

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Neurovaszkuláris modellek használata az agyi öregedési
folyamatok vizsgálatában és az Omecamtiv mecarbil
kardiovaszkuláris hatásainak jellemzése**

Dr. Fülöp Gábor Áron

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



**Debreceni Egyetem
Laki Kálmán Doktori Iskola
Debrecen
2023.**

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	6
II. Irodalmi áttekintés	8
II.1. Az öregedő agy	8
II.1.1. A Cerebrovaszkuláris öregedés feltételezett mechanizmusai.....	9
II.2. A Szívelégtelenség	16
II.2.1. Csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (HFrEF) és kezelési lehetőségei – a pozitív inotrópia szerepe	17
II.2.2. Az omecamtiv mecarbil hatásmechanizmusa és a klinikai vizsgálatok tapasztalatai.....	18
II.2.3. Célok	21
III. Metodikák.....	22
III.1. Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben	22
III.1.1. Felnőttkori IGF-1-hiány előidézése egerekben	22
III.1.2. A szérumban IGF-1 szintjének mérése	22
III.1.3. Hipertónia indukciója	23
III.1.4. Az artériák szerkezeti és mechanikai jellemzőinek meghatározása.....	23
III.1.5. MCA-k konfokális/multifoton mikroszkópos képalkotása.....	24
III.1.6. A vaszkuláris rezilienciával kapcsolatos gének expressziós változásainak meghatározása qPCR-rel	25
III.1.7. Statisztikai analízis.....	26
III.2. Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban.....	26
III.2.1. Állatmodell és a jugularis véna lekötési folyamatának leírása.....	26
III.2.2. A magas vérnyomás indukciója	27
III.2.3. Egerek standardizált neurológiai vizsgálata	27
III.2.4. Egerek viselkedésének – kognitív funkciójának a felmérése	27
III.2.5. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia: a vér-agy gát sérülésének és a mikroglia aktiválásának értékelése	30
III.2.6. A proinflammatorikus génexpresszió vizsgálata a hippocampusban.....	31
III.3. Az Omecamtiv Mecarbil <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> hatásai állatmodellben.....	31
III.3.1. Állatmodellek.....	31
III.3.2. Hemodinamikai mérések.....	31
III.3.3. Vérnyomásmérés.....	33
III.3.4. Echokardiográfia.....	33
III.3.5. Mechanikai mérések permeabilizált miocitákon	34

III.3.6. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták akciós potenciáljának rögzítése	35
III.3.7. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták sejt hosszának rögzítése	36
III.3.8. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták intracelluláris Ca^{2+} tranzienseinek fotometriai kimutatása	36
III.3.9. Statisztika	37
IV. Eredmények	38
IV.1. Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben	38
IV.1.1 Keringő IGF-1 szint és vérnyomásmérés	38
IV.1.2. Az IGF-1 hiánya megváltoztatja az artériák morfológiáját, az érrendszer mechanikát, és rontja az MCA-k strukturális alkalmazkodását a magas vérnyomáshoz	38
IV.1.3. Az IGF-1 hiánya rontja a hipertónia által kiváltott adaptív változásokat az ECM-hez kapcsolódó vaszkuláris génexpressziós profilban	41
IV.2. Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban	43
IV.2.1. A jugularis véna lekötése károsodott kognitív funkciót eredményez egerekben	43
IV.2.2. A jugularis véna lekötése nem befolyásolja a neurovaszkuláris kapcsolási válaszokat	44
IV.2.3. A jugularis véna lekötésének hatása a neurológiai paraméterekre, az izomerőre és a motoros tanulási funkcióra	45
IV.2.4. A jugularis véna lekötése súlyosítja a hipertónia által kiváltott BBB károsodást a hippocampusban	46
IV.3. Az Omecamtiv Mecarbil <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> hatásai állatmodellben	48
IV.3.1. Az Omecamtiv mecarbil <i>in vitro</i> befolyásolja a Triton-X-100-al permeabilizált humán kardiomiociták összehúzódását, relaxációját, Ca^{2+} -érzékenységét és merevségét	48
IV.3.2 Az Omecamtiv mecarbil pozitív inotrópiát vált ki patkányban <i>in vivo</i>	50
IV.3.3 Az Omecamtiv mecarbil diasztolés diszfunkciót okoz patkányokban <i>in vivo</i>	52
IV.3.4 Az Omecamtiv mecarbil magas dózisokban hipotenziót vált ki patkányban <i>in vivo</i>	54
IV.3.5 Az Omecamtiv mecarbil tranziens elektromechanikus váltakozást vált ki patkányban nagy dózisok mellett <i>in vivo</i> körülmények között	54
IV.3.6. Az Omecamtiv mecarbil megváltoztatja az intracelluláris Ca^{2+} háztartást kutya szívizomsejtekben <i>in vitro</i>	60
V. Megbeszélés	64
VI. Összefoglalás	73
VI.1. Összefoglalás	73
VI.2. Summary	74
VII. Irodalomjegyzék	76
VIII. Tárgyszavak	87
IX. Köszönetnyilvánítás	88
X. Függelék	89

Rövidítések jegyzéke

ADP – Adenozin-difoszfát

AP – Akciós potenciál

ATP – Adenozin-trifoszfát

BBB - Véragyagát

CL – Sejthossz

CNS – Központi idegrendszer

CuZnSOD – réz-cink szuperoxid-dizmutáz

CSF – cerebrospinális folyadék

E_{high} – Elaszticitás modulus magas nyomásokon

E_{low} – Elaszticitás modulus alacsony nyomásokon

HFpEF – Szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval

HFrEF – Szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval

ICH – Intracerebrális mikrovérzés

IGF-1 – Inzulinszerű növekedési faktor 1

IgG – Immunglobulin G

JVL – Juguláris vénás lekötés

LV – Bal kamra

MCA – arteria cerebri media

MMP – mátrix-metalloproteináz

MnSOD – Mangán szuperoxid-dizmutáz

mtDNS – mitokondriális DNS

OM – Omecamtiv mecarbil

Pi – Anorganikus-foszfát

PV analízis – nyomás-térfogat analízis

RNS – Reaktív nitrogényökök

ROS – Reaktív oxigénökök

SASP – Scenscence asszociált szekretoros fenotípus

SOD – Szuperoxid-dizmutáz

VCID – Vaszkuláris kognitív károsodás

VSMS – Vaszkuláris simaizomsejt

I. Bevezetés

Öregedő társadalomban élünk. Az orvosbiológiai kutatások eredményei megadták a kulcsot az emberi élet bizonyos fokú meghosszabbításához (Crimmins, 2015). Míg az 1840-es években egy 45 évet élt svéd nő matuzsálemnek számított, addig manapság a japán nők átlagos várható élettartama meghaladja a 80 évet. Az elmúlt két évszázadban a várható élettartam lineárisan emelkedett, ami körülbelül 25 évről 65 évre nőtt a férfiaknál és 70 évre a nőknél. 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 előrejelzések szerint az életkor növekedésének tendenciája – különösen a fejlett országokban – folytatódik. Egy hivatalos japán tanulmány alapján, amelyet 1997-ben tettek közzé, a férfiak és nők várható élettartama Japánban 2050-re 82,95 lesz (Oeppen & Vaupel, 2002). Egy másik tanulmány, amely az 1950-es évek japán halálozási arányok csökkenésének adatait használta, és ezeken a számokon alapuló előrejelzéseket alkalmazott, még hosszabb, 90,91 év várható élettartamot számolt ki a japánoknál ugyanezre az évre. Az előregedés Európa számára is komoly aggodalomra ad okot, hiszen az Eurostat adatai szerint 2050-re a 65 év fölöttiek száma Európán belül meghaladja a 129 milliót (Eurostat, 2020). Ezek a számok és tendenciák azt mutatják, hogy a népesség előregedése nemcsak közgazdasági kérdés lesz, hanem óriási terhet ró az egészségügyi rendszerekre szerte a világon. Többek között Magyarországra is, hiszen a KSH adatai alapján, míg 2021-ben 326 időskorú jutott ezer 20-64 éves emberre, az előrejelzések szerint 2070-re ez a szám 612 lesz (KSH, 2022). Ennek megfelelően hazánkban is egyre fontosabbak az öregedő társadalmi réteggel végzett kutatások (Czibere I. et al., 2019; Imre S.G. et al., 1999).

Az életkor növekedése csak az érem egyik oldala. Az életkor előrehaladtával egyre sérülékenyebbek leszünk, és ezzel együtt hajlamosabbak a krónikus betegségekre, amelyek jelentősen ronthatják az életminőséget. Az egészséges élettartam annak az életszakasznak a hossza, amely alatt az ember mentes a krónikus betegségektől, és ennek megfelelően funkcionálisan ép (Barzilai et al., 2016). A szív- és érrendszeri, onkológiai, ortopédiai vagy reumatológiai betegségek csak néhány példa, amelyek ronthatják az életminőséget.

A demenciának a prevalenciája az öregedéssel nő (Arvanitakis & Bennett, 2019). A demencia egy komplex szindróma, melynek háttérében számos betegség állhat. A diagnózisához elegendő akár már egy kognitív funkció (pl. nyelv, vagy tanulás és memória) korábbi funkcióhoz képest létrejött jelentős romlása, ha az elegendően súlyos ahhoz, hogy a mindennapi életben is gondot okozzon (Hugo et al., 2014). Nem csoda, hogy ez hatalmas és folyamatosan növekvő terhet ró a társadalomra és a gazdaságra egyaránt, ami miatt számos kutatás indult, mely az egészségi állapot javítását célozta, beleértve a betegek kognitív funkciójának javítását is. Például az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) jelátvitelével és az mTOR-útvonallal végzett manipulációk hatékonynak bizonyultak a gerinctelenek élettartamának és egészségi állapotának meghosszabbításában (Bartke et al., 2001). Ennél is fontosabb, hogy figyelemre méltó sikereket értek el az emlősállatok területén is kalóriakorlátozással, amely módosíthatja az öregedéshez vezető konzervált jelátviteli utakat (de Cabo et al., 2014; Fontana & Partridge, 2015; Fontana et al., 2010). Bár még bőven van hova fejlődni ezen a területen is (túlélés), a demencia (életminőség) rejtélye még kevésbé megoldott.

Nem csak cerebrovaszkuláris, de kardiális kórképek gyakorisága is növekszik az életkorral. Ezek közül pedig kiemelkedő a szívelégtelenség, mely 2020-as adatokat felhasználva világszerte 64,3 millió embert érint, ezzel prevalenciája 1-2% között mozog a fejlett országokban (Groenewegen et al., 2020). Bár kezelésében letagadhatatlanul elképesztő fejlődés volt tapasztalható az elmúlt három évtizedben, egy friss tanulmány a szívelégtelenség típusától függetlenül az 1 éves túlélést 87%-nak, míg a 10 évest 35%-nak becsülte (Jones et al., 2019). Ennek megfelelően érthető, hogy nem csak az eszközös, de a gyógyszeres kezelési lehetőségek is folyamatos fejlesztés alatt állnak.

Dolgozatom első részében az öregedő agy nyújtotta kihívásokkal, valamint a kognitív károsodáshoz vezető lehetséges vaszkuláris patofiziológiai változásokkal foglalkozom, bemutatva kutatócsoportunk eredményeit, melyek a kognitív funkció megőrzését célozzák. Dolgozatom második részében pedig az öregedéssel szintén növekvő prevalenciájú, csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenséggel és annak egyik legújabb kezelési lehetőségével fogok foglalkozni.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. Az öregedő agy

Az emberi agy becslések szerint nagyjából 86 milliárd neuronnal rendelkezik. Ezek a neuronok a központi idegrendszer (CNS) más sejttypusaival együtt, mint például a mikroglia, az oligodendrociták és az asztrociták, egy összetett hálózatot alkotnak, amely végső soron megkülönböztet minket, embereket a többi fajtól (Iadecola, 2017; Kisler, Nelson, Montagne, et al., 2017; Kisler, Nelson, Rege, et al., 2017). Bár az agynak óriási energiaigénye van, maga a szövet nem képes tápanyagot tárolni, így működése teljes mértékben az érrendszerétől függ. Az agy vérellátástól való függősége egy jól szabályozott érrendszert eredményez, amelyben az artériák, arteriolák, kapillárisok, venulák és vénák egy hozzávetőleg 650 km hosszú hálózatot alkotnak (Sweeney et al., 2018). A cerebrovaszkuláris és kardiovaszkuláris betegségekben ugyanazok a kockázati tényezők jelennek meg, mint például a magas vérnyomás, a hypercholesterinaemia, és a diabetes mellitus, amelyek prevalenciája az életkor előrehaladtával növekszik (Ungvari et al., 2020). A cerebrovaszkuláris patofiziológiával kapcsolatos kutatások legújabb eredményei szintén aláhúzták a vaszkuláris patológiák és az agyi betegségek, például a demencia közötti összefüggést, amely egy olyan betegséghez vezet, amelyet vaszkuláris kognitív károsodásnak (VCID) neveznek (Gorelick et al., 2011). A kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris betegségek továbbra is a vezető halálokok között szerepelnek, de fontos az is, hogy amennyiben nem halálhoz vezetnek, úgy súlyos, hosszú távú rokkantságot, jelentős életminőség romlást okozhatnak (Roth et al., 2020). Ez pedig nemcsak sok idős ember életminőségének kritikus változását jelenti, hanem a gazdaságot is károsan érinti.

Pusztán a demencia csaknem 50 millió embert érintett 2018-ban, ami becslések szerint egymilliárd dolláros költséget jelentett (Patterson, 2018). Jól ismert és széles körben vizsgált szerepe van a makrovaszkuláris betegségeknek (pl. atherosclerosis) az életkorral összefüggő cerebrovaszkuláris betegségek patogenezisében, de az utóbbi években a mikrovaszkuláris patológiák jelentősége is reflektorfénybe került (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). Mindezekkel mellett az öregedéssel párhuzamosan a véragyagát (BBB) károsodása is megjelenik és mértéke fokozódik, mely szintén a vaszkulátúra szerepére irányítja a figyelmet (Knox et al., 2022). A véragyagát sérülése

pedig következményes neuroinflammációhoz vezet, mely hatással lehet a kognitív funkcióra bizonyos idő elteltével. Sőt, a BBB károsodása korai biomarkere lehet a kognitív funkció csökkenésének, ennek megfelelően a BBB-t károsító mechanizmusok megértése kulcsfontosságú (Nation et al., 2019). Mivel az öregedés nemcsak szerkezetileg, hanem funkcionálisan is negatívan befolyásolja a mikrokeringést, káros hatással lehet a szövetek oxigénellátására, a tápanyagszállításra és a salakanyagok eltávolítására (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). Az idős kor által előidézett változások azonban nem csak az érrendszerre, hanem a vér rheológiai tulajdonságaira is negatív hatással vannak, ami tovább fokozhatja a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris betegségek rizikóját (Kovacs et al., 2006). Az érrendszeri öregedés káros folyamata elleni terápiák kidolgozásához ismernünk kell az öregedési folyamat során bekövetkező, a betegség kialakulását elősegítő funkcionális és sejtszintű molekuláris változásokat.

II.1.1. A Cerebrovaszkuláris öregedés feltételezett mechanizmusai

Továbbra is vita tárgyát képezi, hogy az öregedés miként befolyásolja az érrendszert. Az öregedés maga egy betegség, vagy csak az érrendszer egészségét befolyásoló összes tényező elhúzódó kitettsége a negatív hatásoknak? Egy anekdota szerint Thomas Sydenham, a 17. századi angol orvos azt mondta, hogy az ember annyi idős, mint az artériái. Az érrendszeri öregedés és annak sebessége személyenként változik, sok tényezőtől függően, mint például a genetika, a környezet és a kockázati tényezők, de sok közös út is létezik. A következő néhány bekezdésben az érrendszeri öregedés különböző aspektusait kívánom röviden – a téma nagyságát is figyelembe véve, a teljesség igénye nélkül - ismertetni, elsősorban azokra a témákra összpontosítva, amelyekkel az általam elvégzett kísérletek foglalkoztak.

II.1.1.1. Oxidatív és nitrozatív stressz

A reaktív oxigéngyökök (ROS), köztük a szuperoxid gyök (O_2^-), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxilgyökök ($\bullet OH$) és a szinglet oxigén ($\bullet O_2$) mind lehetnek biológiai rendszerek termékei, fiziológiás anyagcsere-folyamatok során keletkezve. Az eddig összegyűjtött hatalmas mennyiségű bizonyíték alapján ismert, hogy a ROS oxidatív stresszhez vezethet, ha a ROS termelése és az antioxidáns sejtszerkezetek aktivitása között bármilyen egyensúlyhiány van (Pizzino et al., 2017). A szabad gyökök szerepét

az öregedési folyamatban először Danham Harman javasolta az 1950-es években, és azóta is széles körben tanulmányozzák (Harman, 1956). Bizonyíték van arra, hogy a NADPH-oxidázok (Adler et al., 2003; Csiszar et al., 2002) és a mitokondriumok (Csiszar et al., 2014) által termelt reaktív oxigénfajták (ROS) nem csak endoteliális diszfunkciót okozhatnak, hanem a nagy artériák öregedéssel járó elmerevedését („stiffening”) is, állatmodellekben (Winder et al., 2021) és ember esetében is (Donato et al., 2018; Mitchell et al., 2004).

