

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**NEUROVASZKULÁRIS MODELLEK HASZNÁLATA
AZ AGYI ÖREGEDÉSI FOLYAMATOK
VIZSGÁLATÁBAN ÉS AZ OMECAMTIV MECARBIL
KARDIOVASZKULÁRIS HATÁSAINAK
JELLEMZÉSE**

Dr. Fülöp Gábor Áron

Témavezetők: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Prof. Dr. Ungvári Zoltán, PhD



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

NEUROVASZKULÁRIS MODELLEK HASZNÁLATA AZ AGYI ÖREGEDÉSI FOLYAMATOK VIZSGÁLATÁBAN ÉS AZ OMECAMTIV MECARBIL KARDIOVASZKULÁRIS HATÁSAINAK JELLEMZÉSE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Fülöp Gábor Áron okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Tóth Attila, MTA doktora
Prof. Dr. Ungvári Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Cziráki Attila, PhD
Prof. Dr. Németh Norbert, MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Kardiológiai Intézet,
Kardiológiai Tanszék könyvtára, 2023.12.12., 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Kozák Norbert, PhD
Dr. Sárközy Márta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Cziráki Attila, PhD
Prof. Dr. Németh Norbert, MTA doktora
Dr. Kozák Norbert, PhD
Dr. Sárközy Márta, PhD

Az értekezés védésének időpontja és helyszíne: 2023.12.12., 13:00 óra,
Debreceni Egyetem, ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme

Bevezetés

Az orvostudomány fejlődésével párhuzamosan lehetőség nyílt az emberi élettartam megnyújtására is. Az 1950-es évek előtt a legtöbb eredményt a fiatalok halandóságának csökkentésével érték el, de a 20. század második felében ez a tendencia megváltozott, és a 65 éves kor utáni túlélési arány növekedése segítette a fejlődést (Oeppen & Vaupel, 2002). Az életkor előrehaladtával azonban számos betegség, többek között a cerebrovaszkuláris és a kardiovaszkuláris betegségek prevalenciája is növekedést mutat, mely újabb kihívások elé állítja az orvostudományt (Arvanitakis & Bennett, 2019; Groenewegen et al., 2020).

A cerebrovaszkuláris kórképek közül a demencia az egyik leggyakoribb, mely az életminőség romlásához vezet és annak ellenére, hogy világszerte milliókat érint, kezelési lehetőségeink mégis kifejezetten limitáltak. Ahhoz, hogy a demencia kezelésében fejlődést tudjunk elérni, elengedhetetlen, hogy a betegség kórélettanát megértsük.

Számos kutatás megjelent a lehetséges okokról, azonban ezek közül kiemelkedik az agyi vaszkulátúra károsodásának a szerepe. Ismert, hogy az agyi érhálózatot érő oxidatív, nitratív stressz, mitokondriális diszfunkció, valamint az antioxidáns mechanizmusok károsodása vaszkuláris gyulladáshoz, ezáltal az érfunkció károsodásához vezethet, mely összefüggésbe hozható a demenciák pathomechanizmusával (Cui et al., 2012; Pizzino et al., 2017; Tarantini et al., 2019; Ungvari et al., 2007). Kevésbé ismert azonban az érrendszeri remodelling károsodásának, valamint az agyi vénás rendszer korral összefüggő pathológiás elváltozásainak a kóroktani szerepe.

A cerebrovaszkuláris kórképek mellett az életkorral növekszik a kardiovaszkuláris kórképek prevalenciája is, amik közül kiemelkedik a szívelégtelenség, mely 2020-as adatok alapján világszerte több, mint 60 millió embert érintett. Annak ellenére, hogy számos farmakológiai és eszközös terápia megjelent a betegség kezelésére az elmúlt évtizedekben a diagnózistól számított 10 éves túlélés továbbra is 40% alatt van (Groenewegen et al., 2020).

Az utóbbi években a farmakológiai terápia egyik fő fókusza a pozitív inotróp szerek fejlesztése felé fordult. Bár a tradicionális pozitív inotróp szerek, mint a dobutamin, vagy a milrinon, továbbra is az akut szívelégtelenség ellátás sarokpontjának számítanak, számos mellékhatásuk ismert. Éppen ezért aktív kutatások indultak egyéb pozitív inotróp hatású szerek fejlesztésére, melyek közül kiemelendő a Ca^{2+} -érzékenyítő hatású Levosimendan és a direkt miozin aktivátor Omecantiv Mecarbil (OM) (Teerlink, 2009).

A Levosimendan egy ún. „centrális” mechanizmus útján ható pozitív inotróp szer, mely a troponin C (TnC) fehérje Ca^{2+} iránti affinitását képes fokozni, illetve az ATP-szenzitív kálium csatornák aktiválása által vazodilatációt és következményes vérnyomásesést eredményez. Bár igen hatásos szer, csak intravénás változatban érhető el és a hipotonizáló, valamint szérum kálium szintet befolyásoló hatása miatt nem alkalmazható széles körben (Parissis et al., 2009).

Az OM ezzel szemben per os is alkalmazható ún. „downstream” mechanizmus útján ható pozitív inotróp. Hatását tekintve egy miozin ATP-áz, azaz felgyorsítja az ATP hidrolízisét és ezáltal fokozza az erős aktin-miozin keresztkötések számát, amely egy kinetikájában lassabb, de erőteljesebb szívizom kontrakciót eredményez (Teerlink, 2009). Az OM-el végzett klinikai vizsgálatokkal párhuzamosan azonban több olyan közlemény is napvilágot látott, mely a szer potenciális negatív hatásait tárgyalta (Bakkehaug et al., 2015; Nagy et al., 2015; Nanasi et al., 2017). Ezek alapján kulcsfontosságú, hogy megértsük az alkalmazott terápiák pontos működését, mely által a hatásosságuk javítása, káros hatásaik kiküszöbölése is elérhető lehet.

