidemiol*, 2005. **162**(5): p. 438-47.
24. Wu, X.Y., et al., *Association between Lipoprotein (a) Levels and Metabolic Syndrome in a Middle-aged and Elderly Chinese Cohort*. *Biomed Environ Sci*, 2019. **32**(7): p. 477-485.
25. Paredes, S., et al., *Lipoprotein(a) Change After Sleeve Gastrectomy Is Affected by the Presence of Metabolic Syndrome*. *Obes Surg*, 2020. **30**(2): p. 545-552.
26. König, M., et al., *Cohort profile: role of lipoproteins in cardiovascular disease-the LipidCardio study*. *BMJ Open*, 2019. **9**(9): p. e030097.
27. Weiss, R., et al., *Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2362-74.
28. DuBose, K.D., et al., *Prevalence of the metabolic syndrome in elementary school children*. *Acta Paediatr*, 2006. **95**(8): p. 1005-11.
29. Morrison, J.A., et al., *Overweight, fat patterning, and cardiovascular disease risk factors in black and white girls: The National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study*. *J Pediatr*, 1999. **135**(4): p. 458-64.
30. Draper, N., et al., *Association studies between microsatellite markers within the gene encoding human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and body mass index, waist to hip ratio, and glucocorticoid metabolism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(11): p. 4984-90.
31. Heid, I.M., et al., *Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): p. 375-84.
32. Bayoumi, R.A., et al., *Heritability of determinants of the metabolic syndrome among healthy Arabs of the Oman family study*. *Obesity (Silver Spring)*, 2007. **15**(3): p. 551-6.
33. Jiang, H., et al., *Dietary nitrite improves insulin signaling through GLUT4 translocation*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **67**: p. 51-7.
34. Carlström, M., et al., *Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(41): p. 17716-20.
35. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. *Lancet*, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
36. Guo, S., *Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms*. *J Endocrinol*, 2014. **220**(2): p. T1-t23.
37. DeFronzo, R.A. and E. Ferrannini, *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease*. *Diabetes Care*, 1991. **14**(3): p. 173-94.
38. Weyer, C., et al., *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(6): p. 787-94.

39. Karnieli, E. and M. Armoni, *Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(1): p. E38-45.
40. Pacini, G., *The hyperbolic equilibrium between insulin sensitivity and secretion*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16 Suppl 1**: p. S22-7.
41. Stefan, N., et al., *Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans*. Arch Intern Med, 2008. **168**(15): p. 1609-16.
42. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
43. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2735-52.
44. Terauchi, Y., et al., *Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 246-57.
45. Goodarzi, M.O., et al., *Haplotypes in the lipoprotein lipase gene influence fasting insulin and discovery of a new risk haplotype*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 293-6.
46. Wajchenberg, B.L., *beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment*. Endocr Rev, 2007. **28**(2): p. 187-218.
47. LeRoith, D., *Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities*. Am J Med, 2002. **113 Suppl 6A**: p. 3s-11s.
48. Weir, G.C., et al., *Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes*. Diabetes, 2001. **50 Suppl 1**: p. S154-9.
49. Xu, H., et al., *Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
50. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
51. Lastra, G., C.M. Manrique, and M.R. Hayden, *The role of beta-cell dysfunction in the cardiometabolic syndrome*. J Cardiometab Syndr, 2006. **1**(1): p. 41-6.
52. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
53. Kraemer, F.B. and W.J. Shen, *Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis*. J Lipid Res, 2002. **43**(10): p. 1585-94.
54. Schweiger, M., et al., *Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 40236-41.
55. Jocken, J.W., et al., *Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2292-9.
56. Klannemark, M., et al., *The putative role of the hormone-sensitive lipase gene in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus and abdominal obesity*. Diabetologia, 1998. **41**(12): p. 1516-22.
57. Jiang, F., et al., *Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats*. Redox Rep, 2011. **16**(6): p. 223-9.
58. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
59. Sopasakis, V.R., et al., *High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator*. Obes Res, 2004. **12**(3): p. 454-60.