A vaszkuláris endotéliumnak számos szerepe van, beleértve a gyulladásgátló és antithrombotikus hatást. A megnövekedett oxidatív stressz az érrendszerben az endotéliumból származó nitrogén-monoxid inaktiválásához vezet, ami következetesen a szöveti perfúzió szabályozási zavarát okozza az endotél-függő értágulati hatások csökkenése és fokozott érszűkítő hatás következtében (Cardillo et al., 2000; Donato et al., 2009). A ROS endotéliumra gyakorolt káros hatása nemcsak a szívkoszorúér-, hanem az agyi artériákban is jelen van, ami potenciálisan neurovaszkuláris szétkapcsoláshoz vezethet (Iadecola, 2017; Tarantini, Tran, et al., 2017). A neurovaszkuláris szétkapcsolás azt jelenti, hogy károsodik a véráramlás pillanatról pillanatra történő alkalmazkodása a neuronok oxigén-igényéhez. Erre a dolgot további részeiben részletesen kitérek majd.

A reaktív nitrogéngyökök (RNS) főként nitrogén-monoxid és szuperoxid reakciójával jönnek létre, melynek eredményeképpen peroxinitrit (ONOO^-) képződik. A peroxinitrit felelős számos ROS által közvetített hatásért a gyulladással járó jelátviteli pályák aktiválása, a mitokondriális funkció károsodása és közvetlen citotoxikus hatások révén (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). A redox-érzékeny jelátviteli utak kulcsszerepet játszanak a ROS és az RNS érrendszerre gyakorolt hatásában, ami valószínűleg érrendszerben lokalizáltan megjelenő gyulladáshoz, következésképpen érelmeszesedéshez, aneurizma képződéshez, valamint vérzésekhez is vezethet.

II.1.1.2. Vaszkuláris gyulladás

A vaszkuláris gyulladás során a ROS a proinflammatorikus jelátviteli folyamatok aktiválásához vezet, beleértve az NF- κ B közvetített utat (Ungvari et al., 2007). Ahogy a ROS helyi gyulladáshoz vezet az érfalban, ez a folyamat további ROS képződéshez vezethet, ami ördögi kört eredményezhet (Siti et al., 2015).

A megnövekedett vaszkuláris gyulladás számos különböző vaszkuláris kórképekhez vezethet, amelyek mind a makro-, mind a mikrovaszkulaturát érintik, mint például fokozott atherogenesis, mikrovaszkuláris diszfunkció, vér-agy gát diszfunkció, fokozott lokális szöveti gyulladás és aneurizma képződés (Csiszar & Ungvari, 2008). Az öregedés önmagában a gyulladást elősegítő génexpresszió növekedését okozza mind az ér endotéliumában, mind a simaizomsejtekben, helyi gyulladásos mikrokörnyezetet generálva az érrendszerben, ami végső soron érrendszeri diszfunkcióhoz és károsodott sejtanyagcseréhez vezet, ezzel hozzájárulva az érbetegségek kialakulásához (Cernadas et al., 1998; Csiszar et al., 2003). Az érgyulladásról ismert, hogy elősegíti az endotél diszfunkciót, ami a szív- és érrendszeri kockázati tényezők sarokköve, valamint ismert, hogy elősegíti az atheroszklerózis kialakulását is (Hadi et al., 2005). Az endotelin-1 túlzott expressziója, amely az endotél diszfunkció egyik jellemzője, oxidatív stresszhez és megnövekedett NADPH-oxidáz aktivitáshoz vezethet, ami végső soron növeli a szuperoxidszintet és ONOO⁻ termelést és az NO szint csökkenését eredményezi. Ez a mechanizmus csak egy az oxidatív stresszt és a csökkent NO biológiai hozzáférhetőségét összekötő sok folyamat közül, ami hozzájárul a szív- és agyi érrendszeri betegségek kialakulásához.

A gyulladásos citokinek és kemokinek fokozott termelésének másik mechanizmusa az endoteliális öregedés, amely az endotélsejtek öregedéssel kapcsolatos szekréciós fenotípusát (SASP) eredményezi. A SASP indukciójában az NF-κB is részt vesz (Ungvari et al., 2011; Ungvari et al., 2013).

II.1.1.3. Mitokondriális diszfunkció

Bár a disszertációban – kísérletes szinten - nem térek ki részletesen a mitokondriális diszfunkció szerepére, elkerülhetetlen a megemlítése az öregedésben betöltött szerepe miatt. A ROS-t részben a mitokondriumok állítják elő, és ennek eredményeként a mitokondriális ROS (mtROS) szintén fontos szerepet játszik az érrendszeri öregedésben. Az mtROS nagy része akkor keletkezik, amikor az elektronok az elektrontranszport láncból közvetlenül az oxigénhez jutnak, ami szuperoxid képződéséhez vezet, amelyet később a szuperoxid-dizmutáz (SOD) H₂O₂-vé alakít (Cui et al., 2012). A vaszkuláris sejtek mitokondriumából származó H₂O₂ is az NF-κB növekedéséhez vezethet, ezáltal serkenti a gyulladást az érfalban (Ungvari et al., 2007). A megnövekedett mtROS negatív visszacsatolással a mitokondriális

funkció tartós károsodásához vezethet, és így káros hatással lehet a sejtek anyagcseréjére (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). Sőt, mivel a mitokondriumok kulcsszerepet játszanak az apoptózis folyamatának szabályozásában, bizonyos módosítások – például a permeabilitás pórusainak átmeneti megváltozása – sérülékennyé tehetik a sejteket az apoptotikus jelátvitelt kiváltó hatásokkal szemben (Cui et al., 2012). Az öregedés előrehaladtával nő az mitokondriális DNS (mtDNS) károsodásának lehetősége, ami egy D-hurok nevű régiót is érint, amelyről úgy gondolják, hogy az mtDNS replikációért és transzkripcióért felelős, így az öregedés káros hatással van ezekre a mechanizmusokra is. Az mtDNS más régióinak károsodásáról is beszámoltak, mint például a NADPH-dehidrogenáz vagy citokróm-c-oxidáz alegységeit kódoló régiók, amelyek a ROS által közvetített mechanizmusokon keresztül további lehetséges káros hatásokhoz vezethetnek (Cui et al., 2012).

II.1.1.4. Antioxidáns mechanizmusok és az Nrf2, valamint az IGF-1 szerepe

Nemcsak a megnövekedett oxidatív stressz és a proinflammatorikus utak aktiválódása, hanem a károsodott ROS és RNS elleni védekezési mechanizmusok is hozzájárulhatnak az életkorral összefüggő érelváltozásokhoz. Számos különböző enzimatis és nem enzimatis antioxidánszt írtak le. Az egyik család a szuperoxid-diszmutázok (SOD), amelyeknek négy különböző altípusa van, nevezetesen a réz-cink SOD (CuZnSOD), a mangán SOD (MnSOD), a vas SOD és a nikkel SOD. A CuZnSOD és az MnSOD a citoplazmában, illetve a mitokondriumokban lokalizálódik. Ismeretes, hogy az SOD szintje csökken az életkorral, ami kulcsfontosságú eleme lehet az idősök oxidatív stresszel szembeni sebezhetőségének (Younus, 2018). Az SOD-ok fő hatásmechanizmusa az O_2^- átalakítása H_2O_2 -vé. A H_2O_2 korábban bemutatott negatív hatásai miatt fontos a semlegesítés is. Ezért a kataláz enzim felelős (Mueller et al., 1997; Muzykantov, 2001).

Újabb felfedezés, hogy az érrendszeri védekezési mechanizmusok károsodhatnak Nrf2 diszfunkció esetén is (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). Az Nrf2 egy redox-érzékeny transzkripció faktor, amely pozitívan szabályozza a ROS-t méregtelenítő enzimeket, és szabályozza azokat a tényezőket is, amelyek felelősek a ROS által kiváltott molekuláris károsodások helyreállításáért (Suh et al., 2004).

A normális működés során az Nrf2 a citoplazmában a Kelch-szerű ECH-asszociált fehérjével 1 (Keap 1) való kölcsönhatás révén kötődik meg, és a Keap 1

elősegíti az Nrf2 ubiquitin által közvetített lebomlását. A megnövekedett oxidatív stressz a Keap1 és Nrf2 oxidációját és foszforilációját eredményezi, ez az Nrf2 felszabadulásához és a sejtmagba való vándorlásához vezet, ahol az antioxidáns válaszelemekhez kötődik. A CREB (cAMP-responsive element binding protein) kötő fehérje (CBP) modulációja szintén a Nrf2 aktiválásához vezethet. A Nrf2-nek számos célgénje van, köztük a NAD(P)H kinon-oxidoreduktáz-1 (NQO-1) és a hem-oxigenáz-1 (HO-1). Ezen hatások alapján nyugodtan kijelenthető, hogy az Nrf2 sokrétű antioxidáns és öregedésgátló érvédő hatása van. Az Nrf2 protektív hatást fejt ki az endotélsejtekre azáltal, hogy csillapítja a vaszkuláris oxidatív stresszt és korlátozza a szabad gyökök által kiváltott sejtkárosodást (Csiszar et al., 2012; Ungvari et al., 2019; Valcarcel-Ares et al., 2012). Ezenkívül a sejtek öregedésének indukcióját az Nrf2 által közvetített útvonalak is gátolhatják (Kapeta et al., 2010; Volonte et al., 2013). Zhou et al. kimutatták, hogy az exenidin-4 (amely egy glukagonszerű peptid-1 analóg) képes aktiválni az Nrf2-t, és így az angiotenzin-II által közvetített vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC) öregedésének gátlásához vezet (Zhou et al., 2016).

Munkacsoportunk egy korábbi cikkében részletesen írtunk az Nrf2 szerepéről. A cerebromicrovascularis endotél sejtekben az oxidatív stressz és a DNS-károsodás által kiváltott biológiai öregedést többek között egy olyan jelátviteli útvonal is szabályozza, amely a p16INK4a (CDKN2A) és a p21 (CDKN1A) ciklinfüggő kináz inhibitorok indukciójához vezet. Kísérleteinkben mi is azt találtuk, hogy öregedésben ezen jelátviteli útvonalak aktiválódnak, mely aktivációt a Nrf2 hiánya tovább fokozza. Emellett az Nrf2 KO egerekben endotél diszfunkciót, több SASP-faktor, köztük a citokinek, kemokinek, az IGF-1-kötő fehérjék és a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) expressziójának fokozódását és következményes lokális gyulladást, valamint a vér-agy gát sérülését tapasztaltuk (Fulop et al., 2018).

Az Nrf2 és az IGF-1 kapcsolata azért is fontos, számos bizonyíték utal arra, hogy az életkorral összefüggő endokrin IGF-1-hiány és az érrendszeri Nrf2-diszfunkció az öregedés során okozati összefüggésben áll egymással (Ungvari et al., 2012). Az IGF-1 a növekedési hormon (GH) által szabályozott tengelyen helyezkedik el és maga is növekedési hormon, mely az inzulin szerű peptidok családjába tartozik. Ezzel párhuzamosan nem meglepő, hogy a GH-hoz hasonlóan az IGF-1-nek is csökken a szintje az életkor előrehaladtával, azonban számos bizonyíték felhalmozódott arra vonatkozóan, hogy az IGF-1 hiány fokozza a kardiovaszkuláris rizikót, azonban ennek

mechanizmusa jóval kevésbé ismert, mint az Nrf2 szerepe (Ungvari et al., 2012; Laron, 2001).

II.1.1.5. Biológiai öregedés (senescence)

Az erek életkorral összefüggő változásai közé tartozik a tágulékonyág csökkenése, a lokális gyulladás kialakulása és döntően az endotél diszfunkción keresztül az antitrombotikus hatás háttérbe szorulása. A senescence által létrehozott változások és lokális mikrokönyezet nagyban átfed ezen átalakulásokkal (Minamino & Komuro, 2007). A sejteket öregedésük során számos endogén és exogén stresszor éri. Ezek hatására a sejtek egy része leállítja a sejtciklust és jellegzetes fenotípusos elváltozásokon megy keresztül, melynek része a jelentős proinflammatorikus hatás, ami döntően citokinek termelésén keresztül valósul meg (SASP, korábban már említve). Egyes tanulmányok szerint a p16INK4A-t expresszáló öregedő sejtek eliminációja meghosszabbítja egerek élettartamát és javítja egészségi állapotukat, ami arra utal, hogy a sejt-szintű senescence alapvető szerepet játszik az öregedéssel összefüggő élettani hanyatlásban. A rendelkezésre álló bizonyítékok azt mutatják, hogy az endotél senescence is hozzájárul az endotél diszfunkciójához az öregedés során. A besugárzás által kiváltott, DNS-károsodás által közvetített öregedés egérmodelljeivel végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a sejt öregedésének indukciója a neurovaszkuláris kapcsolás károsodásához és cerebromicrovascularis diszfunkcióval és a mikrovaszkuláris felritkulásával jár, utánozva az öregedési fenotípust (Ungvari, Tarantini, et al., 2018). Ezen felül kutatások arra is utalnak, hogy az atherosclerotikus elváltozások is tartalmaznak senescence sejteket, melyek elősegítik az atherogenezist és hozzájárulnak a plakk instabilitásához az érgyulladás súlyosbításán és a matrix metalloproteinázok szabályozásán keresztül (Childs et al., 2016; Gardner et al., 2015).

II.1.1.6. Az agyi vénás keringés potenciális szerepe

Az összegyűjtött adatok a vaszkuláris károsodásokat tekintve az adatok az artériás kórképek döntő szerepére utalnak, amit az is alátámaszt, hogy az agyi érrendszer egészségének megőrzésével megelőzhetjük a kognitív hanyatlást is (Dichgans & Leys, 2017). Ezzel szemben az alacsony nyomású, alacsony áramlási sebességű

vénás rendszerről és károsodásainak potenciálisan kognitív diszfunkciót okozó hatásairól nagyon korlátozott ismereteink vannak.

Az agy vénás keringése a felületes, más néven kortikális és a mélyvénás rendszerből áll. A felületes rendszer felelős a vénás vér elvezetéséért a kéregből és a felszíni fehérállományból, főként a sinus sagitalis superiorba és a sinus cavernosusba. A belső agyi vénákból, valamint Rosenthal és Galen vénából álló mélyvénás rendszer a mély fehérállományt, a laterális és a harmadik kamrát, valamint a bazális ciszterna területét vezeti el a sinus rectus felé (Fulop et al., 2019). Az agy vénás rendszere nem csupán egy csővezeték, amely passzívan vezeti le a vénás vért, hanem „szélkazánként” is szolgál, azaz csökkenti az artériás pulzusnyomást/pulzushullámot a koponyán belül, emellett aktívan hozzájárul a cerebrospinális folyadék (CSF) keringéséhez, és újabb kutatások szerint akár az agyi nyirokkeringés (glimfatikus keringés) dinamikáját is befolyásolhatja (Brinker et al., 2014; Jessen et al., 2015). Ennek eredményeként az agy vénás keringésének szerkezeti és funkcionális változásai számos élettani funkcióra hatással lehetnek. A szerkezeti változások közé tartozik a vénás kanyargósság, amelyet 7T-MRI-vel vizualizáltak korai Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél (Bouvy et al., 2017). A vénás kanyargósságnak számos lehetséges oka lehet, beleértve a jugularis vénás refluxot és az ebből eredő koponyán belüli vénás nyomásnövekedést, vagy a vénás fal kor előrehaladtával történő átépülését (Fulop et al., 2019), amelyek esetleg átfedésben vannak a funkcionális elváltozások okaival, mint például a CSF keringésének károsodása. A szakirodalom azt sugallja, hogy az agyi vénás keringésben bekövetkező káros változások hozzájárulhatnak olyan kórképekhez, mint a leukoaraiosis, agyi mikrovérzések, sclerosis multiplex vagy agyi mikroinfarktus (Fulop et al., 2019). Különösen a siettetett és meglehetősen alultervezett klinikai vizsgálatok közelmúltbeli buktatói miatt (Comi et al., 2013; Valdueza et al., 2013; Zamboni, 2006) nagyon fontos a téma részletes megismerése és tanulmányozása, mielőtt potenciális klinikai kezelési terveket állítanánk fel.