Célkitűzés

Bár számos tanulmány napvilágott látott a demencia lehetséges okairól és a vaszkuláris kognitív károsodás potenciális patomechanizmusairól, definitív terápia továbbra sem áll rendelkezésre. Ezzel párhuzamosan a szívelégtelenség gyógyszeres terápiájára igen sok lehetőségünk van, azonban ennek ellenére a beteg hosszú távú életkilátásai továbbra is rosszak. Mind a két esetben a pathomechanizmusnak és a gyógyszerek hatásmechanizmusának pontosabb ismerete szükséges. Ennek megfelelően a céljaink a következők voltak:

- Vizsgáltuk a magas vérnyomás hatását az agyi erekben létrejövő remodellingre az öregedés modelljéül szolgáló IGF-1 hiányos állatokban.
- Tanulmányoztuk az agyi vénás nyomásfokozódás hatását a neurológiai és kognitív funkcióra, valamint a neurovaszkuláris kapcsolásra állatmodellben.
- Teszteltük az Omecamtiv Mecarbil in vivo és in vitro hatásait állatmodellekben.

Anyagok és módszerek

Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben

Az állatmodell

A kísérlethez az Igfl gén 4. exonjára floxolt homozigóta hím egereket (Igfl f/f; C57BL/6 háttérben) használtunk, melyekben sikerült keringő IGF-1 hiányt indukálni a Cre rekombináza adeno-asszociált vírus (AAV8) által közvetített expressziójával a májban 4 hónapos korban. A kontroll csoport C57BL/6 egerekből állt. A magas vérnyomást szubkután elhelyezett angiotenzin-II tartalmú ozmotikus minipumpákkal váltottuk ki. A normotenzív csoportnak sóoldatot tartalmazó pumpa került behelyezésre. Minden eljárást jóváhagyott és követett az Oklahomai Egyetem HSC Intézményi Állatgondozási és Felhasználási Bizottsága.

Az artériák szerkezeti és mechanikai jellemzőinek meghatározása

A felhasznált állatok kipreparált arteria cerebri media ágait két üveg mikropipettára rögzítettük fel egy szervkamrában, oxigénnel dúsított Ca^{2+} -mentes Krebs-pufferben, a be- és kiáramlási nyomásokat pedig kontrolláltuk. A belső átmérőt és a falvastagságot az intraluminális nyomás lépcsőzetes (5 és 160 Hgmm közötti) növelését követően, videomikroszkópos rendszer segítségével rögzítettük. Az MCA-k falán belüli VSMC-eket fluoreszcens festékkel calcein AM-vel töltöttük fel a media vastagságának és a VSMC hipertrófiájának felmérésére. A fent említett morfometriai adatok mérésével ki tudtuk számolni a cirkumferenciális straint, a cirkumferenciális stresszt és a Young-féle rugalmassági modulust. A vaszkuláris remodellinget az MCA-k passzív, nyomásfüggő belső átmérő-változásának mérése által kalkuláltuk, míg a VSMC-hipertrófiát a VSMC-k méretének mérésével kaptuk meg.

Az artériák konfokális/multifoton mikroszkópos képalkotása

Az elasztintartalmat és a sejtszámot konfokális mikroszkóppal határoztuk meg. A kanülált artériákat 4%-os paraformaldehidben rögzítettük, miközben 1 órán át 70 Hgmm-en nyomás alá helyeztük. A preparátumokat Triton X-100-as permeabilizációt követően 4',6-diamidino-2-fenil-indolban (DAPI), Alexa Fluor 633 Hidrazidban és Alexa Fluor 546 Phalloidinben inkubáltuk. Az ereket Leica SP5 konfokális/multifoton mikroszkóppal ábrázoltuk, a képeket feldolgoztuk, és meghatároztuk a VSMC magjai, az elasztin és az aktin által elfoglalt teljes térfogatot.

A vaszkuláris remodellinggel kapcsolatos gének expressziós változásainak meghatározása

qPCR technikát használva mértük meg az elasztin, elasztolitikus és kollagenolitikus mátrix metalloproteinázok, az elasztin komplex szerkezetét meghatározó faktorokat kódoló gének, az extracelluláris mátrix keresztkötéseiért felelős gének, valamint a vaszkuláris remodellinget szabályozó növekedési faktorok kódolásáért felelős gének mRNS expresszióját.

Statisztika

A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, majd Tukey post hoc tesztjével állapítottuk meg. $p < 0,05$ volt szignifikáns. Az adatokat átlag \pm SEM-ben fejezzük ki. A statisztikai elemzéseket Prism 5 szoftverrel (GraphPad) végeztük.

Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban

Az állatmodell

Kísérleteinkhez 10 hónapos, felnőtt hím C57BL/6 egereket használtunk. Az agyi vénás pangás kiváltásához az egereken bilaterális juguláris vénás lekötetést

alkalmaztunk. A kontroll csoport „sham” operáción esett át. A magas vérnyomást a fentebb tárgyaltaknak megfelelően indukáltuk. Minden eljárást jóváhagyott és követett az Oklahomai Egyetem HSC Intézményi Állatgondozási és Felhasználási Bizottsága.

Az állatok neurológiai funkciójának, viselkedésének és kognitív funkciójának a felmérése

A neurológiai vizsgálat a spontán aktivitás, a végtagok szimmetriájának, a mellső végtag nyújtási képességének, a mászóképeségnek, a test propriocepciónak, a bajuszszőr érintésére adott válasznak és a járás koordinációjának a felméréséből állt. Ezen felül 8 karú vízilabirintusban teszteltük a térbeli és a hosszú távú memóriát, Rotarod eszköz segítségével a motoros készségtanulást, valamint markolatmérő segítségével az elülső végtagok izomerejét.

A neurovaszkuláris kapcsolási válaszok mérése

A funkcionális hiperémia (neurovaszkuláris kapcsolás) felmérésére a bódított egereket immobilizáltuk, és sztereotaxiás keretre helyeztük, a fejbőrt és a csonthártyát félrehúztuk, és a koponyát fogászati fúróval óvatosan elvékonyítottuk, miközben folyékony pufferrel hűtöttük. A funkcionális hiperémia meghatározásához bajuszszőr stimulációt alkalmaztunk, és a szomatszenzoros cortex feletti regionális véráramlási különbségeket lézerspeckle kontraszt képalkotó berendezéssel rögzítettük.

A vér-agy gát sérülésének és a mikroglia aktiválódásának mérése, valamint a proinflammatorikus génexpresszió vizsgálata a hippocampusban

A vér-agy gát sérüléseinek a detektálására és a mikroglia aktiválódásának a mérésére immunfluoreszcens jelölést és konfokális mikroszkópiát használtunk. A vér-agy gát sérülését az extravazált IgG azonosításával a mikroglia aktivációt

pedig Iba1 jelöléssel detektáltuk. A proinflammatorikus génexpressziót real-time qPCR technikával vizsgáltuk.