60. Bergman, R.N., et al., *Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk*. Am J Med, 2007. **120**(2 Suppl 1): p. S3-8; discussion S29-32.
61. Gonzalez-Baró, M.R., T.M. Lewin, and R.A. Coleman, *Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1195-9.
62. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 232-40.
63. Lewis, G.F. and G. Steiner, *Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state*. Diabetes Care, 1996. **19**(4): p. 390-3.
64. Miller, M., et al., *APOC3 promoter polymorphisms C-482T and T-455C are associated with the metabolic syndrome*. Arch Med Res, 2007. **38**(4): p. 444-51.
65. Schalch, D.S. and D.M. Kipnis, *Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma nonesterified fatty acids*. J Clin Invest, 1965. **44**(12): p. 2010-20.
66. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 7-18.
67. Bruce, C.R., et al., *Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2004. **47**(1): p. 23-30.
68. Sato, F., et al., *Effects of diet-induced moderate weight reduction on intrahepatic and intramyocellular triglycerides and glucose metabolism in obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 3326-9.
69. Bonora, E., et al., *Hyperinsulinemia and insulin resistance are independently associated with plasma lipids, uric acid and blood pressure in non-diabetic subjects. The GISIR database*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008. **18**(9): p. 624-31.
70. Hanley, A.J., et al., *Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2642-7.
71. Laakso, M., H. Sarlund, and L. Mykkänen, *Essential hypertension and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes*. Eur J Clin Invest, 1989. **19**(6): p. 518-26.
72. Steinberg, H.O., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1172-9.
73. Tooke, J.E. and M.M. Hannemann, *Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome*. J Intern Med, 2000. **247**(4): p. 425-31.
74. Kuroda, S., et al., *Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension*. J Hum Hypertens, 1999. **13**(4): p. 257-62.
75. Egan, B.M., *Insulin resistance and the sympathetic nervous system*. Curr Hypertens Rep, 2003. **5**(3): p. 247-54.
76. Tripathy, D., et al., *Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2882-7.
77. Grekin, R.J., A.P. Vollmer, and R.S. Sider, *Pressor effects of portal venous oleate infusion. A proposed mechanism for obesity hypertension*. Hypertension, 1995. **26**(1): p. 193-8.
78. Reaven, G.M., H. Lithell, and L. Landsberg, *Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system*. N Engl J Med, 1996. **334**(6): p. 374-81.

79. Grassi, G., et al., *Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms*. Hypertension, 2007. **49**(3): p. 535-41.
80. Kim, S., et al., *The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(5): p. 27012.
81. Whaley-Connell, A., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone system intervention in the cardiometabolic syndrome and cardio-renal protection*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2007. **1**(1): p. 27-35.
82. Cooper, S.A., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(4): p. H2009-23.
83. Yiannikouris, F., et al., *Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(2): p. R244-51.
84. Su, W., et al., *Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in type 2 diabetic db/db mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(4): p. H1634-41.
85. Shah, R.V., et al., *Insulin resistance, subclinical left ventricular remodeling, and the obesity paradox: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis)*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(16): p. 1698-706.
86. Keaney, J.F., Jr., et al., *Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(3): p. 434-9.
87. Stapleton, P.A., et al., *Obesity and vascular dysfunction*. Pathophysiology, 2008. **15**(2): p. 79-89.
88. Takata, Y., et al., *Hyperresistinemia is associated with coexistence of hypertension and type 2 diabetes*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 534-9.
89. Bernal-Mizrachi, C., et al., *Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(6): p. 961-8.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. Turkbey, E.B., et al., *The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. JACC Cardiovasc Imaging, 2010. **3**(3): p. 266-74.
94. Sassoon, D.J., et al., *Obesity alters molecular and functional cardiac responses to ischemia/reperfusion and glucagon-like peptide-1 receptor agonism*. Basic Res Cardiol, 2016. **111**(4): p. 43.
95. Dincer, U.D., et al., *Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(1): p. 108-14.
96. 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.
97. Bidasee, K.R., et al., *Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 463-73.