II.1.1.7. Az érrendszeri remodelling

Ismert, hogy életkorral az erek számos passzív tulajdonsága is megváltozik. Ezek közül talán a legismertebb a carotis intima-media vastagság korral összefüggő növekedése, melynek hátterében részben a magas vérnyomás állhat. Hasonló elváltozások nem csak az a. carotisban, de az alsó és felső végtag perifériás ereiben

is megjelennek (Thijssen et al., 2016). A nagyobb elasztikus artériákban a kollagéntartalom növekedése, a kollagén térhálósodása, valamint a meszesedés és az elasztintartalom csökkenése jelenik meg az öregedéssel (Avolio et al., 1985). Az életkorral összefüggő változások a pulzushullám terjedésében pedig az erek elmerevedésére, a compliance csökkenésére utalnak (Avolio et al., 1985). Ennek az oka részben szintén mechanikai tényezőkre (pl. magas vérnyomás) vezethető vissza, de szerepet játszhatnak benne az életkorral érfalban növekvő mértékben jelenlévő glikációs végtermékek is (advanced glycation end products – AGEs) (Oudegeest-Sander et al., 2013). Mindezen változások nem csak funkcionális változásokat eredményeznek az erekben, hanem kardiovaszkuláris eseményeket is előrejelezhetnek (Thijssen et al., 2016).

II.2. A Szívelégtelenség

A szívelégtelenség egy komplex klinikai szindróma, melyet típusos tünetek (fáradékonyosság, csökkent terhelhetőség, nehézlégzés) és típusos jelek (perifériás és tüdőödéma, megemelkedett juguláris vénás nyomás) jellemeznek. Mindezen tünetegyütteshez a szív strukturális és/vagy funkcionális elváltozása járul hozzá, mely megemelkedett intrakardiális nyomáshoz és/vagy csökkent perctérfogathoz vezet (McDonagh et al., 2021).

A szívelégtelenség igen sokrétű a betegség az etiológiáját tekintve. Kialakulásának oka lehet primeren a myocardium betegsége (koronária betegség, cardiomiopátiák, tárolási betegségek stb.), illetve többek között billentyű betegségek, aritmiák, vezetési zavarok, kongenitális szívbetegségek, genetikai okok. A teljesség igénye nélkül, a szívelégtelenség formák csoportosítása leggyakrabban az etiológia vagy a bal kamrai ejekciós frakció alapján történik. Ha a bal kamrai ejekciós frakció $\leq 40\%$, akkor csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségről beszélhetünk (HFrEF – korábbi nevén szisztolés szívelégtelenség), ha az ejekciós frakció $40\%-50\%$ közé esik akkor középérték ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségről beszélhetünk (HFmrEF), ha pedig az ejekciós frakció $\geq 50\%$, akkor megtartott bal kamrai ejekciós frakcióval járó szívelégtelenséggel állunk szemben (HFpEF – korábbi nevén diasztolés szívelégtelenség).

Európában a szívelégtelenség incidenciája 5/1000 személy-év a felnőtt lakosságot vizsgálva, míg prevalenciája 1-2% ugyanebben a korcsoportban.

Tekintettel arra, hogy a betegség sokszor alul-diagnosztizált, a valós prevalenciája ennél feltehetően jóval magasabb. Fontos, hogy a prevalencia a korral növekszik, azaz míg 55 éves kor alatt az előfordulása 1% körüli, 70 éves kor fölött meghaladja a 10%-ot az európai lakosságot vizsgálva (McDonagh et al., 2021).

II.2.1. Csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (HFrEF) és kezelési lehetőségei – a pozitív inotrópia szerepe

Jelen dolgozat terjedelme nem teszi lehetővé a HFrEF kezelési lehetőségeinek részletes tárgyalását, de azt mindenképpen fontosnak tartom megemlíteni, hogy az utóbbi évtizedben mind a gyógyszeres, mind pedig az eszközös kezelési lehetőségek óriási fejlődésen mentek keresztül. A krónikus szívelégtelenség terápiájában kulcsszerepet játszó angiotenzin-konvertáló enzim gátlók (ACE-gátlók), béta-blokkolók és mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA) mellett az angiotenzin-receptor blokkoló/nepirilizin inhibitor kombináció (ARNI) és a nátrium-glükóz kotranszporter 2 gátlók (SGLT 2 gátlók) is hatásosnak bizonyultak. Eszközös terápiát tekintve fontos kiemelni a beültethető defibrillátorok (ICD) és a reszinkronizációs terápia (CRT-P és CRT-D) szerepét (McDonagh et al., 2021).

A fentebb említett neurohormonális aktivációt blokkoló szerek mellett a szívelégtelenség gyógyszeres kezelésének a másik oszlopa a kontraktilitás fokozása lehetne, pozitív inotróp hatású szerek által. A pozitív inotróp hatású szereket három fő csoportba oszthatjuk: „upstream”, „centrális” és „downstream” mechanizmus útján ható szereket különböztethetünk meg. Az „upstream” csoportba sorolhatók a tradicionális pozitív inotróp szerek, úgy mint a digoxin, a dobutamin, valamint a milrinon. A digoxin a szarkolemmában található $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő csatorna működését gátolja, a dobutamin a β -adrenerg receptor agonista, míg a milrinon foszfodiészteráz inhibitor. Ezen tradicionális pozitív inotróp szereknek azonban amellet, hogy használatukra csak intravénás módon van lehetőség egyéb hátrányaik is vannak. Legfőbb hátrányuk, hogy ATP igényes folyamatokat szabályoznak, növelik a szívfrekvenciát, ezáltal a szívizom oxigénfogyasztását és klinikailag jelentős aritmiák kialakulásához vezethetnek. Ennek megfelelően klinikai gyakorlatban döntően alacsony perctérfogattal és alacsony vérnyomással járó akut szívelégtelenségben szenvedő betegek esetén van létjogosultsága a jelenlegi pozitív inotróp szerekkel történő kezelésnek.

Tekintettel arra, hogy a tradicionális pozitív inotróp szerek negatív hatásai döntően az intracelulláris kalcium szint emelkedésén keresztül alakulnak ki, kutatások indultak a kalcium-érzékenyítő, valamint a közvetlenül miozint aktiváló szerek kifejlesztésére. A „centrális” mechanizmus útján ható szerek a troponin C (TnC) fehérje kalcium iránti affinitását képesek fokozni, azaz kalcium-érzékenyítő hatásúak. Ilyen szer a levosimendan, mely a pozitív inotróp hatásain túl az ATP-szenzitív káliumcsatornákat is aktiválja, ezáltal vazodilatációhoz vezet. Szintén csak intravénás alkalmazása lehetséges, ezen felül hipotenziót és feltehetően a szérum kálium szint változásán keresztül – ugyan kisebb valószínűséggel, mint a tradicionális pozitív inotróp szerek – aritmiát is kiválthat (Antila et al., 2007).

A szívizom-szarkomer aktivációja a kalcium-regulációs fehérjék aktivációján túl a miozin direkt aktivációján keresztül is létrejöhet. A „downstream” mechanizmus útján ható szerek, mint például a miozin aktivátorok, elméletben nem befolyásolják az intracelulláris kalcium szintet, ezáltal mentesek az „upstream” hatású szerek mellékhatásai alól. Ilyen szer például az omecantiv mecarbil (OM).

II.2.2. Az omecantiv mecarbil hatásmechanizmusa és a klinikai vizsgálatok tapasztalatai

Ahhoz, hogy megértsük az OM hatásmechanizmusát, fontos röviden összefoglalni a szívizom szarkomer felépítését és működését. A szarkomer vékony és vastag filamentumokból áll, melyek egymásba fonódnak. A vastag filamentum fő alkotóeleme a miozin és a mizonkötő C-protein, míg a vékony filamentumok fő alkotóeleme az aktin a tropomiozin és a troponin (troponin C, troponin I és troponin T). Nyugalmi állapotban, mikor alacsony az intracelulláris kalciumszint, a troponin-tropomiozin komplex blokkolja az aktin és a miozin közötti kereszthidak kialakulását. A szívizomsejt depolarizációja további kalcium felszabadulásához vezet a szarkoplazmatikus retikulumból, mely kalcium aztán a troponin C-hez kötődik és tropomiozin elmozdulását eredményezve lehetővé teszi az aktin-miozin kereszthíd kialakulását. Miután a miozin az aktinhoz kötődött (a miozin feji része által), az ATP hidrolízise során felszabaduló energiát erőgeneráló konformációs változásra használja fel és a szarkomer megrövidülését idézi elő. A kalcium ezt követően energiaigényes módon visszakerül a szarkoplazmatikus retikulumba és a ciklus újraindul. Az aktin-miozin ciklus kulcsfontosságú a szívizom erőgenerálása szempontjából és igen intenzív

kutatások tárgyát képezte az utóbbi időben. Miután az ATP kötődik a miozinhoz, az gyorsan leválik az aktinról, majd hidrolizálja a megkötött ATP-t ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$), ami által egy gyenge kötődés jön létre az aktin és miozin között. Ezt követően az aktin-miozin-ADP- P_i komplex egy aktivációs lépés által erősen kötött formává alakul, miközben a P_i disszociál a komplexről. A P_i disszociációja a miozin fej konformációs változását is előidézi, miáltal egy közel 10 nm-es összehúzódás is létrejön. Ezzel egy időben az ADP is disszociál a komplexről és az ATP kötődésével a miozin ismét rapidan disszociál az aktinról, hogy a ciklus újra tudjon kezdődni (Malik & Morgan, 2011; Teerlink, 2009).

A szarkomer jelentős mennyiségű miozin fejet tartalmaz, melynek csak egy kisebb része vesz részt az összehúzódásban (erőgeneráló konformációs lépésben) szívciklusonként. Az OM szelektíven aktiválja a miozin fej S1 domain-ját, ami által felgyorsítja az ATP-hidrolízist. A fentieknek megfelelően, amíg az ATP-miozin komplex pusztán gyengén kötődik az aktinhoz, a hidrolízist követően létrejött ADP- P_i -miozin komplex erősen kötődik az aktinhoz a P_i disszociációja által, mellyel párhuzamosan az erőgeneráló lépés is létrejön. Mindezek alapján az OM fokozza az erős aktin-miozin kötéseket (az erőgeneráló lépés) létrejöttének számát, azaz növeli az aktinnal kapcsolatba kerülő miozin fejek számát, másképp fogalmazva „több evező húzza majd a csónakot”.

Az első humán vizsgálat eredményeit közel 10 évvel ezelőtt publikálták. A kettős vak, placebo kontrollált fázis I. vizsgálat során egészséges egyéneken tesztelve a szert azt tapasztalták, hogy az OM dóziszfüggő módon javította a szisztolés funkciót (ejekciós frakció és frakcionált rövidülés növelése), valamint szintén dóziszfüggő módon nyújtotta a szisztolés ejekciós időt is. Mellékhatások 0,625 mg/kg/óra dózis fölött jelentkeztek, ugyanis ezen érték fölött a szisztolés ejekciós idő annyira megnyúlt, hogy az a koronáriaperfúzió romlásához vezetett (Teerlink et al., 2011). Fontos, hogy szívelégtelen betegeken is hasonló eredményeket találtak, egy szintén kis elemszámú fázis II. vizsgálatban. Ennek során mintegy 45 beteget vizsgáltak és a szisztolés funkció javulása mellett azt találták, hogy 1200 ng/ml plazmakoncentráció fölött jelentősen nőtt a miokardiális iszkémia veszélye (Greenberg et al., 2015). Az OM-el mindeddig három jelentősebb betegszám bevonásával lefolytatott fázis III. vizsgálat ismert: az ATOMIC-HF, a COSMIC-HF és a GALACTIC-HF. Az ATOMIC-HF-ben 600 főt meghaladó, csökkent bal kamrai ejekciós frakcióval járó szívelégtelen betegen placebo kontrolláltan vizsgálták a szer hatását, azonban az elsődleges végpont

(nehézlégzés javítása) nem bizonyult szignifikánsnak. Fontos kiemelni, hogy azokban a betegekben akiknél a legmagasabb dózisban alkalmazták az OM-et jelentős javulás volt elérhető a nehézlégzés csökkentésében, bár a korábbi vizsgálatok alapján a magas OM plazmakoncentráció káros hatásokkal is bírhat. Ugyanakkor az ATOMIC-HF esetén nem találtak érdemi különbséget a mellékhatásprofil tekintetében a két csoport között (Teerlink et al., 2016).

A COSMIC-HF esetében az egyik fő különbség az ATOMIC-HF vizsgálathoz képest, hogy az OM-et tablettaként adagolták, ami a pozitív inotróp szerek esetében egy jelentős előrelépés. A vizsgálat kettős vak, placebo kontrollált volt, melybe megfelelően kezelt (OMT) csökkent bal kamra funkcióval járó szívelégtelen betegeket (NYHA II-III) válogattak be. A primer végpontot az OM plazmában mért koncentrációja jelentette. A fix OM dózison kívül volt egy farmakokinetikai szempontok szerint titrált OM dózist szedő csoport is. Érdekes, hogy a placebohoz képest csak a farmakokinetikai szempontok szerint titrált OM dózist szedő csoport esetében volt szignifikáns különbség: a szisztolés ejekciós idő és a verőtér fogat nőtt, míg a végdiasztolés, végszisztolés átmérők, valamint a szívfrekvencia és az NT-proBNP csökkent (Teerlink et al., 2016).

A GALACTIC-HF vizsgálat eredményeit 2021-ben publikálták. A kettős vak, placebo kontrollált fázis III. vizsgálat primer végpontja egy kompozit végpont volt, mely az első szívelégtelenség eseményből (hospitalizáció vagy sürgős ambuláns megjelenés) és kardiovaszkuláris halálozásból állt össze. Szekunder végpont volt az összhalálozás, a kardiovaszkuláris halálozás, illetve a Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) pontszám. Míg a primer végpont esetében 8%-os abszolút rizikócsökkenést ért el az OM a placebo csoporthoz képest, a szekunder végpontok esetében nem mutatkozott különbség. Érdekes, hogy – ugyan nem szignifikánsan – de az OM növelte a szívfrekvenciát és a szérum troponin szinteket, bár a mellékhatásprofil tekintve nem volt különbség az OM és a placebo között (Teerlink et al., 2021).

A fentiek alapján kérdéses, hogy a magas OM plazmakoncentráció potenciális veszélyeit képes-e ellensúlyozni az általa nyújtott klinikai haszon. Kísérleteinkben célunk volt az OM *in vitro* és *in vivo* hatásainak vizsgálata, mind hemodinamikai, mind pedig elektrofiziológiai mérések által.

II.2.3. Célok

Dolgozatom egyik részében a cerebrovaszkuláris öregedés megértésének két különböző aspektusára fókuszáltam, és arra, hogy ez hogyan járulhat hozzá a kognitív hanyatláshoz:

1. Az életkorral ismertén csökkenő IGF-1 szerepének karakterizálása a vaszkuláris remodellingben és a vaszkuláris öregedésben;
2. Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban.

PhD munkám további kísérleteiben pedig az OM hatásainak pontosabb megértésére koncentráltam:

3. A HFrEF kezelésére kifejlesztett direkt miozin aktivátor Omecamtiv Mecarbil *in vivo* és *in vitro* hatásai.

III. Metodikák

III.1. Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben

III.1.1. Felnőttkori IGF-1-hiány előidézése egerekben

A kísérlethez az Igf1 gén floxolt 4. exonjára homozigóta hím egereket (Igf1f/f; C57BL/6 háttérben) használtunk, amelyeket a Jackson Laboratories-tól vásároltunk. Ezekben az egerekben az Igf1 gén teljes 4. exonját loxP helyek szegélyezik, lehetővé téve ennek az exonnak a genomikus kivágását Cre-rekombináz által. A megváltozott Igf1 gén által átirított fehérjék nem kötődnek az IGF-1 receptorhoz. A keringő IGF-1 a májban termelődik. Kutatócsoportunknak sikerült keringő IGF-1 hiányt indukálni Igf1f/f egerekben a Cre rekombináz adeno-asszociált vírus (AAV8) által közvetített expressziójával a májban 4 hónapos egerekben, amint arról korábban már beszámoltunk (Tarantini, Valcarcel-Ares, et al., 2017). Az IGF-1 hiány korai életkorban megjelenő hatása a törpeség, ezért volt szükség az adenovirális rendszer használatára. Ennek elkerülése érdekében felnőtt állatokban indukáltuk az IGF-1 hiányt: (testtömeg 10 hónapos korban; kontroll: 29 ± 1 g, IGF-1 $27 \pm 0,5$ g). Az AAV8 vektort a University of Pennsylvania Viral Vector Core-tól (Penn Vector Core, Philadelphia, PA; <http://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore>) vásároltuk. Mivel az AAV8 érinthet több szervet is, tiroxin-kötő globulin (TBG) promotert használtunk, hogy az expressziót a májsejtekre korlátozzuk. Az alkalmazott modellt korábban validáltuk (Toth et al., 2014). 4 hónapos korukban az Igf1f/f egereket véletlenszerűen két csoportba osztottuk, és körülbelül $1,3 \times 10^{10}$ AAV8-TBG-Cre vagy AAV8-TBG-eGFP vírusrészecskét adtunk be retro-orbitális injekcióval a leírtak szerint (Toth et al., 2014).