Statisztika

A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, majd Tukey post hoc tesztjével állapítottuk meg. $p < 0,05$ volt szignifikáns. Az adatokat átlag \pm SEM-ben fejezzük ki. A statisztikai elemzéseket Prism 5 szoftverrel (GraphPad) végeztük.

Az Omecamtiv Mecarbil in vivo és in vitro hatásai állatmodellben

Az állatmodell

Az in vivo vizsgálatokat 13-15 hetes hím, 300-330 g tömegű Wistar-Kyoto patkányokon végeztük. A miocitákat mongrel kutyákból izoláltuk.

Hemodinamikai mérések

A pentobarbitál-nátriummal altatott, intubált, lélegeztett patkányoknak a vena jugularison keresztül adagoltuk az OM-et. A mérésekhez egy 2-Fr nyomásvezető mikrokatótert helyeztünk be a jobb nyaki artériába, és ezt követően lejuttattuk a felszálló aortába. A katótert ezután nyomásszabályozás mellett továbbítottuk az LV-be. Elsőként steady-state állapotú PV relációkat rögzítettünk, majd 10 perces stabilizálódást követően a jeleket folyamatosan regisztráltuk 1000 minta/s mintavételezési sebességgel. Az LV P-V összefüggéseit különböző előterheléseknél határoztuk meg a vena cava inferior tranziens okklúziója által, hogy ilyen módon megkapjuk az LV szisztolés és diasztolés funkció terheléstől független paramétereit. Az alapparaméterek rögzítése után DMSO-t (oldószer) és három egymást követő OM-dózist (200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) injektáltunk intravénás bolusként, ami a maximális 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ kumulatív dózist eredményezte.

Vérnyomásmérés

Az altatott patkányoknak az OM-et a vena jugularison keresztül adagoltuk növekvő dózisban (200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) a vérnyomást pedig invazív módon, a jobb carotis artéria kanülálása által rögzítettük. Az első méréseket az oldószerrel, DMSO-val végeztük.

Echocardiographia

A patkányokat ketaminnal és xilazinnal végzett bódítás után melegítőpárnára helyeztük, ahol a bal vena jugularist kanüláltuk, hogy a növekvő dózisú OM bólusokat (200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) be tudjuk adni. Ezt követően 2D és Doppler vizsgálatot végeztünk az átmérők, valamint a szisztolés és diasztolés funkció meghatározására.

Mechanikai mérések permeabilizált miocitákon

A mérésekhez mélyhűtött (-80°C) humán bal kamra szabad fal mintákat (nem beültetett donorszívekből) izoláló oldatban mechanikusan feltörtük, majd Triton X-100 segítségével permeabilizáltuk. A miocita méretű preparátumokat szilikon ragasztóval rögzítettük egy nagy sebességű hosszszabályozó és egy erőmérő közé ISO-ban 15°C -on. A szívizomsejtek Ca^{2+} -aktivált erőképzését úgy váltottuk ki, hogy a készítményt relaxáló oldatból vittük át aktiváló oldatba. A relaxáló oldat pCa értéke 9,0 (1 nM szabad Ca^{2+}), míg a maximális aktiváló oldat pCa értéke 4,75 (18 μM szabad Ca^{2+}) volt. A maximális Ca^{2+} -aktivált erőt (F_{max}) pCa 4,75 értéknél határoztuk meg. Minden egyes Ca^{2+} -függő aktív erőmérést követően mértük a kardiomiociták sejtreaxációjának megfelelő Ca^{2+} -független passzív erejét ($F_{\text{passzív}}$) úgy, hogy a preparátumot az eredeti sejthossz 80%-ára csökkentettük 8 másodpercre relaxáló oldatban. Az erőmérések során 4 különböző szív LV-mintáját (szívenként 5-6 szívizomsejtet) használtuk. Az OM hatását a Triton-X-100 permeabilizált humán szívizom összehúzódásra alacsony

(0,1 μM) és magas (1 μM , 401 ng/ml) koncentrációjú OM jelenlétében is teszteltük

Kutya kamrai kardiomiociták izolálása, majd akciós potenciál, sejthossz és Ca^{2+} -tranziens mérések elvégzése

Mindkét nemhez tartozó kifejlett kutyákat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid és 1 mg/kg xilazin-hidroklorid intramuszkuláris injekciójával érzéstelenítettük. A szíveket gyorsan eltávolítottuk, és Tyrode oldatba helyeztük, az izolált kardiomiocitákat pedig enzimatis diszperzióval állítottunk elő. Az akciós potenciál rögzítéséhez életképes, tiszta csíkozást mutató kamrai kardiomiocitákat helyeztünk egy inverz mikroszkóp tárgyasztalára szerelt 1 ml térfogatú kísérleti kamrába. Az ülepítés után a szívizomsejteket folyamatosan 37 °C-os Tyrode oldattal 1-2 ml/perc sebességgel szuperfundáltuk. A sejteket 3 M KCl-mal töltött hagyományos boroszilikát mikroelektrodákkal szűrtük meg, amelyek csúcscellenállása 20-40 $\text{M}\Omega$ között van, és egy Multiclamp 700A erősítő bemenetére csatlakozik. Akciós potenciálokat (AP) váltottunk ki ezeken az intracelluláris elektrodákon keresztül, 2 ms széles, téglalap alakú áramimpulzusok alkalmazásával, amelyek amplitúdója kétszerese a diasztolés küszöbértéknek. Az AP-kat 1 Hz, 2 Hz, 3,33 Hz, 4 Hz és 5 Hz ingerlési frekvenciákon rögzítettük, ebben a sorrendben, 1 μM OM hiányában és jelenlétében. A sejthosszt (CL) egy video alapú edge-detektor rendszerrel mértük az AP felvételekkel egyidejűleg. Az intracelluláris Ca^{2+} tranzienseinek fotometriai kimutatásához szívizomsejteket 5 μM Fura-2 AM-mel töltöttük fel Pluronic F-127-et tartalmazó Tyrode oldatban. A fluoreszcenciát váltakozó, kétsugaras gerjesztésű fluoreszcens fotometriás berendezéssel mértük inverz mikroszkóppal. A Ca^{2+} -kötött és Ca^{2+} -mentes Fura-2 festék fluoreszcens jeleit 340 nm-es (F340), illetve 380 nm-es (F380) gerjesztési hullámhosszon detektáltuk. A kibocsátott fotonokat 510 nm-en detektáltuk egy R1527P fotonokszorozó csővel. Az intracelluláris Ca^{2+} tranziens (CaT) értékelésére az F340/F380 fluoreszcencia arányt használtuk.