98. Hamdani, N., et al., *Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model*. *Circ Heart Fail*, 2013. **6**(6): p. 1239-49.
99. Hamdani, N., et al., *Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation*. *Circ Res*, 2013. **112**(4): p. 664-74.
100. Berwick, Z.C., G.M. Dick, and J.D. Tune, *Heart of the matter: coronary dysfunction in metabolic syndrome*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(4): p. 848-56.
101. Knudson, J.D., et al., *Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance*. *Microcirculation*, 2007. **14**(4-5): p. 317-38.
102. Di Carli, M.F., et al., *Coronary circulatory function in patients with the metabolic syndrome*. *J Nucl Med*, 2011. **52**(9): p. 1369-77.
103. Singh, A.K. and J.A. Kari, *Metabolic syndrome and chronic kidney disease*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013. **22**(2): p. 198-203.
104. Chantler, P.D., et al., *Cerebral Cortical Microvascular Rarefaction in Metabolic Syndrome is Dependent on Insulin Resistance and Loss of Nitric Oxide Bioavailability*. *Microcirculation*, 2015. **22**(6): p. 435-45.
105. Hodnett, B.L. and R.L. Hester, *Regulation of muscle blood flow in obesity*. *Microcirculation*, 2007. **14**(4-5): p. 273-88.
106. Frisbee, J.C., *Impaired skeletal muscle perfusion in obese Zucker rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(5): p. R1124-34.
107. Alpert, M.A., *Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome*. *Am J Med Sci*, 2001. **321**(4): p. 225-36.
108. Berwick, Z.C., et al., *Contribution of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels to metabolic control of coronary blood flow*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(4): p. 912-9.
109. Borbouse, L., et al., *Metabolic syndrome reduces the contribution of K<sup>+</sup> channels to ischemic coronary vasodilation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(4): p. H1182-9.
110. Borbouse, L., et al., *Contribution of BK(Ca) channels to local metabolic coronary vasodilation: Effects of metabolic syndrome*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(3): p. H966-73.
111. Lopaschuk, G.D., C.D. Folmes, and W.C. Stanley, *Cardiac energy metabolism in obesity*. *Circ Res*, 2007. **101**(4): p. 335-47.
112. Rider, O.J., et al., *Myocardial substrate metabolism in obesity*. *Int J Obes (Lond)*, 2013. **37**(7): p. 972-9.
113. Peterson, L.R., et al., *Sex and type 2 diabetes: obesity-independent effects on left ventricular substrate metabolism and relaxation in humans*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. **20**(4): p. 802-10.
114. Peterson, L.R., et al., *Type 2 diabetes, obesity, and sex difference affect the fate of glucose in the human heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **308**(12): p. H1510-6.
115. McGill, J.B., et al., *Potentiation of abnormalities in myocardial metabolism with the development of diabetes in women with obesity and insulin resistance*. *J Nucl Cardiol*, 2011. **18**(3): p. 421-9; quiz 432-3.
116. Grundy, S.M., *Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(23): p. 2696-8.
117. McGill, H.C., Jr., et al., *Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men*. *Circulation*, 2002. **105**(23): p. 2712-8.