Az állatokat az Oklahoma Egyetem Egészségtudományi Központjának (OUHSC) rágcsáló-létesítményében tartottuk, meghatározott kórokozó-mentes körülmények között, 12 órás világos/12 órás sötét ciklusban, igény szerinti hozzáféréssel standard rágcsálótáphoz (Purina Mills, Richmond, IN) és ivóvízhez.

III.1.2. A szérum IGF-1 szintjének mérése

A szérumminták IGF-1-koncentrációját ELISA-val (R&D Systems, Minneapolis, MN) mértük, ahogy azt korábban közöltük (Toth et al., 2014).

III.1.3. Hipertónia indukciója

A magas vérnyomást 10 hónapos hím IGF-1-hiányos egerekben (Igf1f/f + TBG-Cre-AAV, n = 60) és a megfelelő korú kontrollegerekben (Igf1f/f + TBG-eGFP-AAV8, n = 60) váltottuk ki, angiotenzin-II (Ang-II) beadásával (szubkután ozmotikus minipumpákon keresztül [Alzet Model 2006, Durect Co, Cupertino, CA]). A pumpákat sóoldattal (vivőanyag) vagy Ang II oldattal (Sigma, St. Louis, MO, USA) töltöttük meg, amelyek (szubkután) 1 µg/perc/kg Ang II-t szállítottak 28 napon keresztül, így négy kísérleti csoport jött létre: (a) Igf1f/f + TBG-Cre-AAV8 + Ang II, (b) Igf1f/f + TBG-Cre-AAV8 + sóoldat, (c) Igf1f/f + TBG-eGFP-AAV8 + Ang II és (d) Igf1f/f + TBG-eGFP-AAV8 + sóoldat. Az állatok vérnyomását a kezelés előtt és a kezelés végén a leírtak szerint farokmandzsetta segítségével mértük meg (Toth et al., 2015). Az Ang-II által kiváltott magas vérnyomás fent leírt modelljét számos korábbi vizsgálatban használtuk (Toth et al., 2015).

III.1.4. Az artériák szerkezeti és mechanikai jellemzőinek meghatározása

28 nappal a minipumpa beültetése után az egereket lefejeztük, majd az agy eltávolítása után az MCA-k szegmenseit mikrosebészeti műszerekkel izoláltuk, majd funkcionális méréseket végeztünk rajtuk, már korábban is leírt protokollnak megfelelően (Toth et al., 2013; Toth et al., 2014). Röviden, az MCA-k szegmenseit két üveg mikropipettára rögzítettük fel egy szervkamrában, oxigénnel dúsított (21% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) Ca²⁺-mentes Krebs-pufferben (pH ~7,4; 37°C-on). A be- és kiáramlási nyomásokat nyomás-szervo-szabályozó rendszerrel (Living Systems Instrumentation, Burlington, VE) kontrolláltuk és mértük. A potenciális, oldalágon keresztüli szivárgás hiányát a szervó rendszer leállításával és az intraluminális nyomás változásának 3 percen keresztül történő megfigyelésével igazoltuk minden kísérlet előtt.

Passzív körülményeket (Ca²⁺-mentes Krebs-oldat plusz 1 µM nimodipin és 2 mM EGTA) alkalmaztunk az arteriolafal szerkezeti és mechanikai jellemzőinek vizsgálatára, részben nyomás-átmérő görbék felvételével. A belső átmérőt és a falvastagságot az intraluminális nyomás lépcsőzetes (5 és 160 Hgmm közötti) növelését követően rögzítettük egy egyedi gyártású videomikroszkóp rendszerrel, amint azt korábbi tanulmányainkban bemutattuk (Toth et al., 2014). Az MCA-k falán belüli VSMC-eket fluoreszcens festékkel (20 µM calcein AM, szervfürdőben 30 percig)

töltöttük fel a media vastagságának és a VSMC hipertrófiájának felmérésére. Ehhez az ereket Leica SP2 MP konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk 70 Hgmm intraluminális nyomáson.

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.

A cirkumferenciális strain-t úgy számítottuk ki, hogy az egyes intraluminális nyomási szinteken passzív körülmények között kapott intraluminális átmérő (D_p) és a legalacsonyabb vizsgált nyomáson mért átmérő ($D_{5 \text{ Hgmm}}$) közötti különbséget elosztottuk a legalacsonyabb nyomáson mért átmérővel a leírtak szerint (Pennington et al., 2016):

$$\epsilon = (D_p - D_{5 \text{ Hgmm}}) / D_{5 \text{ Hgmm}}$$

A cirkumferenciális stresszt a vékonyfalú erekre alkalmazható képlet segítségével számítottuk ki ahol P az intraluminális nyomás, τ pedig a falvastagság:

$$\sigma = P * D_p / 2\tau$$

Az artériák/arteriolák merevségének a mértéke Young rugalmassági modulusával mérhető (Pennington et al., 2016). Az alsó intravaszkuláris nyomástartomány első három értékét azért választottuk ki, hogy információt kapjunk az alacsony Young-féle rugalmassági modulusról (E_{low}). Következésképpen az intralumináris nyomás utolsó három értékét választottuk a magas Young-féle rugalmassági modulus (E_{high}) kiszámításához. E_{low} és E_{high} az ezen nyomástartományoknak megfelelő stressz-strain görbékre illesztett lineáris regressziók meredekségét jelentik.

III.1.5. MCA-k konfokális/multifoton mikroszkópos képalkotása

Az elasztintartalmat és a sejteséget konfokális mikroszkóppal határoztuk meg. Az MCA-kat összegyűjtöttük és kanuláltuk a fent leírtak szerint, de a nyomásgörbe mérések helyett az artériákat 4%-os paraformaldehidben rögzítettük, miközben 1 órán át 70 Hgmm-es nyomás alá helyeztük. Az edényeket ezután kétszer öblítettük foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS), majd egyszer 0,1 M glicinben 5 percig. Ezután 1

ml PBS-sel átöblítettük a lumenüket, és 0,5%-os Triton X-100-ban 20 percig inkubálva permeabilizáltuk. Az edényeket kétszer mostuk PBS-ben, és 1 órán át inkubáltuk 0,5 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenil-indolban (DAPI), 0,2 µM Alexa Fluor 633 Hidrazidban (Thermo Fisher Scientific, USA és 0,02 µM Professoroidin 5 Alexa Fluulebehalloidban (Thermo Fisher Scientific, USA) PBS-ben. Miután háromszor mostuk PBS-ben, az ereket Leica SP5 konfokális/multifoton mikroszkóppal ábrázoltuk, 63×/1,2 numerikus apertúrájú vízobjektívvel. Az Alexa Fluor 633-at (633 nm-es HeNe lézerrel gerjesztve) az elasztin, az Alexa Fluor 546 phalloidint (543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztve) az F-aktin, míg a DAPI (többfoton lézerrel gerjesztve 720 nm-en) a sejtmagok kimutatására szolgált. A képeket feldolgoztuk, és az összes csatornát számszerűsítettük, hogy meghatározzuk a VSMC magjai, az elasztin és az aktin által elfoglalt teljes térfogatot (a közből feletti intenzitású voxelek számát), a korábban leírtak szerint (Bender et al., 2015), kérésre elérhető MATLAB algoritmussal.

III.1.6. A vaszkuláris rezilienciával kapcsolatos gének expressziós változásainak meghatározása qPCR-rel

Csoportunk a közelmúltban olyan géneket írt le, amelyek valószínűleg részt vesznek az artériák szerkezeti integritásának és ezáltal az intracerebrális vérzések (ICH) patogenezisében. Ezen kísérletek során egy egyedi tervezésű, mikrofluidikus kártya alapú TaqMan qPCR tömböt és egy Stratagene MX3000 platformot használtunk, és így meg tudtuk mérni olyan gének mRNS expresszióját, mint például az elasztin (Eln), az elasztolitikus és kollagenolitikus mátrix metalloproteinázok (MMP). Ezen felül mérni tudtuk az elasztin komplex szerkezetét meghatározó faktorokat kódoló gének mRNS expresszióját (fibrillin-1 [Fbn1], fibrillin-1 [Fbn2], Emilin1, Emilin2, fibulin-1 [Fbln1], fibulin-5 [Fbln5] és fibulin-4 [Efemp2]) és az extracelluláris mátrix kereszt kötése miatt felelős gének mRNS expresszióját (lizil-oxidázok Lox, Loxl1, Loxl2, Loxl3, Loxl4), illetve vaszkuláris remodellinget szabályozó növekedési faktorok kódolásáért felelős gének mRNS expresszióját is. Ezen felül információt kaptunk a NADPH oxidáz NOX2 alegységének (Cybb) és az antioxidatív transzkripció faktor Nrf2 expressziójáról is. A teljes RNS izolálást Mini RNA Isolation Kit (Zymo Research, Orange, CA) segítségével végeztük, a reverz transzkripcióhoz pedig Superscript III RT-t (Invitrogen, USA) használtunk. Kvantifikációt a ΔCq módszerrel végeztük. Meghatároztuk a Hprt, Ywhaz,

B2m, Gapdh, Actb és S18 referenciagének relatív mennyiségét, és a geometriai átlag alapján normalizációs tényezőt számítottunk.

III.1.7. Statisztikai analízis

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

III.2. Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban

III.2.1. Állatmodell és a jugularis véna lekötesi folyamatának leírása

Kísérleteinkhez 10 hónapos, felnőtt hím C57BL/6 egereket használtunk ($n = 40$) melyeket a Jackson Laboratories-tól rendeltünk. A tartási és takarmányozási feltételek hasonlóak voltak a fentebb leírtakhoz.

Kísérleteinkben a vénás pangás hatásainak tesztelésére törekedtünk melyet a jugularis vénás okklúzióval modelleztünk, ezért a vizsgálati populációunkat két jól elkülöníthető csoportra osztottuk: (1) bilaterális vena jugularis interna és vena jugularis externa lekötés (JVL), (2) sham operáció. A bilaterális vena jugularis interna és vena jugularis externa lekötest Auletta és munkatársai által publikált munka szerint végeztük (Auletta et al., 2017). Röviden, a műtétekhez izofluránt használtunk érzéstelenítőként. Az indukciót 4% izofluránnal értük el, míg a műtét során az izofluránt 1,5% és 2% között tartottuk. A műtétek során az egereket dorsalisán fekvő helyzetbe helyeztük egy melegítőpárnára. A vena okklúzióját sebészeti lekötéssel értük el. A sham operáció során mind vena jugularis interna, mind pedig a vena jugularis externa feltárását elvégeztük, de sebészeti lekötest nem csináltunk. Az izoflurán érzéstelenítés mind a két esetben azonos hosszúságú volt. A kétoldali JVL eléréséhez a bőr és az alatta lévő fascia tompa disszekcióját végeztük, majd a nyálmirigyeket szeparáltuk. Így a mellkasi bementhez közel található vena jugularis externa közös törzsét vizualizálni tudtuk, majd sebészi lekötest végeztünk. A vena jugularis interna mélyebben, közvetlenül a nyaki artériák felett helyezkedik el, a vagus ideg közvetlen közelében. Az eret gondos feltárást követően leköttük. A sebészeti leköteket 6-0 sebészeti varrat

segítségével végeztük. Hogy megbizonyosodjunk az eredményről, minden esetben két sebészi csomót helyeztünk el kis távolságra, majd elváltuk a vénát. A sebészeti lekötések befejezése után a sebeket 6-0 nylon monofil sebészeti varrattal, egyszerű folyamatos öltésekkel zártuk. A műtétet követően a sebeket antibiotikus kenőccsel fedtük és az egereket melegített ketrecben hagytuk magukhoz térni. Az antibiotikus krémet az ötödik posztoperatív napig naponta kentük a sebre. Az egereknél naponta ellenőriztük az esetleges varratelégtelenséget, fertőzést, valamint vérzést. A sebészeti lekötés összesített sikerességi aránya 90% feletti volt. Az egereket hagytuk gyógyulni egy hétig, a kísérleteket (kognitív funkció mérés, neurovaszkuláris kapcsolás mérése) csak ezután végeztük rajtuk.

III.2.2. A magas vérnyomás indukciója

A hipertónia indukálását mindkét csoportnál (ál- és JVL-elzáródásos csoport) az V.1.3. pontban leírtak szerint végeztük.

III.2.3. Egerek standardizált neurológiai vizsgálata

JVL és sham operáció után, a terminális kísérletek előtt, napi rendszerességgel neurológiai vizsgálatot végeztünk, minden állatnál a következő paraméterek felmérésével: spontán aktivitás, szimmetria a négy végtag mozgásában, mellső végtag nyújtás, mászóképeség, test propriocepció, válasz a bajuszszőr érintésére és a járás koordinációja. A korábban közölt protokoll szerint (Toth et al., 2015) minden egyes vizsgált állat kapott egy pontszámot, amelyet az összes egyedi tesztpontszám összegzésével számítottak ki.

III.2.4. Egerek viselkedésének – kognitív funkciójának a felmérése

A JVL tanulásra, memóriára, szenzoros-motoros funkcióra, járásra és mozgásra gyakorolt hatásának felmérésére mindkét csoportnál ún. viselkedési mintázatot felmérő kísérleteket végeztünk a műtét utáni második héten.

III.2.4.1. Nyolc karú vízlabirintus

A térbeli és a hosszú távú memória tesztelésére a korábban leírt (Tarantini et al., 2019) radiális, 8 karú vízlabirintus rendszert alkalmaztuk. Röviden, a labirintus nyolc, egyenként 9 cm széles karból áll, amelyek egy központi részből indulnak ki. A labirintus tele van fehér ételfestéket tartalmazó vízzel, ilyen módon nem átlátszó. Az egyik karban egy platform található, elmerülve az opálos vízben. Mindegyik kar végére jelzések vannak rögzítve, amelyek jól látható módon kint vannak a vízből. Az egereket minden kísérlet során a vízbe helyezik, a mozgásukat pedig a labirintus felett elhelyezett videorendszer rögzíti. A futtatás paramétereit az Ethovision szoftver (Noldus Information Technology Inc., Leesburg, VA, USA) rögzítette és elemezte. Minden egér számára egy tanulási időszak állt rendelkezésre azért, hogy megtanulják a víz alatti platform elhelyezkedését. Két tanulási munkamenetet volt tervezve, amelyek mindegyike négy egymást követő kísérletből állt. Ezek során az egereket minden alkalommal más karba helyeztük, de soha nem abba a karba, ahol a platform volt. A platform minden próba során ugyanabban a karban helyezkedett el. Az egerek legfeljebb egy percig úszhattak és keresgélhették a platformot. Sikeres menekülés esetén az állatok 30 másodpercet töltöttek a platformon a következő kísérlet megkezdése előtt. Az edzések során a fiatal egerek teljesítménye fokozatosan javul, ami azt jelenti, hogy gyorsabban, kevesebb hibával találják meg a platformot. Ha az egér nem megfelelő (nem a platformot tartalmazó) karba lépett be (mind a négy mancs a kar távolabbi felén belül van), vagy 15 másodperc elteltével nem választott ki egy kart (ami azt jelenti, hogy az egér 15 másodpercet töltött a labirintus közepén), az egér hibapontot kapott. A tanulási képességet a tanulási időszak 2. és 3. napján elért teljesítmény összehasonlításával értékeltük. A tanulási időszak után az egereket ketrecükbe helyeztük 7 napra. A 10. napon az egereket hasonló protokoll szerint, de csak egy napon keresztül újra úsztattuk a labirintusban.

III.2.4.2. Rotarod, motoros készség

A motoros koordináció értékeléséhez rotarod-kísérleteket végeztünk egy automata négysávos rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH) segítségével, a korábban leírtak szerint (Tarantini et al., 2015). Röviden, az egereket napi rendszerességgel a gyorsuló rotarodra helyeztük 4 napon keresztül. A motoros képességek tanulásának

értékelésére a rotarodon végzett teljesítményük elemzését használtuk. A kísérletek egy tanulási periódussal kezdődtek, melynek során az egereket a mozgó rotarodra (10 fordulat/perc) helyeztük, és legfeljebb 120 s-ig tartottuk rajta. A tesztfázis napi 3 vizsgálatból állt (15 perces kísérletek közötti intervallumokkal elválasztva) a kísérletet pedig 4 napon keresztül végeztük. A rotarod-ot úgy állítottuk be, hogy 4/percről 40/percre gyorsuljon 300 másodperc alatt, a forgási sebesség 10 másodpercenkénti növekedése által. Az egerek mindenközben a rotarodon voltak és a gyorsulás következtében különböző időpontokban estek le a forgó eszközről. A kísérletek során a leesés időpontját jegyeztük fel.

III.2.4.3. Izomerő mérése

Az elülső végtagok maximális izomerejét markolaterómérővel (Chatillon Ametek Force Measurement, Brooklyn, New York) mértük. A méréseket háromszor végezte el ugyanaz a vizsgáló. A további analízishez a maximális értékeket használtuk fel.