Statisztika

Az eredményeket átlag \pm SEM értékben fejeztük ki. A normál eloszlású adatokat először Shapiro-Wilk teszttel értékeltük. Normál eloszlás esetén a több csoportot tartalmazó adatsorokat varianciaanalízissel (ANOVA) (párosítás hiánya esetén közönséges, ismételt mérések esetén Greenhouse-Geisser korrekcióval), a többszörös összehasonlítást pedig Holm-Sidak teszttel értékeltük; míg a két csoportot tartalmazó adatsorokat közönséges, parametrikus T-teszttel értékeltük. A normál eloszlástól való eltérés vagy alacsony megfigyelési számok ($n < 6$) esetén nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk. Ezekben az esetekben ismételt mérésekhez Friedman tesztet független mérésekhez Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A többszörös összehasonlításhoz Dunn's tesztet használtunk. Két csoport értékeléséhez Wilcoxon páros előjeles rangtesztet (ismételt mérések) vagy Kolgomorov-Smirnov tesztet (párosítatlan értékek) használtunk. A $p < 0,05$ volt a szignifikancia kritériuma.

Eredmények

Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben

Az IGF-1 hiánya megváltoztatja az artériák morfológiáját, az érrendszer mechanikát, és rontja az MCA-k strukturális alkalmazkodását a magas vérnyomáshoz

Az IGF-1 hiány a falvastagság szignifikáns csökkenéséhez vezetett normotenzív egerekben. Emellett jól látható az MCA-k szerkezeti adaptációja a magas vérnyomáshoz kontroll állatokban, ami a falvastagság jelentős növekedésében, csökkent belső átmérőben és a fal/lumen arány ebből következő növekedésében nyilvánult meg. Kalceinnel festett vaszkuláris simaizomsejteken (VSMC) végzett mérések kimutatták, hogy a falvastagság növekedését legalábbis részben a mediális VSMC hipertrófia okozta. A hipertóniás kontroll egerek MCA-iban a stress-strain görbe balra tolódott el a normotenzív kontroll egerek MCA-jában kapott görbéjéhez képest, ami az agyi artériák merevségét jelzi. Maga az IGF-1-hiány az MCA-k stress-strain kapcsolatában balra eltolódással és megnövekedett cirkumferenciális feszültséggel járt. Az Ang-II infúziója IGF-1-hiányos egerekben további balra tolódást eredményezett az MCA-k stress-strain görbéjétől, jelezve az erek fokozott merevségének jelenlétét. Konfokális és multifoton mikroszkópiát használtunk az MCA-k érfal-összetételének további felmérésére. Ezek a kísérletek alapján megállapíthattuk, hogy az IGF-1 hiányos MCA-k falában az elasztintartalom csökkenési tendenciáját, amely a magas vérnyomás kiváltása után vált szembetűnőbbé

Az IGF-1 hiánya rontja a hipertónia által kiváltott adaptív változásokat az ECM-hez kapcsolódó vaszkuláris génexpressziós profilban

Megállapítottuk, hogy MCA-kban az IGF-1 hiány gátolta az Eln mRNS expressziójának magas vérnyomás által kiváltott változásait, az elasztin rostok összeépülését és átépülését, valamint az ECM térhálósodását szabályozó

faktorokat, illetve a vaszkuláris remodelling folyamatait szabályozó faktorokat és a kollagének expresszióját is, míg nem gyakorolt jelentős hatást az MMP expressziójára. A vaszkuláris redox szabályozásban szerepet játszó tényezők között azt találtuk, hogy az IGF-1 hiánya negatívan befolyásolta az antioxidáns Nrf2 (Nfe2/2) transzkripció faktor expresszióját.

Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban

A jugularis véna lekötése károsodott kognitív funkciót eredményez egerekben azonban nem befolyásolja a neurovaszkuláris kapcsolási válaszokat

8 karú vízilabirintusban végzett tesztek során azt tapasztaltuk, hogy az áloperált egerek kombinált hibaaránya alacsonyabb volt, mint a JVL operáción átesett egereké. A munkamemória (rövid távú memória, amely az azonnali tudatos észlelésben szerepet játszik) elemzéséhez megvizsgáltuk a helytelen karokba való (rejtett platform nélküli) újbóli belépéseket. Azt találtuk, hogy a munkamemória funkciója a JVL operált egerekben károsodott az áloperált kontroll egerekhez képest. A nem kognitív paraméterek elemzése nem mutatott különbséget, így az úszás sebességében és a nem felfedező viselkedésben (az az összesített idő, amelyet az egerek nem a platform keresésével töltöttek, például lebegve) nem volt eltérés a két csoport között. Összességében a fent említett eredmények azt sugallják, hogy az egereknél a JVL-hez társuló agyi vénás pangás rontja a teljesítményt a 8 karú vízi labirintusban, ami a hippocampális térbeli tanulás és memória hanyatlásából eredeztethető, nem pedig a motoros vagy motivációs folyamatok változásából. Mindezzel párhuzamosan a neurovaszkuláris kapcsolási válaszok a bilaterális JVL operáció nem befolyásolta.

A jugularis véna lekötésének hatása a neurológiai paraméterekre, az izomerőre és a motoros tanulási funkcióra

Azt találtuk, hogy a JVL a neurológiai pontszám jelentős csökkenését eredményezte a kontroll csoporthoz képest, mely egyértelmű neurológiai deficitre utal. A JVL operált egerek izomereje tendenciózusan csökkent volt a kontroll állatokéhoz képest. A motoros képességek tanulását módosított rotarod teszttel értékeltük. Egyensúlyt és állóképességet tekintve nem volt érdemi különbség a két csoport között.

A jugularis véna lekötése súlyosítja a hipertónia által kiváltott BBB károsodást a hippocampusban

Extravazált plazmából származó IgG-t használtunk a megnövekedett hippocampalis cerebrovasculáris permeabilitás markereként. A plazmából származó IgG immunfestése jelentős IgG-lerakódásokat mutatott ki JVL operált egerek hippocampuszában, amit tovább súlyosbított a magas vérnyomás. A hipertóniás áloperált egerek hippocampuszában az IgG kilépés mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a normotenzív áloperált egerek esetében egyáltalán nem volt kimutatható IgG kilépés.