118. Ford, E.S., *Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence*. Diabetes Care, 2005. **28**(7): p. 1769-78.
119. Knudson, J.D., G.M. Dick, and J.D. Tune, *Adipokines and coronary vasomotor dysfunction*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(6): p. 727-36.
120. Payne, G.A., M.C. Kohr, and J.D. Tune, *Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 659-69.
121. Knudson, J.D., et al., *Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H48-56.
122. Zhang, H., et al., *Role of TNF-alpha in vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(3): p. 219-30.
123. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
124. Sperling, L.S., et al., *The CardioMetabolic Health Alliance: Working Toward a New Care Model for the Metabolic Syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(9): p. 1050-67.
125. O'Neill, S. and L. O'Driscoll, *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. Obes Rev, 2015. **16**(1): p. 1-12.
126. Kim, S.H., J.P. Després, and K.K. Koh, *Obesity and cardiovascular disease: friend or foe?* Eur Heart J, 2016. **37**(48): p. 3560-3568.
127. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. Jama, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
128. Sattar, N., et al., *Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies*. Lancet, 2008. **371**(9628): p. 1927-35.
129. Kekäläinen, P., et al., *Hyperinsulinemia cluster predicts the development of type 2 diabetes independently of family history of diabetes*. Diabetes Care, 1999. **22**(1): p. 86-92.
130. Hanson, R.L., et al., *Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3120-7.
131. Lebovitz, H.E., *Type 2 diabetes: an overview*. Clin Chem, 1999. **45**(8 Pt 2): p. 1339-45.
132. Lorenzo, C., et al., *The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study*. Diabetes Care, 2003. **26**(11): p. 3153-9.
133. Ford, E.S., *Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S.* Diabetes Care, 2005. **28**(11): p. 2745-9.
134. Grundy, S.M., *Does the metabolic syndrome exist?* Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1689-92; discussion 1693-6.
135. Ford, E.S., C. Li, and N. Sattar, *Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence*. Diabetes Care, 2008. **31**(9): p. 1898-904.
136. Meigs, J.B., et al., *Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2007. **30**(5): p. 1219-25.
137. Giles, T.D. and G.E. Sander, *Pathophysiologic, diagnostic, and therapeutic aspects of the metabolic syndrome*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2005. **7**(11): p. 669-78.
138. Black, H.R., *Metabolic considerations in the choice of therapy for the patient with hypertension*. Am Heart J, 1991. **121**(2 Pt 2): p. 707-15.
139. Rask Larsen, J., et al., *The pharmacological management of metabolic syndrome*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2018. **11**(4): p. 397-410.

140. Flory, J. and K. Lipska, *Metformin in 2019*. *Jama*, 2019. **321**(19): p. 1926-1927.
141. Weihe, P. and S. Weihrauch-Blüher, *Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Diagnostic Criteria, Therapeutic Options and Perspectives*. *Curr Obes Rep*, 2019. **8**(4): p. 472-479.
142. Elhini, S.H., et al., *Efficacy and safety profile of sitagliptin, vildagliptin, and metformin in newly diagnosed type 2 diabetic subjects*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021. **48**(12): p. 1589-1602.
143. Steen, O. and R.M. Goldenberg, *The Role of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Management of Type 2 Diabetes*. *Can J Diabetes*, 2017. **41**(5): p. 517-523.
144. Emini-Sadiku, M., et al., *The differential influence of glimepiride and glibenclamide on insulin resistance and adiponectin levels in patients with type 2 diabetes*. *Endocr J*, 2019. **66**(10): p. 915-921.
145. 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.
146. Lazzaroni, E., et al., *Anti-diabetic drugs and weight loss in patients with type 2 diabetes*. *Pharmacol Res*, 2021. **171**: p. 105782.
147. Chobanian, A.V., et al., *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. *Hypertension*, 2003. **42**(6): p. 1206-52.
148. Mancia, G., et al., *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. *J Hypertens*, 2007. **25**(6): p. 1105-87.
149. Giordano, M., et al., *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, Ca<sup>2+</sup> channel antagonists, and alpha-adrenergic blockers on glucose and lipid metabolism in NIDDM patients with hypertension*. *Diabetes*, 1995. **44**(6): p. 665-71.
150. Lithell, H.O., *Effect of antihypertensive drugs on insulin, glucose, and lipid metabolism*. *Diabetes Care*, 1991. **14**(3): p. 203-9.
151. Lind, L., et al., *Long-term metabolic effects of antihypertensive drugs*. *Am Heart J*, 1994. **128**(6 Pt 1): p. 1177-83.
152. Lithell, H.O., *Hyperinsulinemia, insulin resistance, and the treatment of hypertension*. *Am J Hypertens*, 1996. **9**(11): p. 150s-154s.
153. Rabkin, S.W., *Mechanisms of action of adrenergic receptor blockers on lipids during antihypertensive drug treatment*. *J Clin Pharmacol*, 1993. **33**(3): p. 286-91.
154. Wolinsky, H., *The effects of beta-adrenergic blocking agents on blood lipid levels*. *Clin Cardiol*, 1987. **10**(10): p. 561-6.
155. Day, J.L., et al., *Adrenergic mechanisms in the control of plasma lipids in man*. *Am J Med*, 1984. **76**(2a): p. 94-6.
156. Rössner, S., et al., *Long term propranolol treatment and changes in body weight after myocardial infarction*. *Bmj*, 1990. **300**(6729): p. 902-3.
157. Wilhelmssen, L., et al., *Beta-blockers versus diuretics in hypertensive men: main results from the HAPPHY trial*. *J Hypertens*, 1987. **5**(5): p. 561-72.
158. Davis, B.R., et al., *Effect of antihypertensive therapy on weight loss. The Trial of Antihypertensive Interventions and Management Research Group*. *Hypertension*, 1992. **19**(4): p. 393-9.
159. Molinoff, P.B., *Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation*. *Drugs*, 1984. **28 Suppl 2**: p. 1-15.
160. Schmelck, P.H. and J. Hanoune, *The hepatic adrenergic receptors*. *Mol Cell Biochem*, 1980. **33**(1-2): p. 35-48.