III.2.4.4. A neurovaszkuláris kapcsolási válaszok mérése

A funkcionális hiperémia (neurovaszkuláris csatolás) felmérésére a csoportunk által korábban leírt módszert alkalmaztuk (Tarantini et al., 2015). Röviden, az egereket termosztatikus fűtőpárnára helyeztük (Kent Scientific Co, Torrington, CT), és izofluránnal érzéstelenítettük a korábban leírt protokoll szerint. Az érzéstelenítés során a légzés végi CO₂-t (ETCO₂) 3,2 és 3,7% között szabályoztuk egy lélegeztetőgép (MousVent G500; Kent Scientific Co, Torrington, CT) segítségével, annak érdekében, hogy a vérgázértékek a fiziológiás tartományon belül maradjanak. A jobb femorális artériába kanült helyeztünk az artériás vérnyomás mérésére (Living Systems Instrumentations, Burlington, VT). Kísérleteinkhez 90-110 Hgmm közötti vérnyomást tartottunk. Az egereket immobilizáltuk, és sztereotaxiás keretre helyeztük (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL), 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 kortex feletti regionális véráramlási különbségeket lézer-speckle kontraszt képalkotó berendezéssel (Perimed, Järfälla, Svédország) rögzítettük. A kísérletek során az agyfelület differenciál perfúziós képeit rögzítettük. A kísérletek végén az egerek agyát immunfluoreszcensen jelöltük a vér-agy gát integritásának

ellenőrzésére és a mikroglia aktiváció értékelése céljából. Ezen felül a proinflammatorikus citokin génexpresszió mérésére izolált hippocampus preparátumokat használtuk fel.

III.2.5. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia: a vér-agy gát sérülésének és a mikroglia aktiválódásának értékelése

Az egereket transzkardiálisan perfundáltuk PBS-sel; majd az agyakat eltávolítottuk és félbevágtuk. A bal féltekéket egy éjszakán át 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd cryoprotekciót végeztünk szacharóz oldatban (10%, 20% és 30% egy éjszakán át), és Cryo-Gelben lefagyasztottuk (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). 70 µm-es koronális metszeteket vágunk a hippocampusból, majd krioprezerváló oldatban tároltuk a mintákat (25% glicerin, 25% etilén-glikol, 25% 0,2 M foszfát puffer, 25% desztillált víz) –20°C-on. A kiválasztott metszetek kb. 1,6 mm-re caudálisan helyezkedtek el a bregmához képest, ami a rostralisabb hippocampust képviseli. Mosás után (3x 5 percig TBS-sel, majd háromszor 5 percig 1x TBS-sel + 0,25% Triton X-100-al) a metszeteket forrásban lévő nátrium-citrát pufferrel (pH 6,0) kezeltük 20 percig. Egy második mosási lépés után (3x 5 percig desztillált vízzel plusz 3x 5 percig 1x TBS-sel) blokkolást végeztünk 5% BSA/TBS-ben (0,5% Triton X-100, 0,3 M glicin és 1% hal zselatin; 3 órán át), majd a metszeteket primer antitestekkel immunfestettük 2 éjszakán át 4°C-on. A következő elsődleges antitesteket használtuk: kecske anti-egér IgG (1:100, FITC konjugált; katalógusszám: 005-090-003, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) az extravazált IgG jelölésére és nyúl anti-egér Iba1 (1:50, konjugátlan; katalógusszám: 019-19741, Wako, Richmond, VA) a mikroglia jelölésére. Másodlagos antitestként pedig Alexa Fluor 647-tel jelölt szamar-anti nyúl IgG-t használtunk (Abcam, Cambridge, MA). A metszeteket háromszor 5 percig TBS-sel, majd háromszor 5 percig mostuk 1x TBS + 0,25% Triton X-100-zal. A nukleáris festéshez pedig DAPI-t (Life Technologies, Grand Island, NY) használtunk. Ezután a metszeteket tárgylemezre helyeztük át, és fakulásgátló rögzítőközeggel fedtük. A konfokális képeket Leica SP8 MP konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal készítettük.

Az Iba1 immunfluoreszcens jelölést az agyban lévő aktivált mikroglia azonosítására használtuk. Kiszámoltuk az Iba1-pozitív mikroglia relatív számát a hippocampus adott területére vonatkoztatva. Minden állatnál a hippocampusból 4

véletlenszerűen kiválasztott mezőt elemeztünk 6 nem szomszédos metszetben. Csoportonként hat állatot elemeztünk.

III.2.6. A proinflammatorikus génexpresszió vizsgálata a hippocampusban

Real-time PCR-t végeztünk a gyorsfagyasztott hippocampus mintákból izolált RNS-ből. A teljes RNS-t RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen, USA) izoláltuk egy teljesen automatizált QIAcube-alapú munkafolyamat segítségével, és reverz-transzkripciót végeztünk a High Capacity RNS-cDNS szintézis készlettel (Applied Biosystems) a korábban leírtak szerint (Bailey-Downs et al., 2012). A QRT-PCR mennyiségi meghatározásához ΔCq módszert használtunk. Meghatároztuk a Hprt, Ywhaz, B2m, Actb és S18 referenciagének relatív mennyiségét, és normalizációs faktort számoltunk.

III.3. Az Omecamtiv Mecarbil *in vivo* és *in vitro* hatásai állatmodellben

III.3.1. Állatmodellek

Valamennyi állatgondozási és kísérleti eljárást a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá (1/2013/DE MAB etikai engedély), és megfelelt az Európai Parlament 2010/63/EU irányelvének. A vizsgálatokat 13-15 hetes hím, 300-330 g tömegű Wistar-Kyoto patkányokon végeztük (Toxi-Coop Toxikológiai Kutatóközpont, Dunakeszi, Magyarország). A miocitákat beagle kutyákból izoláltuk (lásd alább). Az állatokat állandó hőmérsékletű helyiségekben (23°C) tartottuk 12 óras/12 óras világos/sötét ciklussal, és standard étellel etettük őket, és a szükségleteknek megfelelően voltak ellátva csapvízzel. Minden eljárás a lehető leghumánusabb volt, hogy lehetőség szerint minimalizáljuk az állatok szorongását.

III.3.2. Hemodinamikai mérések

Az *in vivo* hemodinamikai méréseket a korábban leírtak szerint végeztük (Radovits et al., 2013). Röviden, a patkányokat pentobarbitál-nátriummal (60 mg/ttkg) érzéstelenítettük, tracheotomizáltuk és intubáltuk a lélegeztetés megkönnyítése érdekében. Az állatokat szabályozott melegítőpárnákra helyeztük, és a maghőmérsékletet, amelyet rektális szondával mértünk, 37 °C-on tartottuk. Polietilén katétert helyeztünk be a bal vena jugularis externába folyadék és OM beadás céljából.

Egy 2-Fr nyomásvezető mikrokatót (SPR-838; Millar Instruments, Houston, TX, USA) helyeztünk be a jobb nyaki artériába, és ezt követően lejtattuk a felszálló aortába.

A katót ezután nyomás-ellenőrzés mellett továbbítottuk az LV-be. Elsőként steady-state állapotú PV relációkat rögzítettünk, majd 10 perces stabilizálódást követően a jeleket folyamatosan regisztráltuk 1000 mérés/s mintavételezési sebességgel a PowerLab 16/30 adatgyűjtő rendszerhez (AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) csatlakoztatott PV konduktancia rendszer (MPVS-Ultra; Millar Instruments) segítségével. Az adatokat a LabChart7 szoftverrendszer (AD Instruments) segítségével jelenítettük meg és tároltuk meg egy személyi számítógépen. Speciális PV-elemző eszközt (PVAN, Millar Instruments) használtunk a hemodinamikai paraméterek kiszámítására: LV végszisztolés nyomás (ESP), LV végdiasztolés nyomás (EDP), LV végdiasztolés térfogat (EDV), LV végdiasztolés térfogat, LV végszisztolés térfogat (ESV) és diasztolés nyomáscsökkenés (dP/dt_{min}), LV nyomáscsökkenés időállandója (TauW; Weiss módszer szerint), ejekciós frakció (EF), verőtérfogat (SV).

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. A végszisztolés P-V kapcsolat meredekségét (ESPVR_q, a curvilineáris modell szerint) és a „preload recruitable stroke work”-öt (PRSW), mint a bal kamra előterheléstől független paramétereit számoltuk ki. Az LV vég-diasztolés P-V kapcsolatának (EDPVR) meredekségét, mint az LV merevségének megbízható mutatójaként számítottuk ki.

Az alapparaméterek rögzítése után DMSO-t (oldószer) és három egymást követő OM-dózist (200, 400 és 600 µg/ttkg) injektáltunk intravénás bolusként, ami a maximális 1200 µg/ttkg kumulatív dózist eredményezte. Az egymást követő injekciók közötti idő adagonként 12-15 perc volt.

A fent leírt méréseket és adatelemzést a kiinduláskor és 10 perccel a DMSO vagy bármely OM dózis beadása után végeztük.

A térfogatkalibrálást a korábban leírtak szerint végeztük, sóoldat adagolásával és küvetta-kalibrációval (Radovits et al., 2013).

III.3.3. Vérnyomásmérés

A növekvő dózisú OM vérnyomásra gyakorolt hatását invazív módon teszteltük. Az erre a célra kialakított centrális vénás kanült a bal vena jugularis internába helyeztük, hogy amin keresztül a DMSO-t (oldószer) és az OM-et növekvő dózisokban adagoltuk (200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$), így elérve a maximális 1200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ kumulatív dózist. A vérnyomást invazív módon, a jobb carotis artéria kanülálása által rögzítettük (Haemosys, Experimetria, Magyarország). Az EKG-jeleket egyidejűleg rögzítettük a mérések közben.

III.3.4. Echokardiográfia

A növekvő dózisú OM in vivo hatásait echokardiográfiával is teszteltük. Ehhez egy lineáris 14,1 MHz-es i13L ultrahang fejjel felszerelt General Electric Vivid E9 ultrahangrendszerrel (General Electric, Fairfield, CT), a korábban leírtak szerint (Kovacs et al., 2016). Röviden a ketaminnal és xilazinnal (50 mg/kg, illetve 5 mg/kg) végzett enyhe érzéstelenítés után a patkányokat melegítőpárnára helyeztük, ahol a hőmérsékletet rektális szondával monitoroztuk. A bal vena jugularis externába helyeztünk, hogy a növekvő dózisú OM bolusokat be tudjuk adni. Először az oldószer, a DMSO, hatását teszteltük, majd a növekvő dózisú OM-t (200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$) bolusokként injektáltuk, így maximálisan 1200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ kumulatív dózist kaptunk. Minden adag után teljes ultrahangos értékelést végeztünk egy megfigyelő által. Az ejekciós frakciót (EF), a frakcionált lerövidülést (FS), a bal kamra belső átmérőjét szisztolében (LVIDS) és a bal kamra belső átmérőjét diasztolében (LVIDD) a parasternális hosszú tengely (PLAX) M-módjának rögzítésével határoztuk meg a papilláris izmok szintjében. A diasztolés funkció további tesztelését a transzmitrális áramlás Doppler-mérésével végeztük apikális háromüregű nézetben a mitrális billentyű szintjén, az E/A arány és az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) meghatározásával. Az LVOTmax-ot, a sebességi idő integrált (VTI) és a szisztolés ejekciós időt (SET) a PW Dopplerrel rögzített képeken mértük a bal kamrai kiáramlási traktus szintjén, közvetlenül az aortabillentyű felett, apikális háromüregű nézetben. A bal pitvari végdiasztolés areát 2D apikális háromüregű felvétel használatával mértük.

Az összes felvételt az EchoPAC szoftver (General Electric) segítségével elemezte egyetlen megfigyelő.

III.3.5. Mechanikai mérések permeabilizált miocitákon

A bal kamrai izolált kardiomiociták izometrikus erejét 2,3 μm szarkomerhosszon mértük a korábban leírt módszer szerint (Nagy et al., 2015). Röviden, mélyhűtött (-80°C) humán bal kamrában a szabad fal mintákat (nem beültetett donorszívekből) izoláló oldatban (ISO, KCl 100 mM, etilén-glikol-tetraecetsav 2 mM, MgCl_2 1 mM, Na_2ATP 4 mM, imidazol 10 mM; pH 7,0) mechanikusan feltörtük, majd 0,5% Triton X-100 detergenst tartalmazó ISO-ban inkubáltuk 5 percig, majd ismét ISO-ban mostuk 4°C -on. A miocita méretű preparátumokat szilikon ragasztóval rögzítettük egy nagy sebességű hosszszabályozó (Aurora Scientific Inc., Aurora, Kanada) és egy erőmérő (SensoNor AS, Horten, Norvégia) közé ISO-ban 15°C -on. A szívizomsejtek Ca^{2+} -aktivált erőképzését úgy váltottuk ki, hogy a készítményt relaxáló oldatból vittük át (BES 10 mM; KCl 37,11 mM; MgCl_2 6,41 mM; EGTA 7,0 mM; ATP 6,94 mM; kreatin-foszfát 7,94 mM) aktiváló oldatba (EGTA helyett Ca^{2+} -EGTA-t tartalmaz, egyébként megegyezik a relaxáló oldatával). A Ca^{2+} koncentrációkat $-\lg[\text{Ca}^{2+}]$ egységekben fejeztük ki. 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. Valamennyi oldatot kiegészítettük proteáz inhibitorokkal: 500 μM fenilmetil-szulfonil-fluoriddal, 40 μM leupeptinnel és 10 μM E-64-el. Az összes vegyszert a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk.

A maximális Ca^{2+} -aktivált erőt (F_{max}) pCa 4,75 értéknél határoztuk meg. A kísérleteket egyedi tervezésű LABVIEW Data Acquisition platform és LabVIEW elemző szoftver (National Instruments Corp., Austin, TX, USA) rögzítette és elemezte. A pCa $< 4,75$ $F_{\text{aktív}}$ értékeket F_{max} -ra normalizáltuk, és egy módosított Hill-egyenlethez illesztettük az Origin 6.0 elemző programban (OriginLab, Northampton, MA, USA), amely minden egyes sejt Ca^{2+} -érzékenységi görbáját megadja. A félmaximális Ca^{2+} -indukált kontrakció ($p\text{Ca}_{50}$) pCa értéke határozza meg a kontraktilis apparátus erőtermelésének Ca^{2+} -érzékenységét. 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. Minden egyes sejt esetében az eredeti erőket a

myocita keresztmetszeti területére normalizáltuk, és az F_{max} , $F_{aktív}$ és $F_{passzív}$ abszolút erőértékeit kN/m²-ben fejezzük ki. Az erőmérések során 4 különböző szív LV-mintáját (szívenként 5-6 szívizomsejtet) használtuk. V.3.6. Kutya kamrai kardiomiociták izolálása akciós potenciál, sejt hossz és Ca^{2+} -tranzienst mérésekhez

Mindkét nemhez tartozó kifejlett kutyákat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon, Magyarország) és 1 mg/kg xilazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Hollandia) intramuszkuláris injekciójával érzéstelenítettük. A szíveket gyorsan eltávolítottuk, és Tyrode oldatba helyeztük, amely a következőket tartalmazta: NaCl 144 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM; $MgCl_2$ 1,2 mM; HEPES 5 mM; és dextróz 11 mM (pH=7,4, ozmolalitás=295-303 mmol/kg). Izolált kardiomiocitákat enzimatis diszperzióval állítottunk elő (Magyar et al., 2004). Röviden, a bal kamra falának a bal elülső leszálló koszorúér által táplált ék alakú szakaszát kimetszettük, kanülbe helyeztük és Tyrode oldattal perfundáltuk. A vér szövetből való eltávolítása után a perfúziót Ca^{2+} -mentes Joklik oldatra (Minimum Essential Medium Eagle #M0518; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) cseréltük és ebben 5 percig tartottuk. Ezt 30-35 perces perfúzió követte 1 mg/ml kollagenázzal (Type II, Worthington, Lakewood, NJ, USA) és 0,2%-os szarvasmarha szérumalbuminnal (V. frakció, Sigma-Aldrich, St. Louis) kiegészített 50 μ M Ca^{2+} -ot tartalmazó Joklik oldattal. A bal kamra falát apró darabokra vágtuk, és a sejtszuspenziót Joklik-oldattal mostuk. A normál külső Ca^{2+} -koncentráció fokozatos helyreállítása után a sejteket MEM oldatban (termék #M0643, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 15 °C-on tároltuk felhasználásig.