Az Omecamtiv Mecarbil in vivo és in vitro hatásai állatmodellben

Az Omecamtiv mecarbil in vitro befolyásolja a Triton-X-100-al permeabilizált humán kardiomiociták összehúzódását, relaxációját, Ca^{2+} -érzékenységét és merevségét

A kalcium-függő aktív erő szignifikánsan megnövekedett nagyon alacsony Ca^{2+} -szintek mellett is 1 μ M OM jelenlétében. Például az erő értéke relaxáló oldatban (pCa 9) $1,1 \pm 0,2$ kN/m² volt, az OM hiányában mért 0 kN/m² értékhez képest. A miocita erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenysége (pCa50) pedig $5,86 \pm 0,02$ -ről $6,42 \pm 0,06$ -ra nőtt 1 μ M OM jelenlétében. Ugyanaz a dózis OM többszörösére növelte a Ca^{2+} -aktivált erőtermelést (Faktív) alacsony Ca^{2+} -koncentráció mellett (a pCa 6,2-nél a Faktív $1,7 \pm 0,3$ -ról $8,6 \pm 1,9$ kN/m²-re nőtt). A Ca^{2+} -függő

erőgenerálás sebessége (ktr) 1 μM OM-koncentráció mellett a Ca^{2+} -koncentrációtól függetlenül csökkent ($0,97 \pm 0,06$ -ról $0,04 \pm 0,01$ 1/s-ra, és $0,28 \pm 0,01$ -ről $0,107 \pm 0,04$ -re) magas és szubmaximális Ca^{2+} -szintek mellett. Mindezek mellett a fél-maximális összehúzódáshoz szükséges idő és a relaxáció (trelax) kinetikája szintén lelassult szubmaximális és magas Ca^{2+} -szintek mellett $1\mu\text{M}$ OM jelenlétében. Végül a Ca^{2+} -független (passzív) merevség ($F_{\text{passzív}}$) $0,88 \pm 0,10$ -ról $3,88 \pm 0,44$ kN/m²-re, illetve $1,03 \pm 0,12$ -ről $3,25 \pm 0,4$ -re nőtt szubximális és magas Ca^{2+} szintek mellett $1\mu\text{M}$ OM jelenlétében.

Az Omecamtiv mecarbil pozitív inotrópiát vált ki patkányban in vivo

A 200, 400 és 600 μg /testtömeg-kg (BW) OM intravénás, kumulatív alkalmazása (1200 μg /tkg maximális dózissal) javította a szív szisztolés funkcióját, amint azt az echokardiográfia is kimutatta. Az ejekciós frakció (EF) $73,3 \pm 2,2$ -ről $87,4 \pm 3,6\%$ -ra nőtt, amivel párhuzamosan a szisztolés ejekciós idő (SET) $75,2 \pm 2,5$ -ről $117,4 \pm 6,1$ ms-ra nőtt, jelezve a kontrakció kinetikájának lassulását. A szisztolés funkció javulását az LV P–V mérések is kimutatták, azonos körülmények között. A terheléstől független kontraktilitási indexek szintén egyértelmű javulást mutattak a szisztolés teljesítményben: mind a végszisztolés P–V összefüggés (ESPVR_q), mind a preload-recruitable stroke work (PRSW) nőtt.

Az Omecamtiv mecarbil diasztolés diszfunkciót okoz patkányokban in vivo

Az OM-kezelés a diasztolés diszfunkció jeleivel is összefüggésbe hozható az echokardiográfián: a mitrális billentyű szintjében mért E:A arány $2,02 \pm 0,08$ -ról $1,45 \pm 0,03$ -ra csökkent; Az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) $25,6 \pm 1,6$ ms-ról $52,7 \pm 2,7$ ms-ra, a bal pitvari (LA) belső terület pedig $29,4 \pm 1,7$ -ről $48,3 \pm 2,0$ mm²-re nőtt a maximális alkalmazott OM koncentráció mellett. A diasztolés diszfunkcióra utaló jelek jelen voltak a P–V analízissel is. Az izovolumetriás relaxációs állandó (Tau_w) $9,2 \pm 0,4$ -ről $15,2 \pm 0,7$ ms-ra nőtt, és a diasztolés

nyomás csökkenésének maximális sebessége (dp/dt_{\min}) - $11642 \pm 0,4$ -ről - 8096 ± 614 Hgmm/s-ra csökkent.

Az Omecamtiv mecarbil in vivo magas dózisokban hipotenziót vált ki patkányban

Az OM mind a szisztolés (149 ± 6 -ról 49 ± 6 Hgmm-re $P < 0.05$), mind a diasztolés (130 ± 4 -ről 37 ± 4 Hgmm-re $P < 0.05$) vérnyomás értékeket jelentősen csökkentette $1200 \mu\text{g/kg}$ kumulatív dózisban. Fontos megjegyezni, hogy a szer nem volt hatással a pulzusszámra, függetlenül a hipotenzió kialakulásától (443 ± 18 és 445 ± 16 ütés/perc a kezelés előtt és után).

Az Omecamtiv mecarbil tranziens elektromechanikus váltakozást vált ki patkányban nagy dózisok mellett in vivo körülmények között

Az OM tranziens, periodikus, elektromechanikus váltakozásokat váltott ki. Ezeket a normál és az alacsony vagy hiányzó kilökődések közötti oszcilláció jellemezte ütésről-ütesre. Ezt a mintázatot a 30 vizsgált patkány közül 23-nál figyeltük meg. Váltakozó kontraktilis diszfunkció részleges vagy teljes formában nyilvánul meg, és a bal kamra diasztolés telődése különbözteti meg a két formát. A részleges alternánsokat akkor határoztuk meg, amikor a normál szisztolét részleges töltés követte, és ennek következtében csökkent a bal kamra lökettérfogata. A komplett alternánsok esetében gyakorlatilag nem volt bal kamrai töltődés, és ennek következtében elégtelen összehúzódnás következett a normál systole után. Az alternansz mintázat magas OM dózis mellett (többségében $1200 \mu\text{g/ttkg}$ kumulatív dózis) indult el a pulzusszám emelkedését követően vagy extraütés után. Mérhető paraméterekben is tükröződött ez a váltakozás: a szisztolés ejekciós idő például kifejezett váltakozást mutatott OM $1200 \mu\text{g/kg}$ kumulatív dózis mellett ($111,9 \pm 1,8$ ms-ről $82,1 \pm 3,0$ ms-ra) az egymást követő ütések esetén.