161. Ahrén, B., *Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease*. Diabetologia, 2000. **43**(4): p. 393-410.
162. Langin, D., *Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome*. Pharmacol Res, 2006. **53**(6): p. 482-91.
163. Schauer, U.J. and I. Schauer, *Inhibition of human lecithin: cholesterol acyltransferase activity by catecholamines in vitro*. Biomed Biochim Acta, 1989. **48**(10): p. 849-52.
164. McDevitt, D.G., *Comparison of pharmacokinetic properties of beta-adrenoceptor blocking drugs*. Eur Heart J, 1987. **8 Suppl M**: p. 9-14.
165. Kendall, M.J., *Clinical relevance of pharmacokinetic differences between beta blockers*. Am J Cardiol, 1997. **80**(9b): p. 15j-19j.
166. Krone, W. and H. Nägele, *Metabolic changes during antihypertensive therapies*. J Hum Hypertens, 1989. **3 Suppl 2**: p. 69-73; discussion 74.
167. Nadelmann, J. and W.H. Frishman, *Clinical use of beta-adrenoceptor blockade in systemic hypertension*. Drugs, 1990. **39**(6): p. 862-76.
168. Thadani, U., *Beta blockers in hypertension*. Am J Cardiol, 1983. **52**(9): p. 10d-15d.
169. van den Meiracker, A.H., et al., *Hemodynamic and hormonal adaptations to beta-adrenoceptor blockade. A 24-hour study of acebutolol, atenolol, pindolol, and propranolol in hypertensive patients*. Circulation, 1988. **78**(4): p. 957-68.
170. Man in 't Veld, A.J. and M.A. Schalekamp, *Effects of 10 different beta-adrenoceptor antagonists on hemodynamics, plasma renin activity, and plasma norepinephrine in hypertension: the key role of vascular resistance changes in relation to partial agonist activity*. J Cardiovasc Pharmacol, 1983. **5 Suppl 1**: p. S30-45.
171. Frishman, W.H., *Clinical differences between beta-adrenergic blocking agents: implications for therapeutic substitution*. Am Heart J, 1987. **113**(5): p. 1190-8.
172. Uzunlulu, M., A. Oguz, and E. Yorulmaz, *The effect of carvedilol on metabolic parameters in patients with metabolic syndrome*. Int Heart J, 2006. **47**(3): p. 421-30.
173. Basat, O., et al., *After myocardial infarction carvedilol improves insulin resistance compared to metoprolol*. Clin Res Cardiol, 2006. **95**(2): p. 99-104.
174. Giugliano, D., et al., *Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. A randomized, controlled trial*. Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 955-9.
175. Celik, T., et al., *Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress, insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients*. J Hypertens, 2006. **24**(3): p. 591-6.
176. Poirier, L., et al., *Effects of nebivolol and atenolol on insulin sensitivity and haemodynamics in hypertensive patients*. J Hypertens, 2001. **19**(8): p. 1429-35.
177. Fogari, R., et al., *Comparative effects of nebivolol and atenolol on blood pressure and insulin sensitivity in hypertensive subjects with type II diabetes*. J Hum Hypertens, 1997. **11**(11): p. 753-7.
178. Rizos, E., et al., *The combination of nebivolol plus pravastatin is associated with a more beneficial metabolic profile compared to that of atenolol plus pravastatin in hypertensive patients with dyslipidemia: a pilot study*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2003. **8**(2): p. 127-34.
179. Bakris, G.L., et al., *Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial*. Jama, 2004. **292**(18): p. 2227-36.
180. Schmidt, A.C., et al., *Blood pressure-lowering effect of nebivolol in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: the YESTONO study*. Clin Drug Investig, 2007. **27**(12): p. 841-9.