III.3.6. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták akciós potenciáljának rögzítése

Minden kísérletet a korábban leírtak szerint végeztünk (Horvath et al., 2017). Életképes, tiszta csíkozást mutató kamrai kardiomiocitákat helyeztünk egy inverz mikroszkóp (Nikon Diaphot 300; Nikon, Tokió, Japán) tárgyasztalára szerelt 1 ml térfogatú kísérleti kamrába. Az ülepítés után a szívizomsejteket folyamatosan 37 °C-os Tyrode oldattal 1-2 ml/perc sebességgel superfundáltuk. A sejteket 3 M KCl-mal töltött hagyományos boroszilikát mikroelektrodákkal szűrtük meg, amelyek csúcscellenállása 20-40 M Ω között van, és egy Multiclamp 700A erősítő bemenetére csatlakozik (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Akciós potenciálokat (AP) váltottunk ki ezeken az intracelluláris elektrodákon keresztül, 2 ms széles, téglalap alakú áramimpulzusok alkalmazásával, amelyek amplitúdója kétszerese a diasztolés

küszöbértéknek. A membránpotenciál jelet 50 kHz-en digitalizáltuk Digidata 1440A A/D kártya segítségével, majd rögzítettük a pClamp 10 szoftverrel (mindkettő a Molecular Devicestől, Sunnyvale, CA, USA), és későbbi elemzés céljából tároltuk. Az AP-kat 1 Hz, 2 Hz, 3,33 Hz, 4 Hz és 5 Hz ingerlési frekvenciákon rögzítettük, ebben a sorrendben, OM hiányában és jelenlétében. Az AP-kat 1 Hz-en 10 percig monitoroztuk, mielőtt felvettük volna mind a DMSO-t tartalmazó Tyrode-oldatban, mind pedig 1 μ M OM jelenlétében.

III.3.7. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták sejthosszának rögzítése

A sejthosszt (CL) egy video alapú edge-detektor rendszerrel (VED-105, Crescent Electronics, Sandy, Utah, USA) mértük az AP felvételekkel egyidejűleg. Az analóg jelet felerősítettük (DC erősítő, Főnixcomp Ltd., Magyarország), Digidata 1440A A/D konverterrel 240 Hz-en digitalizáltuk és pClamp 10 szoftverrel rögzítettük (mindkettő Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Egyes kísérletekben a CL-t elektromos stimuláció nélkül mértük. Ezekben az esetekben a CL-t DMSO-t tartalmazó Tyrode oldatban 10 percig monitoroztuk, majd a sejteket 10 percig 1 nM - 10 μ M OM koncentrációknak tettük ki.

Az OM hatását az APD visszaállítására úgy határoztuk meg, hogy a szívizomsejteket 500 ms-os egyensúlyi ciklushosszon ingereltük 20 egymást követő ütemben, majd egy előre meghatározott diasztolés intervallumban (DI) korai ingert adtunk le a 21. ütemben. A DI 10-200 ms között volt beállítva. Az APD visszaállítási görbén a 21. AP átlagos APD90 (\pm SD) értékeit a megfelelő DI függvényében ábrázoltuk. Az eljárást megismételtük ugyanazon a miocitán 1 μ M OM jelenlétében is.

III.3.8. Izolált kutya bal kamrai kardiomiociták intracelluláris Ca^{2+} tranzienseinek fotometriai kimutatása

A szívizomsejteket 5 μ M Fura-2 AM-mel töltöttük fel 30 percig szobahőmérsékleten Pluronic F-127-et tartalmazó Tyrode oldatban. Ehhez 25 mg Pluronic F-127-et feloldottunk 1 ml DMSO-ban, és ebben az oldatban 1 mM Fura-2 AM törzsoldatot készítettünk. Feltöltés után a sejteket kétszer mostuk Tyrode oldattal, majd 30 percig szobahőmérsékleten pihentettük a festék észtermentesítéséhez, majd a kísérletek előtt 15°C-on tároltuk. A fluoreszcenciát váltakozó, kétsugaras gerjesztésű fluoreszcens fotometriás berendezéssel (RatioMaster; Photon Technology

International, New Brunswick, NJ, USA) mértük inverz mikroszkóppal. A Ca^{2+} -kötött és Ca^{2+} -mentes Fura-2 festék fluoreszcens jeleit 340 nm-es (F_{340}), illetve 380 nm-es (F_{380}) gerjesztési hullámhosszon detektáltuk. A kibocsátott fotonokat 510 nm felett detektáltuk egy R1527P fotonsokszorozó csővel (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japán). Ezt a jelet 200 Hz-en digitalizáltuk a FelixGX szoftverrel (Photon Technology International, Edison, NJ, USA), és offline elemzéshez tároltuk. A háttér-fluoreszcenciát úgy mértük, hogy a sejtet elmozdítottuk a látómezőből. A háttér-fluoreszcenciát ezt követően kivontuk a teljes fluoreszcenciából, hogy ilyen módpn megkapjuk a kizárólag a preparátumból származó fluoreszcenciát. Az intracelluláris Ca^{2+} tranziens (CaT) értékelésére az F_{340}/F_{380} fluoreszcencia arányt használtuk. A CaT-t az AP-vel és a CL-vel párhuzamosan rögzítettük.

III.3.9. 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 konvencionális, ismételt mérések esetén Greenhouse-Geisser korrekcióval), a többszörös összehasonlítást pedig Holm-Sidak teszttel értékeltük; míg a két csoportot tartalmazó adatsorokat konvencionális, 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 szignifikancia kritériuma $p < 0,05$ volt.

IV. Eredmények

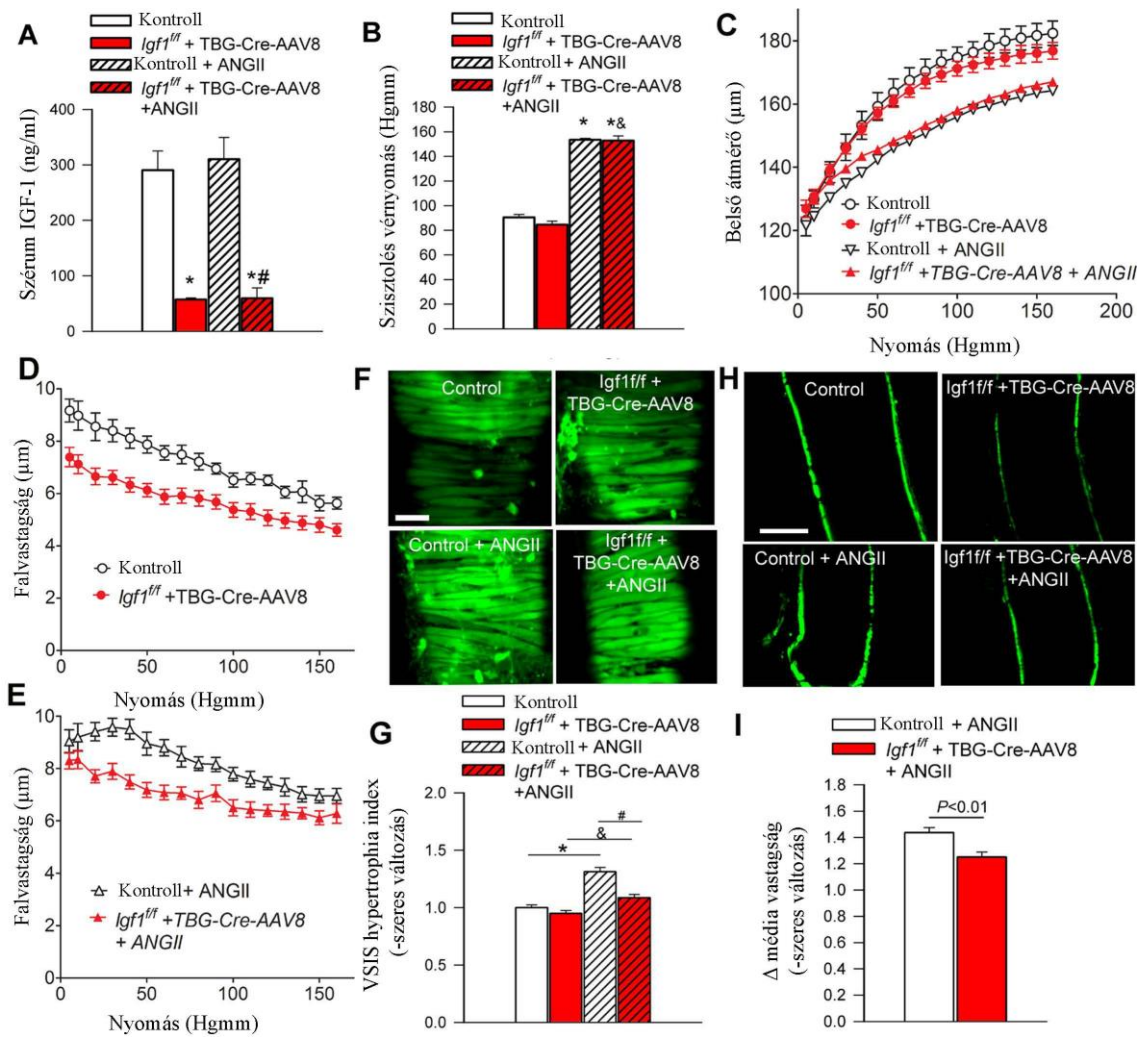
IV.1. Az IGF-1 szerepe a vaszkuláris remodellingben

IV.1.1 Keringő IGF-1 szint és vérnyomásmérés

A modell validálásához meghatároztuk az IGF-1 szinteket. A TBG-Cre-AAV8-at kapó egerek szérum IGF-1 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. A kontroll egerek TBG-eGFP-AAV8-at kaptak (1A. ábra). Az angiotenzin II kezelés szignifikánsan magasabb vérnyomást eredményezett mind az IGF-1 hiányos egerekben, mind a kontrollokban (1B. ábra).

IV.1.2. Az IGF-1 hiánya megváltoztatja az artériák morfológiáját, az érrendszer mechanikát, és rontja az MCA-k strukturális alkalmazkodását a magas vérnyomáshoz

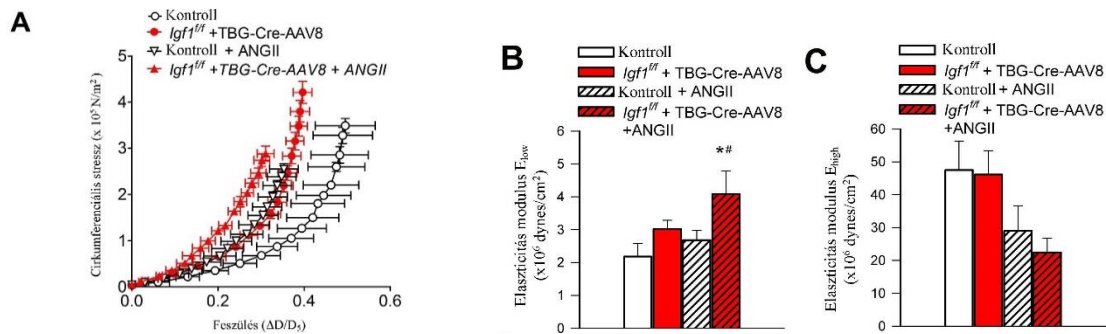
Az egyes kísérleti csoportokból származó MCA-k passzív belső átmérőjének és falvastagságának változásait az intraluminális nyomás függvényében az 1C-E. ábrák mutatják be. Amint az 1D. ábrán látható, az IGF-1 hiány a falvastagság szignifikáns csökkenéséhez vezetett normotenzív egerekben. Emellett jól látható az MCA-k szerkezeti adaptációja a magas vérnyomáshoz kontroll állatokban, ami a falvastagság jelentős növekedésében (1E. ábra) csökkent belső átmérőben (1C. ábra) és a fal/lumen arány ebből következő növekedésében nyilvánult meg (ezen adatot nem ábrázoltuk). Kalceinnel festett vaszkuláris simaizomsejteken (VSMC) végzett mérések kimutatták (1F és 1H ábra), hogy a falvastagság növekedését legalábbis részben a mediális VSMC hipertrófia okozta (1G és 1I ábra).



1. ábra: A keringő IGF-1 hiány elősegíti az agyi erek media sorvadását. (A) A máj Igf1 adeno-asszociált vírusos knockdown-ja (Igf1ff + TBG-Cre-AAV8) szignifikánsan csökkenti a keringő IGF-1 szintjét a kontroll állatokhoz képest. (B) Az angiotenzin II vérnyomás-emelkedést váltott ki kontroll és IGF-1-hiányos egerekben. * $p < 0,05$ vs kontroll normotenzív. (C) Az arteria cerebri media-k (MCA) nyomás-átmérő görbéi minden kísérleti csoportból passzív körülmények között. (D, E) Az MCA-k nyomás-falvastagsági görbéi passzív körülmények között. A VSMC-k reprezentatív konfokális képe: a kalceinnel töltött MCA-k, a longitudinális síkban (F, skála: 5 μm) és a longitudinális sík középső részén (H, skála: 80 μm). A celluláris hipertrófia mutatójaként a VSMC-k középső szakaszának átlagos átmérőjét mértük (G). (I) Az oszlopdiagramok az MCA-k közepén mért, magas vérnyomás okozta relatív médiavastagság-változások összefoglaló adatai. Az adatok átlag \pm SEM. ($n = 11\text{--}27$ minden adatpontnál) * $p < 0,05$ vs. # $p < 0,05$ vs kontroll+ANGII; & $p < 0,05$ vs IGF-1 hiányos. A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, majd Tukey post hoc teszttel állapítottuk meg.

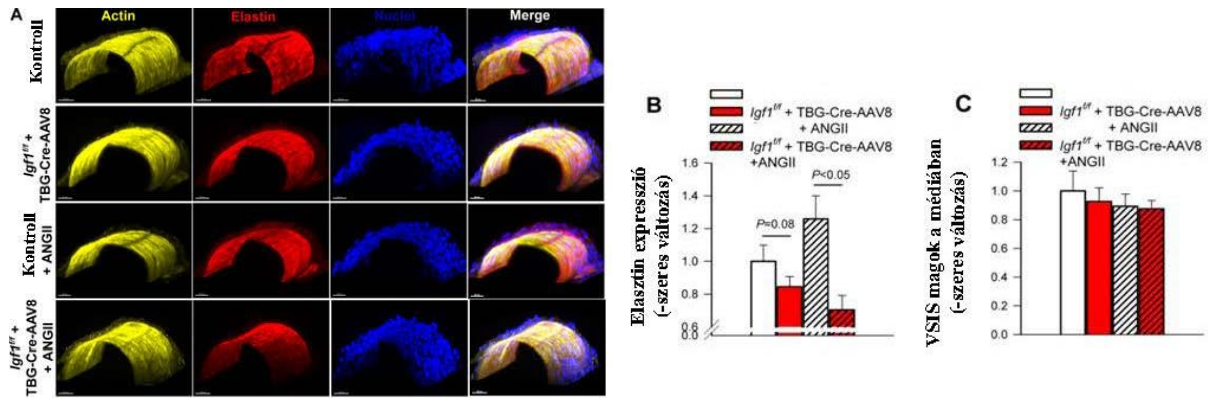
A hipertóniás kontroll egerek MCA-iban a stress-strain görbe balra tolódott el a normotenzív kontroll egerek MCA-jában kapott görbétől (2A. ábra), ami az agyi artériák merevségét jelzi. Maga az IGF-1-hiány az MCA-k stress-strain kapcsolatában balra eltolódással és megnövekedett cirkumferenciális feszültséggel járt (2A. ábra). Az Ang-II infúziója IGF-1-hiányos egerekben további balra tolódást eredményezett az MCA-k stress-strain görbétől (2A. ábra), jelezve az erek fokozott merevségének jelenlétét.

Az E_{low} , amely az elasztin vaszkuláris rugalmassághoz való hozzájárulását tükrözi, általában csökkent a normotenzív IGF-1-hiányos egerek MCA-iban, de a különbség nem érte el a statisztikai szignifikanciát. Az E_{low} szignifikánsan megemelkedett a hipertóniás IGF-1-hiányos egerek MCA-jában, ami csökkent rugalmasságot jelez (2B. ábra). A hipertóniás kontroll egerekből származó MCA-k értéke statisztikailag nem különbözött a normotenzív kontrollerek értékétől. Az E_{high} statisztikailag nem különbözött a négy kísérleti csoportban (2C. ábra).



2. ábra. Az IGF-1 hiánya csökkenti az agyi artériák rugalmasságát. (A) Normotenzív kontrollból, hipertóniás kontrollból (kontroll+Ang II) és normotenzív IGF-1 hiányos (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8) és hipertóniás IGF-1 hiányos állatból (*Igf1^{fl/fl}* + TBG-Cre-AAV8 + AngII) izolált arteria cerebri mediák feszültség-stressz kapcsolati görbéi passzív körülmények között, különböző intravaszkuláris nyomásokon. (B) Az MCA-k elasztikus modulusai passzív körülmények között. E_{low} és E_{high} a lineáris regresszió meredekségét jelenti az alacsony, illetve a magasabb intravaszkuláris nyomástartományban. Alacsony nyomáson az elasztin, magas nyomáson a kollagén befolyásolja az artériák rugalmas viselkedését. A magasabb értékek fokozott artériás merevséget jeleznek. Az adatok átlag \pm SEM -ként lettek megadva ($n = 6-11$ minden adatpontra). * $p < 0,05$ vs kontroll; # $p < 0,05$ vs kontroll+AngII. A csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, majd Tukey post hoc teszttel állapítottuk meg.