Az Omecamtiv mecarbil megváltoztatja az intracelluláris Ca²⁺ kezelést kutya szívműködésében in vitro

Az 1 μM OM-val végzett kezelés növelte a nem stimulált sejtek merevségét. A nem stimulált kardiomiociták hossza 1 μM OM jelenlétében 131 ± 14 -ről 112 ± 11 μm -re csökkent. Az izolált LV kardiomiociták stimulálása (3 Hz-nél gyorsabb) az in vivo mérésekhez hasonlóan oszcillációt eredményezett a normál és a csökkent összehúzódások között ütésről-ütésre. Váltakozást akkor tekintettünk valósnak, ha $\geq 10\%$ -os különbség volt az egymást követően rögzített stimulált sejtrövidülések között. Ez a váltakozás 14 sejtől háromban volt jelen 4 Hz-en, és 14-ből kilencben 5 Hz-en. A váltakozást ezt követően 5 Hz-en vizsgáltuk a sejthossz, valamint az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció és a membránpotenciál (AP) változásának párhuzamos rögzítésével. Nem volt különbség a kontrakcióban (a sejthossz csökkenése) az OM kezelés előtt az egymást követő kontrakciókban ($14,20 \pm 2,09$ és $14,16 \pm 2,06$ μm), míg az OM beadása után szignifikáns különbség alakult ki ($16,6 \pm 2,0$ és $7,6; \pm 0,9$ μm). Ezzel párhuzamosan a Ca²⁺-tranziensek amplitúdója (CaT amplitúdó) $0,69 \pm 0,04$ -ről $0,41 \pm 0,08$ -ra csökkent.

Megbeszélés

Kísérleteink során a cerebrovaszkuláris öregedés két aspektusát vizsgáltuk meg és vizsgálatainkra támaszkodva több következtetést is levonhatunk. Egyrészt az IGF-1 hiánya negatívan befolyásolni látszik a magas vérnyomás okozta adaptív media hipertrófiát és a szabályozott ECM-remodellinget, csökkenti az elasztin tartalmat és gyengíti az ECM-hez kapcsolódó génexpresszió adaptív változásait egérmódelben. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a keringő IGF-1 kritikus szerepet játszik az agyi artériák szerkezeti integritásának fenntartásában hipertenzív és normotenzív állapotban egyaránt. Ismert, hogy az IGF-1 szintje csökken az életkorral, ami kihathat a VSMC fenotípus változására és az artériás fal adaptív átépülésére, így idős korban hozzájárulhat az intracerebrális mikrovérzésekhez és a következményes kognitív károsodásokhoz. Eredményeink új bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy az IGF-1 hiány hozzájárul az egér agyi artériák átalakulásához és szerkezeti gyengüléséhez, utánozva az érrendszeri öregedés számos aspektusát. Tudomásunk szerint az általunk publikált anyag az első olyan tanulmány, amely kimutatta, hogy az IGF-1 hiány önmagában öregedésszerű változásokat okoz az agyi artériák morfológiájában és mechanikai tulajdonságaiban. Először is, jelenlegi eredményeink azt mutatják, hogy az IGF-1 hiányos egerekben az agyi artériák morfológiájában és vaszkuláris mechanikájában a magas vérnyomás okozta adaptív változások károsodnak. Másodszor, a korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a hipertónia által kiváltott hipertrófiás átépülés a penetráló arteriolákban IGF-1-hiány esetén károsodik (Toth et al., 2014). Harmadszor, eredményeink azt mutatják, hogy az IGF-1 hiány károsan befolyásolja a vaszkuláris elasztin tartalom adaptív változásait és az ECM-komponensek expresszióját, valamint az ECM-összeállítást, térhálósodást és átépülést szabályozó tényezőket. Eredményeink fontos transzlációs jelentőséggel bírnak számos olyan betegség patogenezisében, amelyek veszélyeztetik az artériás fal integritását. Ilyen például az intracerebrális vérzések

(ICH) kialakulása is, mely azért is fontos, mert annak ellenére, hogy az ischaemiás stroke megelőzésében jelentős előrelépés történt az ICH-k előfordulása nem csökkent az elmúlt évtizedekben (Ungvari et al., 2017).

A juguláris vénás nyomásemelkedésének hatásait tekintve, tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, amely bemutatja, hogy a bilaterális jugularis véna elzáródása által kiváltott izolált agyi vénás pangás egerek kognitív hanyatlásával jár. Az idős betegekben gyakran kialakul a jugularis vénás reflux, ami a jugularis véna belső áramlásának stagnálásához vagy megfordulásához vezet, elősegítve a megnövekedett centrális vénás nyomás átvitelét az agyi vénás keringésbe. A jugularis vénás reflux megelőzésében kritikus jelentőségű jugularis vénabillentyű időseknél gyakran inkompetens, ami elősegíti az agyi vénás nyomásfokozódás kialakulását (Fulop et al., 2019). Azok a mechanizmusok, amelyek révén az agyi vénás pangás/megnövekedett agyi vénás nyomás elősegíti a kognitív károsodást, valószínűleg sokrétűek. Vizsgálataink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az agyi vénás pangás elősegíti a BBB károsodását, ami jelentős neuroinflammációval (mikroglia-aktiváció, valamint a gyulladást elősegítő citokinek és kemokinek lokális koncentrációjának a növekedése) társul. A proinflammatorikus citokinek, kemokinek, proteázok és az aktivált mikrogliaiból származó reaktív oxigéngyökök neuronális diszfunkcióhoz vezetnek. Fontos, hogy kísérleteink alapján, az agyi vénás pangásnak a vér-agy gát integritására és a gyulladós folyamatokra gyakorolt káros hatásait súlyosbítja a komorbid magas vérnyomás. Ennek a megfigyelésnek fontos klinikai jelentősége van.