181. Kovacić, D., et al., *Effect of selective and non-selective beta-blockers on body weight, insulin resistance and leptin concentration in chronic heart failure*. Clin Res Cardiol, 2008. **97**(1): p. 24-31.
182. Ogihara, T., et al., *Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase*. Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 794-805.
183. Kajimoto, Y. and H. Kaneto, *Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1011**: p. 168-76.
184. Kaneto, H., et al., *Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction*. Am J Ther, 2005. **12**(6): p. 529-33.
185. Ascaso, J., et al., *Management of dyslipidemia in the metabolic syndrome: recommendations of the Spanish HDL-Forum*. Am J Cardiovasc Drugs, 2007. **7**(1): p. 39-58.
186. Stancu, C. and A. Sima, *Statins: mechanism of action and effects*. J Cell Mol Med, 2001. **5**(4): p. 378-87.
187. Siddiqi, S.S., et al., *Dyslipidemic drugs in metabolic syndrome*. Indian J Endocrinol Metab, 2013. **17**(3): p. 472-9.
188. *BGP-15 (3-Pyridinecarboximidamide, N-(2-hydroxy-3-(1-piperidinyl)propoxy)-, hydrochloride)*. 2014; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9884807>.
189. Farkas, B., et al., *Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(5): p. 921-32.
190. Xu, Q., et al., *Molecular chaperones and heat shock proteins in atherosclerosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H506-14.
191. Strosberg, A.D., *Structure, function, and regulation of adrenergic receptors*. Protein Sci, 1993. **2**(8): p. 1198-209.
192. Olmo, F., et al., *Spectroelectrochemical Determination of Isoprenaline in a Pharmaceutical Sample*. Sensors (Basel), 2020. **20**(18).
193. Scarpace, P.J., S.W. O'Connor, and I.B. Abrass, *Temperature and isoproterenol modulation of beta-adrenergic receptor characteristics*. Life Sci, 1986. **38**(4): p. 309-15.
194. Bristow, M.R., *The beta-adrenergic receptor. Configuration, regulation, mechanism of action*. Postgrad Med, 1988. **Spec No**: p. 19-26.
195. Zoltán, N., *Thoughts about beta blockers as anti-hypertensive drugs*. CARDIOLOGIA HUNGARICA, 2019. **49**(3).
196. *Propranolol hydrochloride*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62882>.
197. Al-Majed, A.A., et al., *Propranolol*. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2017. **42**: p. 287-338.
198. 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.
199. 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.
200. 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.
201. 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.