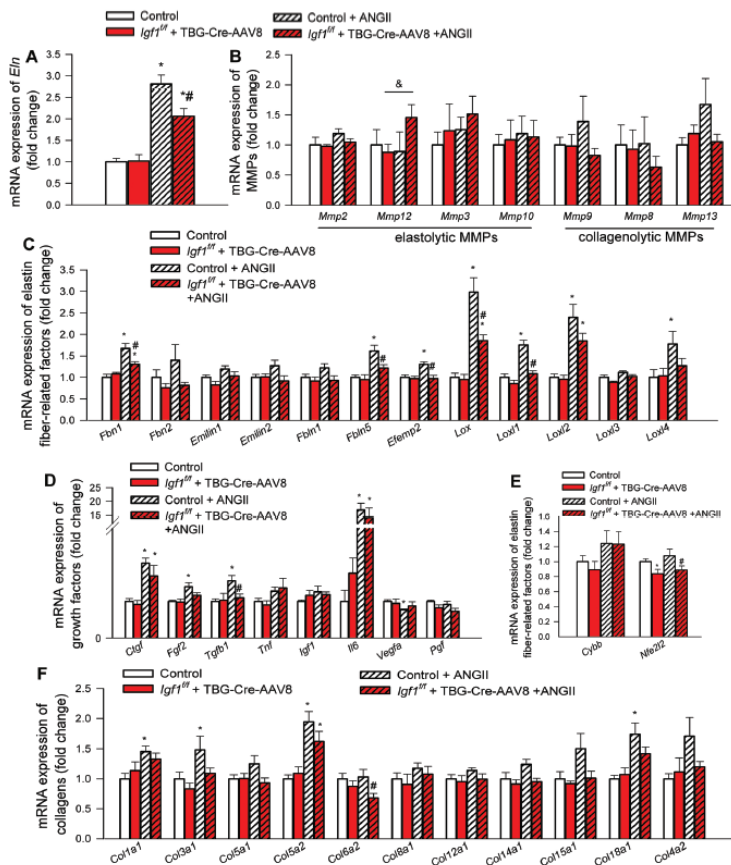
Konfokális és multifoton mikroszkópiát használtunk az MCA-k érfal-összetételének további felmérésére (3A. ábra). Ezek a kísérletek alapján megállapíthattuk, hogy az IGF-1 hiányos MCA-k falában az elasztintartalom csökkenési tendenciáját, amely a magas vérnyomás kiváltása után vált szembevetőbbé (3B. ábra). Nem volt szignifikáns változás a mediális VSMC magok számában sem magas vérnyomásban, sem IGF-1 hiányban (3C. ábra).



3. ábra: Az IGF-1 hiánya csökkenti az elasztintartalmat az agyi artériákban. (A–E) Normotenzív kontrollból, hipertóniás kontrollból (kontroll+Ang II) és normotenzív IGF-1 hiányos (Igf1^{ff} + TBG-Cre-AAV8) és hipertóniás IGF-1 hiányos egerek (Igf1^{ff} + TBG-Cre-AAV8 + AngII) -ből izolált arteria cerebri media-k (MCA) reprezentatív konfokális képei; (részletekért lásd a módszereket), amelyek F-aktint (sárga), elasztint (piros) és sejtmagokat (kék) mutatnak. Skála: 20 μ m. (B) Az IGF-1 hiány az artériás elasztintartalom jelentős csökkenésével jár. (C) Vaszkuláris simaizomsejtek száma, amelyet az MCA-k mediális rétegében található magok képviselnek. Az adatok átlag \pm SEM-ként vannak megadva (n = 5–7 minden adatpontra).

IV.1.3. Az IGF-1 hiánya rontja a hipertónia által kiváltott adaptív változásokat az ECM-hez kapcsolódó vaszkuláris génexpressziós profilban

Az ECM komponensek szintézisében, összeállításában, lebontásában, valamint az átépülésében részt vevő gének expresszióját qPCR-rel határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy MCA-kban az IGF-1 hiány gátolta az Eln mRNS expressziójának magas vérnyomás által kiváltott változásait (4A ábra), az elasztin rostok összeépülését és átépülését, valamint az ECM térhálósodását szabályozó faktorokat (4C. ábra), illetve a vaszkuláris remodelling folyamatait szabályozó faktorokat (4D ábra) és a kollagének expresszióját is (4F. ábra), míg nem gyakorolt jelentős hatást az MMP expressziójára (4B. ábra). A vaszkuláris redox szabályozásban szerepet játszó tényezők között azt találtuk, hogy az IGF-1 hiánya negatívan befolyásolta az antioxidáns Nrf2 (Nfe2l2) transzkripció faktor expresszióját (4E. ábra).



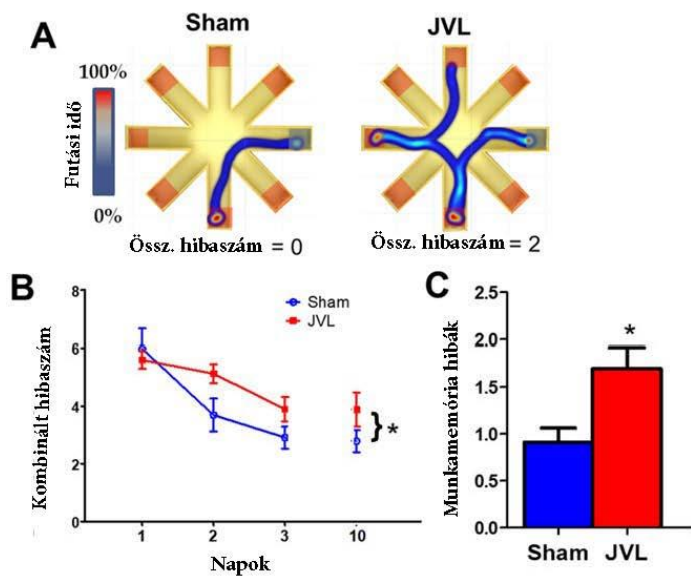
4. ábra. Az IGF-1 hiánya negatívan befolyásolja a magas vérnyomás okozta érrendszeri átépüléshez vezető génexpressziós változásokat. qPCR adatok, amelyek az (A) elasztin (Eln), (B) elasztolitikus és kollagenolitikus mátrix metalloproteinázok (MMP) mRNS-expresszióját mutatják, (C) az elasztinszálak összeépülését és átépülését szabályozó (fibrillin-1 [Fbn1], fibrillin-1 [Fbn2]), Emilin1, Emilin2, fibulin-1 [Fbln1], fibulin-5 [Fbln5] és fibulin-4 [Efemp2]) valamint ECM térhálósítás szabályozó gének expressziójának változásai (a lizil-oxidázok Lox, Lox1, Lox2, Lox3, Lox4), (D) növekedési faktorok és a vaszkuláris remodelling folyamatait szabályozó citokinek, az (E) faktorok, amelyek részt vesznek a vaszkuláris redox szabályozásban és a ROS által közvetített MMP aktivációban, beleértve a NADPH oxidáz NOX2 alegységet (Cybb) és az antioxidáns transzkripciós faktort, a Nrf2 (Nfe2l2) és (F) kollagének expressziójának a változásai normotenzív kontrollból, hipertóniás kontrollból (kontroll+Ang II) és normotenzív IGF-1-hiányos (Igf1ff + TBG-Cre-AAV8) és hipertóniás IGF-1-hiányos egerekből (Igf1ff + TBG-Cre-AAV8 + AngII) izolált arteria cerebri media-ból (részletekért lásd a Módszerek című részt). Az adatok átlag \pm SEM-ként lettek megadva (n = 6 minden adatpontra), *p < 0,05 vs kontroll, #p < 0,05 vs kontroll+AngII. A különböző csoportok közötti különbségeket egyutas ANOVA-val, majd Tukey post hoc teszttel állapítottuk meg.

IV.2. Az agyi vénás pangás és a neuroinflammáció szerepe az életkorral összefüggő vaszkuláris patológiákban

IV.2.1. A jugularis véna lekötése károsodott kognitív funkciót eredményez egerekben

Annak meghatározására, hogy a JVL hogyan befolyásolja a kognitív funkciókat egerekben, állatokat kognitív funkciós teszteknek – például a 8 karú vízi labirintus teszteknek – vetettük alá (5. ábra). Az egyes kísérleti csoportokban az egerek tanulási teljesítményét hasonlítottuk össze a kombinált hibaarány napi változásainak elemzésével. A felvétel során mindkét csoport egerei a kombinált hibaarány csökkenését mutatták (5B. ábra) a napok során, ami azt jelzi, hogy megtanulták a feladatot. A tanulás első napja után az áloperált egerek kombinált hibaaránya alacsonyabb volt, mint a JVL operáción átesett egereké (5B. ábra).

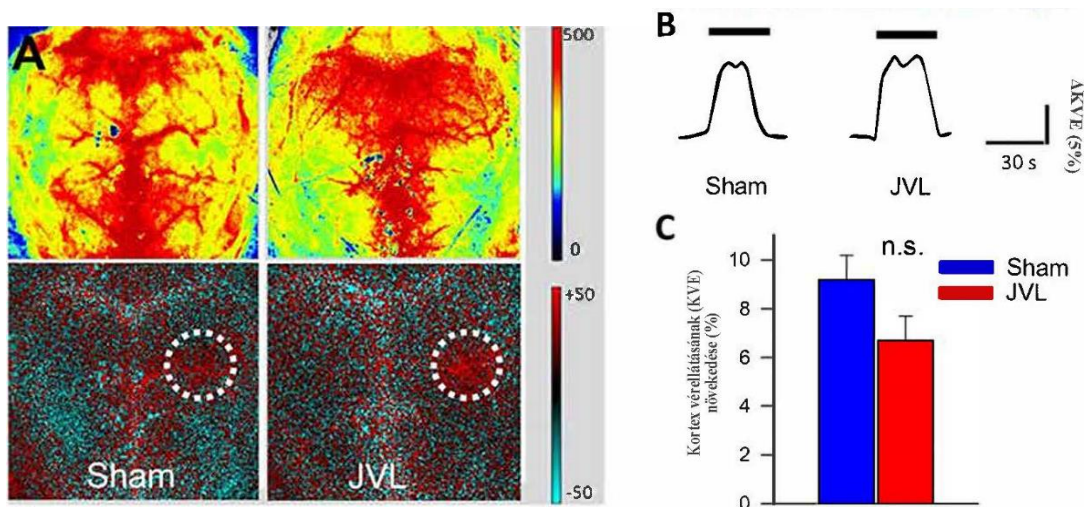
A munkamemória (rövid távú memória, amely az azonnali tudatos észlelésben szerepet játszik) elemzéséhez megvizsgáltuk a helytelen karokba való (rejtett platform nélküli) újbóli belépéseket. Azt találtuk, hogy a munkamemória funkciója a JVL operált egerekben károsodott az áloperált kontroll egerekhez képest (5C. ábra). 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 (az adatokat nem mutatjuk be). 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.



5. ábra: Jugularis véna lekötéssel kiváltott agyi vénás pangás (JVL) károsodott 8 karú vízlabirintushoz társuló (RAWM) teljesítményhez vezet. a) százalékos jelző hő térkép a labirintus különböző helyein eltöltött idő alapján egy véletlenszerűen kiválasztott állat a 3. kísérleti napon látott teljesítményét mutatja be. b) A JVL operáció átesett állatoknál általában magasabb a kombinált hibaarány a tanulási szakaszban és a 10. vizsgálati napon az áloperált állatokhoz képest. c) A JVL operáció szignifikánsan több ismételt hibát, rosszabb munkamemóriát eredményez az áloperált kontrollokhoz képest. $n = 10-15$ minden adatponthoz. Minden adat átlag \pm SEM formában van feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát együttes ANOVA-val számítottuk ki Tukey-féle post hoc tesztet alkalmazva. $*P < 0,05$.

IV.2.2. A jugularis véna lekötése nem befolyásolja a neurovaszkuláris kapcsolási válaszokat

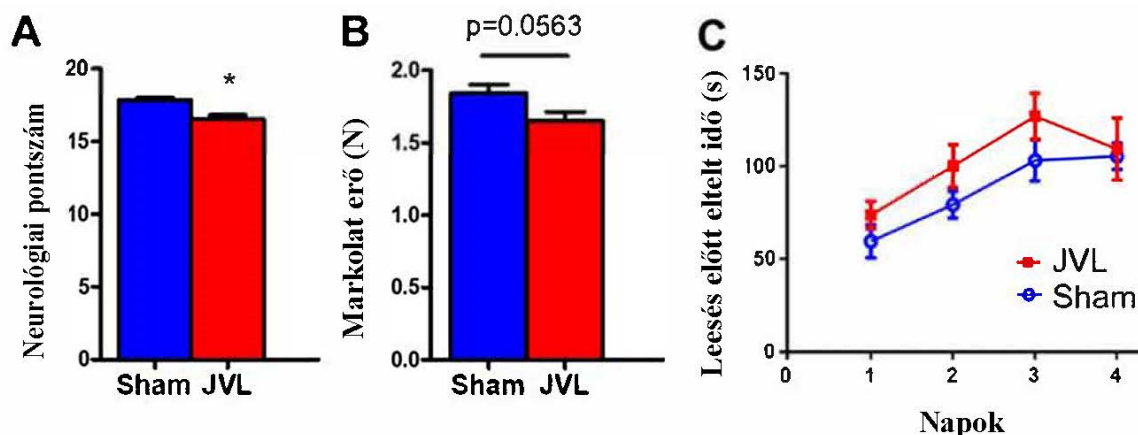
Az ellenoldali bajuszszőr-stimuláció által kiváltott válaszokat a szenzomotoros cortexben a JVL nem befolyásolta (6. ábra).



6. ábra: A JVL operáció hatása a neurovaszkuláris kapcsolásra. a) reprezentatív képek mind áloperált, mind JVL lekötött állatok esetében melyek az ellenoldali bajuszszőr stimuláció hatására létrejött szenzomotoros kortex hiperémiát mutatják. b) a szenzomotoros kortex vérellátásának %-os változásai a két csoportban. Az adatokat átlag \pm S.E.M.-ként adtuk meg (n=6-8 az egyes csoportokban) n.s. jelentése: nem szignifikáns.

IV.2.3. A jugularis véna lekötésének hatása a neurológiai paraméterekre, az izomerőre és a motoros tanulási funkcióra

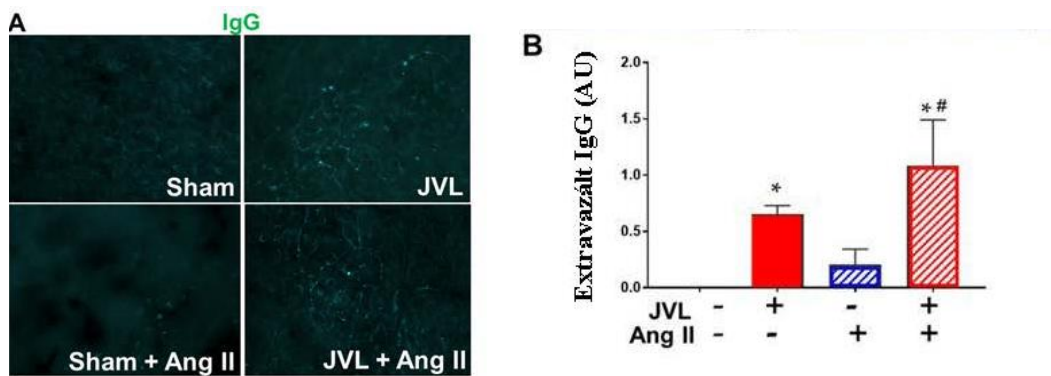
A JVL a neurológiai pontszám jelentős csökkenését eredményezte a kontroll csoporthoz képest (7A. ábra). A JVL motoros teljesítményre gyakorolt hatásának ellenőrzéséhez megvizsgáltuk a változásokat az izomerőben, illetve az egyensúlyban és állóképességben. Az izomerő mérésére markolat-erőmérőt, míg az egyensúly és állóképesség mérésére az ún. rotarod eszközt használtuk. A JVL operált egerek izomereje tendenciózusan csökkent volt a kontroll állatokéhoz képest (7B. ábra). A motoros képességek tanulását módosított rotarod teszttel értékeltük. Egyensúlyt és állóképességet tekintve nem volt érdemi különbség a két csoport között (7C. ábra).



7. ábra: A JVL operáció hatása a neurológiai funkcióra, izomerőre és a motoros tanulásra. A) a JVL operált egerek neurológiai funkciója szignifikánsan rosszabb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva B) a JVL operált állatok izomereje tendenciózusan gyengébbnek bizonyult a kontroll csoporthoz viszonyítva. C) az egyensúlyérzékenységet és állóképességet vizsgáló motoros tanulásban érdemi különbség nem mutatkozott a két csoport között. Az adatok átlag \pm S.E.M.-ként vannak ábrázolva (n=10-20 az egyes kísérletekben). *P < 0.05 vs. sham control.