Az Omecamtiv Mecarbillaal végzett kísérleteink alapján a szer két, korábban eddig fel nem ismert sajátosságáról számoltunk be, amelyek átfednek a pozitív inotróp hatásával. Az egyik a diasztolés funkciót súlyosan károsító hatás. A másik pedig egy periodikus elektromechanikus alternansz (magasabb OM-dózisoknál), amelyben a normál ütések váltakoznak csökkent effektivitású szívizom

összehúzódásokkal ütésről-ütésre. A jelenség hasonló a pulsus alternans-hoz. Fontos, hogy a > 1200 ng/ml dózisok (körülbelül háromszor magasabbak, mint az in vitro kísérleteinkben) egyes tanulmányokban a szisztole túlzott megnyúlásához vezettek, így korlátozva a koszorúér véráramlását a diasztolé alatt, és ilyen módon szívizom ischaemiát okoztak bizonyos esetekben. A kísérleteinkben alkalmazott maximális intravénásan beadott OM dózis a klinikai alkalmazásoknak megfelelt (1000 µg/ttkg kezdeti dózis az első órában). In vitro kísérleteinkben a sejtszintű hatásokat 401 ng/mL (1 µM) OM-koncentráció mellett vizsgáltuk, ami átfedésben van a gyógyszer korábban publikált hatékony klinikai szérumkoncentrációival. Jelen kísérletek során megerősítettük korábbi eredményeinket miszerint az OM-et terápiás dózisban alkalmazva igen robosztus Ca²⁺-szenzitizációs hatást lehet elérni. Sejtszinten ez a hatás lelassult kontrakciós és relaxációs kinetikával, valamint jelentősen megnövekedett passzív merevséggel társult. Ezáltal a szernek jelentős diasztolés diszfunkciót okozó hatása is mutatkozott. Érdekes módon néhány diasztolés paramétert (E:A arány, IVRT és τ_w) már az OM legalacsonyabb dózisa is negatívan befolyásolt (200 µg/kg). Az OM-kezelés pozitív inotrópiát és diasztolés diszfunkciót eredményezett izolált humán szívizomsejtekben. Érdekes, hogy OM jelenlétében, már passzív (diasztolés) körülmények között is megrövidültek ezek a sejtek. Ez összeegyeztethető azzal a megállapítással, hogy az OM látszólag Ca²⁺-független módon növelte a permeabilizált emberi szívizomsejtek passzív merevségét, valamint lelassította a kontrakció utáni relaxációt. Adataink arra utalnak, hogy a fokozott Ca²⁺-érzékenység mértéke szélsőséges lehet: mind a diasztolés megrövidülés, mind a szívizomsejtek passzív merevségének növekedése nagyon alacsony (diasztolés) Ca²⁺-koncentrációnál jelentkezett. Úgy tűnik, hogy a Ca²⁺-függő aktiváció és disszociáció is sokkal lassabb OM jelenlétében. Az OM a szívizomsejtek nyugalmi merevségét is növelte. Ez magyarázható (1) az aktív összehúzódás Ca²⁺-független beindulásával vagy (2) azzal, hogy az OM a miozinon kívül egyéb kontraktilis fehérjékkel is közvetlen kölcsönhatásba lép. Ezek a celluláris adatok

egy alternatív mechanizmust feltételeznek az LV-átmérő csökkenésének hátterében: ez a diasztolés Ca^{2+} -koncentrációnál fellépő kontrakció a jelentős Ca^{2+} -szenzitizációnak az eredménye is lehet. Emellett megerősítettük, hogy az OM alacsony koncentrációban nem befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienseket. Ezzel szemben az OM magasabb koncentrációknál befolyásolta az APD és a T-hullám morfológiáját. Ez utóbbi, korábban nem azonosított tulajdonság a (1) ryanodin receptor (RyR) megváltozott működésével és (2) a Ca^{2+} troponin komplexről történő lelassult disszociációjával is magyarázható. Munkánk második újdonsága, hogy az OM dózis- és látszólag pulzusfüggő, tranziens, elektromechanikus alternanszt váltott ki patkányban, amely a pulsus alternanszhoz hasonló. Ez 30 patkányból 23-ban volt jelen magas OM dózisonál (1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Többnyire enyhén emelkedett szívfrekvenciánál vagy magasabb stimulációs gyakoriságú periódusokban fordult elő izolált kutya LV szívizomsejtekben (14 sejtből kilenc esetében 5 Hz-es stimulációs frekvencián), ami arra utal, hogy ez a tulajdonság szívfrekvencia-függő lehet. Megvizsgálva az EKG-t, a csökkent effektivitású összehúzódás nem jár a QRS morfológia, vagy a QT-idő változásával, azonban a T-hullámok ütésről ütésre váltakoznak az alternansz jelenség során. Szívelégtelenségben szenvedő betegeknél többnyire a betegség progressziójával párhuzamosan írták le a T-hullám alternánst. Kutatási adatok alapján feltételezik, hogy a T-hullám alternáns megjelenése fokozhatja az életveszélyes aritmiák kialakulásának valószínűségét. Mely hatáshoz hozzájárulhat a robosztus Ca^{2+} -érzékenyítő hatás is.

A fentiek alapján két olyan nem elhanyagolható potenciális mellékhatását azonosítottuk az OM-nek, ami alááshatja pozitív hatásait és a klinikai gyakorlatban is mindenképp javasolt különös körültekintéssel eljárni a szer használatakor.

Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények

1. Elsőként mutattuk ki, hogy az IGF-1 hiány önmagában öregedésszerű változásokat okoz az agyi artériák morfológiájában és mechanikai tulajdonságaiban. Emellett kimutattuk, hogy az IGF-1 hiány negatívan befolyásolja az artériák hipertóniára adott adaptív változásait, mely génextpressziós szinten is kimutatható volt.
2. Igazoltuk, hogy az agyi vénás nyomásfokozódás a vér-agy gát sérülésén és következményes neuroinflammáción keresztül kognitív zavarokhoz vezet egerekben.
3. Az Omecamtiv mecarbillaal végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy a szer már alacsony dózisban is (200 µg/ttkg) a diasztolés funkció romlásához vezet, mely izolált humán szívizomsejteken is azonosítható hatás volt.
4. Megállapítottuk továbbá, hogy az Omecamtiv Mecarbil magas dózisban (1200 µg/ttkg) frekvenciafüggő elektromechanikus alternanshoz vezethet. Ez a hatás nem csak in vivo azonosítható, hanem a kardiomiociták szintjén is, ahol megjelent az egymást követő akciós potenciálok hossza és a Ca²⁺-tranziens is ütésről ütésre változott. Mindezen hatások pedig T-hullám alternans formájában mutatkoztak meg az EKG regisztrátumokon.