202. 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.
203. Benz, P.M., et al., *Mena/VASP and  $\alpha$ II-Spectrin complexes regulate cytoplasmic actin networks in cardiomyocytes and protect from conduction abnormalities and dilated cardiomyopathy*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 56.
204. 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.
205. 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.
206. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
207. 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.
208. 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.
209. Zhang, Q., et al., *Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction*. Cell Calcium, 2005. **37**(3): p. 259-66.
210. Chen, S., W.E. Knight, and C. Yan, *Roles of PDE1 in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction*. J Cardiovasc Dev Dis, 2018. **5**(2).
211. Takimoto, E., et al., *Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 214-22.
212. Patrucco, E., et al., *Roles of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) and PDE5 in the regulation of Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. 12925-9.
213. Lu, Z., et al., *Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart*. Circulation, 2010. **121**(13): p. 1474-83.
214. Nagayama, T., et al., *Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(2): p. 207-15.
215. Takimoto, E., et al., *Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5*. Circulation, 2007. **115**(16): p. 2159-67.
216. Lee, D.I., et al., *Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease*. Nature, 2015. **519**(7544): p. 472-6.
217. Miller, C.L., et al., *Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 956-64.
218. Maurice, D.H., et al., *Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(4): p. 290-314.
219. Vandeput, F., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32749-57.
220. 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.
221. 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.
222. Priksz, D., et al., *Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
223. Sheng, L., et al., *Serum osteocalcin level and its association with carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 22.
224. Zhang, Y., et al., *Relation of serum osteocalcin level to risk of coronary heart disease in Chinese adults*. Am J Cardiol, 2010. **106**(10): p. 1461-5.
225. Organization, W.H. *The top 10 causes of death*. 2020; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
226. Xu, J. *QuickStats: Number of Deaths from 10 Leading Causes,\* by Sex — National Vital Statistics System, United States, 2015*. 2017 cited: 2017; Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6615a8.htm>.
227. Organization, W.H. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2021 cited: 2021; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
228. Gandini, S., et al., *Anti-hypertensive drugs and skin cancer risk: a review of the literature and meta-analysis*. Crit Rev Oncol Hematol, 2018. **122**: p. 1-9.
229. Ishikawa, S., et al., *Loop diuretics are associated with greater risk of sarcopenia in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192990.
230. 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.
231. Zhang, D., et al., *Effects of different small HSPB members on contractile dysfunction and structural changes in a Drosophila melanogaster model for Atrial Fibrillation*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(3): p. 381-9.
232. *Safety and Efficacy of BGP-15 in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*. 2014 2014; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01069965>.
233. Literáti-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.
234. Budzyński, M.A., et al., *Chaperone co-inducer BGP-15 inhibits histone deacetylases and enhances the heat shock response through increased chromatin accessibility*. Cell Stress Chaperones, 2017. **22**(5): p. 717-728.
235. Smuder, A.J., et al., *Effects of exercise preconditioning and HSP72 on diaphragm muscle function during mechanical ventilation*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019. **10**(4): p. 767-781.
236. Vigh, L., et al., *Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'?* Trends Biochem Sci, 2007. **32**(8): p. 357-63.
237. Appleton, C.P., L.K. Hatle, and R.L. Popp, *Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(2): p. 426-40.
238. Rossi, A., P. Zardini, and P. Marino, *Modulation of left atrial function by ventricular filling impairment*. Heart Fail Rev, 2000. **5**(4): p. 325-31.
239. Betts, T., *Improving identification and treatment of atrial fibrillation*. Practitioner, 2012. **256**(1756): p. 27-31, 3.
240. Literáti-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.

241. Literati-Nagy, Z., et al., *A novel insulin sensitizer drug candidate-BGP-15-can prevent metabolic side effects of atypical antipsychotics*. *Pathol Oncol Res*, 2012. **18**(4): p. 1071-6.
242. Mangmool, S., et al.,  *$\beta$ -Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017. **25**(1): p. 44-56.
243. Fu, Q., Q. Wang, and Y.K. Xiang, *Insulin and  $\beta$  Adrenergic Receptor Signaling: Crosstalk in Heart*. *Trends Endocrinol Metab*, 2017. **28**(6): p. 416-427.
244. 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.
245. Mátyás, 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.
246. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. *Pharmacol Ther*, 2009. **122**(3): p. 216-38.
247. 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.
248. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment*. *Circulation*, 2002. **105**(12): p. 1503-8.
249. Neagoe, C., et al., *Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2003. **24**(2-3): p. 175-89.
250. Krüger, 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.

## 9.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények és egyéb publikációk



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Lampé Nóra  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

### További közlemények

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





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

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

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

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

Debrecen, 2021.12.15.



## **10. Tárgyszavak**

BGP-15

Propranolol

Humán jobb pitvar izolált trabecula

Echokardiográfia

Diabétesz mellitus

Metabolikus szindróma

Diasztolés diszfunkció

Protein-kináz G

Hiperkoleszterinémias

## **Keywords**

BGP-15

Propranolol

Human right atrial isolated trabecule

Echocardiography

Diabetes mellitus

Metabolic syndrome

Diastolic dysfunction

Protein kinase G

Hypercholesterinemic

## 11. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

Köszönöm Dr. Kurucz Andrea biztatását, barátságát.

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

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

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

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

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

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



## **12. Függetlenség**