Összefoglalás

Az öregedéssel számos betegség prevalenciája növekedést mutat. Ezek közül kiemelendő a demencia és a szívelégtelenség, mely két betegség összesen több, mint 100 millió embert érint napjainkban. A demencia esetében, az intenzív kutatások ellenére, igen limitált eredményeket sikerült elérni mind a megelőzés, mind pedig a progresszió lassításának a területén. Ezzel szemben a szívelégtelenség terápiája robbanás-szerűen fejlődött az elmúlt évtizedekben, azonban a 10 éves túlélés még így is 40% alatt van (Arvanitakis & Bennett, 2019; Groenewegen et al., 2020). Mind a két esetben a patofiziológia és a potenciális terápiák hatásának a megértése vihet minket közelebb a hatékony terápiákhoz.

Munkánk során célunk volt egyrészt a kognitív diszfunkció patofiziológiájának pontosabb megértése. Ennek érdekében a két olyan területet vizsgáltunk meg, mely a kutatásokban alulreprezentált: az adaptív vaszkuláris remodelling változásait öregedésben, illetve az agyi vénás nyomásfokozódás szerepét. Másrészt célul tűztük ki a csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség kezelésére fejlesztett direkt miozin aktivátor Omecamtiv Mecarbil in vivo és in vitro hatásainak pontosabb megértését.

A kísérleteink során számos in vivo és in vitro módszert alkalmazva több megállapítást is tettünk. Egyrészt megállapítottuk, hogy az öregedéssel megjelenő IGF-1 hiány az agyi artériákban a magas vérnyomásra adott adaptív válaszok károsodását okozza. Ezen hatás hozzájárulhat az artériás nyomáshullám mélyebb penetrációjához, fokozza az erek sérülékenységét, mely kutatócsoportunk további közleményei alapján mikrovérzések kialakulásához, lokális neuroinflammációhoz és következményes kognitív diszfunkcióhoz vezethet. Másrészt megállapítottuk, hogy az agyi vénás nyomásfokozódás egérmódelben a vér-agy gát károsodását okozza, ami génexpressziós szinten is igazolt neuroinflammációhoz és következményes kognitív károsodáshoz vezet.

Végül pedig igazoltuk, hogy a direkt miozin aktivátor Omecamtiv Mecarbil dózisfüggő módon diasztolés diszfunkcióhoz és tranziens elektromechanikus alternansz kialakulásához vezethet. Ezen hatásokat in vivo és in vitro mérésekkel is igazolni tudtuk patkánymodellen, valamint humán és kutya szívműsejteken, is. Továbbá igazoltuk, hogy a tranziens elektromechanikus alternansz T-hullám alternanszal is jár, mely irodalmi adatok alapján kamrai arrythmiák kialakulásához vezethet. Mindezen eredmények negatív fényt vethetnek az OM pozitív inotróp hatására.

Kutatási eredményeink alapján közelebb kerülhetünk ahhoz, hogy a demencia kezeléséhez új támadáspontokat találjunk, illetve ahhoz, hogy az Omecamtiv Mecarbil hatásmechanizmusának megértése által meg tudjuk előzni a potenciálisan fatális mellékhatások kialakulását a szer alkalmazásakor.

Kulcsszavak

Öregedés, Demencia, Vaszkuláris kognitív károsodás, IGF-1 hiány, Agyi vénás nyomásfokozódás, Csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség, Pozitív inotróp, Omecamtiv mecarbil

Hivatkozások

- Arvanitakis, Z., & Bennett, D. A. (2019). What Is Dementia? *JAMA*, 322(17), 1728. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11653>
- Bakkehaug, J. P., Kildal, A. B., Engstad, E. T., Boardman, N., Naesheim, T., Ronning, L., Aasum, E., Larsen, T. S., Myrmet, T., & How, O. J. (2015). Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil Increases Myocardial Oxygen Consumption and Impairs Cardiac Efficiency Mediated by Resting Myosin ATPase Activity. *Circ Heart Fail*, 8(4), 766-775. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.002152>
- Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*, 2012, 646354. <https://doi.org/10.1155/2012/646354>
- Fulop, G. A., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Molnar, A., Prodan, C. I., Kiss, T., Csipo, T., Lipecz, A., Balasubramanian, P., Farkas, E., Toth, P., Sorond, F., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2019). Role of age-related alterations of the cerebral venous circulation in the pathogenesis of vascular cognitive impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 316(5), H1124-H1140. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00776.2018>
- Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A., & Hoes, A. W. (2020). Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail*, 22(8), 1342-1356. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1858>
- Nagy, L., Kovacs, A., Bodi, B., Pasztor, E. T., Fulop, G. A., Toth, A., Edes, I., & Papp, Z. (2015). The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol*, 172(18), 4506-4518. <https://doi.org/10.1111/bph.13235>
- Nanasi, P., Jr., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., & Almasy, J. (2017). Omecamtiv mecarbil activates ryanodine receptors from canine cardiac but not skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*, 809, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.027>
- Oeppen, J., & Vaupel, J. W. (2002). Demography. Broken limits to life expectancy. *Science*, 296(5570), 1029-1031. <https://doi.org/10.1126/science.1069675>
- Parissis, J. T., Rafouli-Stergiou, P., Paraskevaidis, I., & Mebazaa, A. (2009). Levosimendan: from basic science to clinical practice. *Heart Fail Rev*, 14(4), 265-275. <https://doi.org/10.1007/s10741-008-9128-4>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Tarantini, S., Valcarcel-Ares, M. N., Toth, P., Yabluchanskiy, A., Tucsek, Z., Kiss, T., Hertelendy, P., Kinter, M., Ballabh, P., Sule, Z., Farkas, E., Baur, J. A., Sinclair, D. A., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2019). Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation rescues cerebrovascular endothelial function and neurovascular

- coupling responses and improves cognitive function in aged mice. *Redox Biol*, 24, 101192. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101192>
- Teerlink, J. R. (2009). A novel approach to improve cardiac performance: cardiac myosin activators. *Heart Fail Rev*, 14(4), 289-298. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9135-0>
- Toth, P., Tucsek, Z., Tarantini, S., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Sonntag, W. E., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2014). IGF-1 deficiency impairs cerebral myogenic autoregulation in hypertensive mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34(12), 1887-1897. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.156>
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinsky, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K., & Csiszar, A. (2007). Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(1), H37-47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01346.2006>
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Kirkpatrick, A. C., Csiszar, A., & Prodan, C. I. (2017). Cerebral microhemorrhages: mechanisms, consequences, and prevention. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312(6), H1128-H1143. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00780.2016>