IV.2.4. A jugularis véna lekötése súlyosbítja a hipertónia által kiváltott BBB károsodást a hippocampusban

Extravazált plazmából származó IgG-t használva a megnövekedett hippocampalis cerebrovasculáris permeabilitás markereként, teszteltük azt a hipotézist, hogy egerekben az agyi vénás pangás önmagában összefüggésbe hozható a BBB integritásának károsodásával. A plazmából származó IgG immunfestése jelentős IgG-lerakódásokat mutatott ki JVL operált egerek hippocampusában, amit tovább súlyosbított a magas vérnyomás (8. ábra). A hipertóniás áloperált egerek hippocampusában az IgG szivárgás szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a normotenzív áloperált egerek esetében egyáltalán nem volt kimutatható IgG szivárgás (8. ábra).

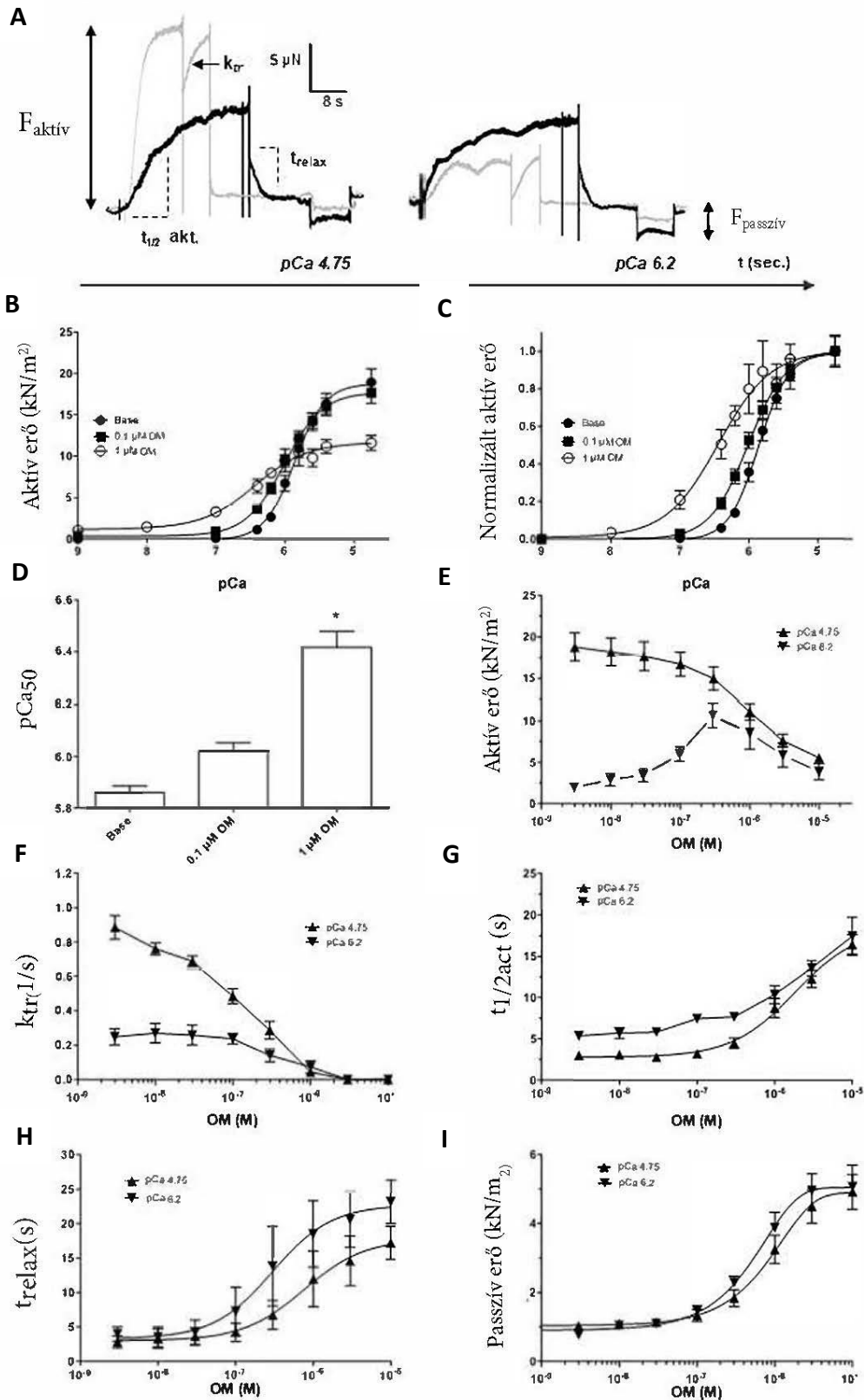


8. ábra: A JVL operáció által kiváltott agyi vénás pangás hozzájárul a BBB integritásának roncsolásához. A) reprezentatív konfokális mikroszkópos képek, melyek a kilépő IgG-t mutatják (zöld) az egyes csoportok hipokampuszában. B) a kilépő IgG mennyiségének analízise az egyes csoportokban. A JVL operált állatok esetében szignifikánsan több a kilépő IgG mennyisége. Az adatok átlag \pm S.E.M. -ként lettek megadva (n=4-6 állat/csoport) *P < 0.05 vs. sham kontrol, #P < 0.05 vs. Ang II nélkül.

IV.3. Az Omecamtiv Mecarbil *in vivo* és *in vitro* hatásai állatmodellben

IV.3.1. Az Omecamtiv mecarbil *in vitro* befolyásolja a Triton-X-100-al permeabilizált humán kardiomiociták összehúzódását, relaxációját, Ca²⁺-érzékenységét és merevségét

Az OM hatását a Triton-X-100 permeabilizált humán szívizom összehúzódásra (9A. ábra) alacsony (0,1 μ M) és magas (1 μ M, 401 ng/ml) koncentrációjú OM jelenlétében is teszteltük (9B-9D. ábrák). A kalcium-függő aktív erő szignifikánsan megnövekedett nagyon alacsony Ca²⁺-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 (9B. ábra). A miocita erőgenerálás Ca²⁺-érzékenysége (pCa₅₀) $5,86 \pm 0,02$ -ről $6,42 \pm 0,06$ -ra nőtt (9C. és D. ábra) 1 μ M OM jelenlétében. Ugyanaz a dózis OM többszörösére növelte a Ca²⁺-aktivált erőtermelést (F_{aktív}) alacsony Ca²⁺-koncentráció mellett (a pCa 6,2-nél a F_{aktív} $1,7 \pm 0,3$ -ról $8,6 \pm 1,9$ kN/m²-re nőtt; 9E. ábra), míg a maximális Ca²⁺-aktivált erőt csökkentette az aktiválás maximális szintjén (a pCa 4,75-nél az F_{aktív} $20,4 \pm 2,0$ -ról $11,0 \pm 1,0$ kN/m²-re csökkent; 9E. ábra). A Ca²⁺-függő erőtermelés sebessége (k_{tr}) 1 μ M OM-koncentráció mellett a Ca²⁺-koncentrációtól függetlenül csökkent (k $0,97 \pm 0,06$ -ról $0,04 \pm 0,01$ 1/s-ra, és $0,28 \pm 0,00,05$ -ről $0,107 \pm 0,04$ -re) magas és szubmaximális Ca²⁺-szintek mellett; (9F. ábra). A fél-maximális összehúzódáshoz szükséges idő (t_{1/2}) $5,06 \pm 0,47$ -ről $10,40 \pm 1,11$ s-ra és $2,80 \pm 0,21$ -ről $8,75 \pm 8,75$ -re nőtt szubmaximális Ca²⁺-szintek és 1 μ M OM koncentráció mellett (9G. ábra). A relaxáció (t_{relax}) kinetikája lelassult $2,67 \pm 0,38$ -ról $18,51 \pm 1,72$ s-ra és $2,74 \pm 0,34$ -ről $12,00 \pm 1,44$ -re szubmaximális és magas Ca²⁺ szintek mellett 1 μ M OM jelenlétében. Végül a Ca²⁺-független (passzív) merevség (F_{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 Ca²⁺ szintek mellett 1 μ M OM jelenlétében (9I. ábra).



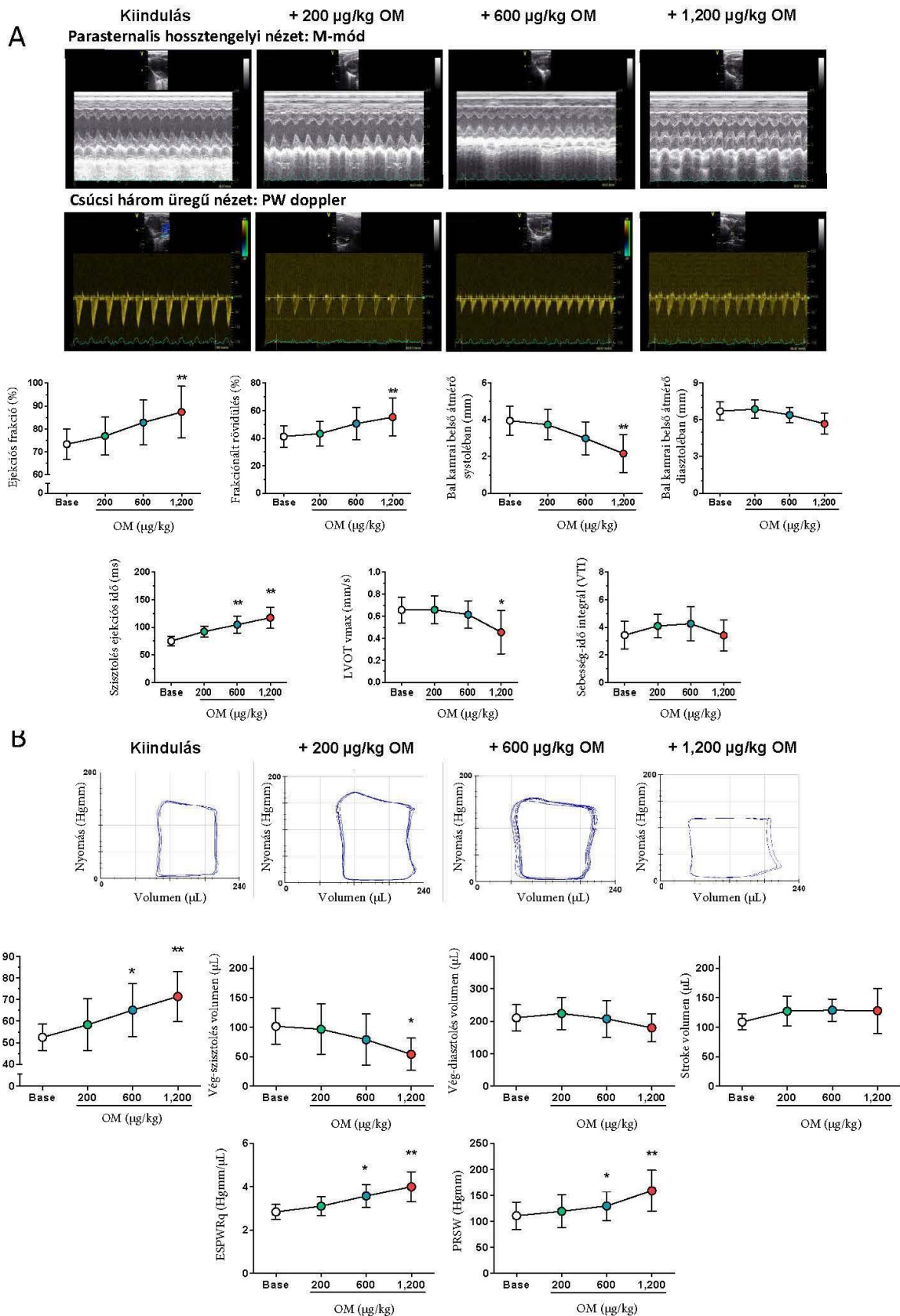
9. ábra: Az Omecamtiv mecarbil Ca^{2+} érzékenyítő hatása, lassabb kontrakció-relaxációs kinetikát és megnövekedett passzív merevséget idéz elő a permeabilizált humán kardiomiocitákban. Reprezentatív regisztrátumok maximális ($p\text{Ca } 4,75$; $\approx 18 \mu\text{M}$) és szubmaximális ($p\text{Ca } 6,2$; $\approx 0,63 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -koncentrációnál illusztrálják az $1 \mu\text{M}$ omecamtiv mecarbil (OM) hatását izolált, permeabilizált humán bal kamra szívizomsejtek aktív erejére. Szürke regisztrátum: kontrollok; fekete regisztrátum ugyanazon

sejtek OM jelenlétében (A). A mérés lépéseit pCa 6,2 mellett a fekete regisztrátum jelzi. Először a permeabilizált bal kamrai kardiomiocitát Ca^{2+} tartalmú oldatba helyeztük és rögzítettük a kifejlődő Ca^{2+} -függő aktív erőt. Ezután a készítményt relaxáló oldatba (pCa 9) vittük át. A steady-state relaxáció után a passzív merevséget a szarkomerek passzív szintre történő lerövidítésével határoztuk meg. A Ca^{2+} -koncentráció-aktív erő összefüggést is meghatároztuk (A-B) és (C) paneleken abszolút és relatív [normalizált] egységekben 0,1 és 1 μM OM jelenlétében (a jelzett módon) ábrázoltuk. Az oszlopdiagram (D) 7-9 egyedi mérés átlag \pm S.E.M. értékeit mutatja (a szignifikáns különbséget [$P < 0,05$] az alapvonalhoz képest csillag jelzi). Az OM kétfázisú hatással volt az aktív erőgenerálásra, amint azt a koncentráció-aktív erő grafikon mutatja pCa 4,75 (E) értéknél. A grafikonokon az aktív erőgenerálás összesített sebessége (ktr) (F) és a Ca^{2+} -függő erő kifejlődésének a félmaximális időigénye ($t_{1/2}$) (G) látható. Végül a relaxáció sebességét (t_{relax}) (H) és a passzív (Ca^{2+} -független) merevséget ($F_{\text{passzív}}$) (I) is meghatároztuk különböző OM koncentrációk mellett. Az alkalmazott OM koncentrációk a vízszintes - tengelyeken láthatók. A szimbólumok 7-9 független meghatározás átlagát jelentik. A hibásávok a S.E.M.-et jelzik.

IV.3.2 Az Omecamtiv mecarbil pozitív inotrópiát vált ki patkányban *in vivo*

A 200, 400 és 600 $\mu\text{g}/\text{testtömeg-kg}$ (BW) OM intravénás, kumulatív alkalmazása (1200 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ maximális dózissal) javította a szív szisztolés funkcióját, amint azt az echokardiográfia is kimutatta (10A. ábra). Az ejekciós frakció (EF) $73,3 \pm 2,2$ -ről $87,4 \pm 3,6\%$ -ra nőtt; a frakcionált rövidülés (FS) $41,2 \pm 2,3$ -ről $55,3 \pm 4,1\%$ -ra nőtt. A szisztolében mért LV belső átmérő (LVIDs) $4,0 \pm 0,2$ -ről $2,2 \pm 0,3$ mm-re csökkent; a bal kamra belső átmérője diasztolében (LVIDd) $6,7 \pm 0,2$ mm-ről $5,7 \pm 0,3$ mm-re csökkent; és a szisztolés ejekciós idő (SET) $75,2 \pm 2,5$ -ről $117,4 \pm 6,1$ ms-ra nőtt. Ezzel párhuzamosan a maximális véráramlási sebesség a bal kamrai kiáramlási traktusban (LVOT max. sebesség) $0,66 \pm 0,04$ -ről $0,46 \pm 0,07$ mm/s-ra csökkent, míg az LVOT sebesség-idő integrál nem változott szignifikánsan.

A szisztolés funkció javulását az LV P–V mérések is kimutatták, azonos körülmények között (10B. ábra): EF $52,5 \pm 2,0$ -ről $71,4 \pm 3,9\%$ -ra nőtt. A bal kamrai végszisztolés térfogat $101,6 \pm 10,2$ -ről $54,2 \pm 9,1$ μl -re csökkent, míg a bal kamrai végdiasztolés térfogat enyhén csökkent, ami a verőtérfoogat nem szignifikáns növekedését eredményezte, $109,0 \pm 4,5$ -ről $127,7,8$ μl -re. A terheléstől független kontraktilitási indexek szintén egyértelmű javulást mutattak a szisztolés teljesítményben: mind a végszisztolés P–V összefüggés (ESPVR_q), mind a preload-recrutable stroke work (PRSW) nőtt ($2,8 \pm 0,1$ -ről $4,0 \pm 0,2$ Hgmm/ μl -re, $110,9 \pm 8,7$ és $159,1 \pm 13,2$ Hgmm között).

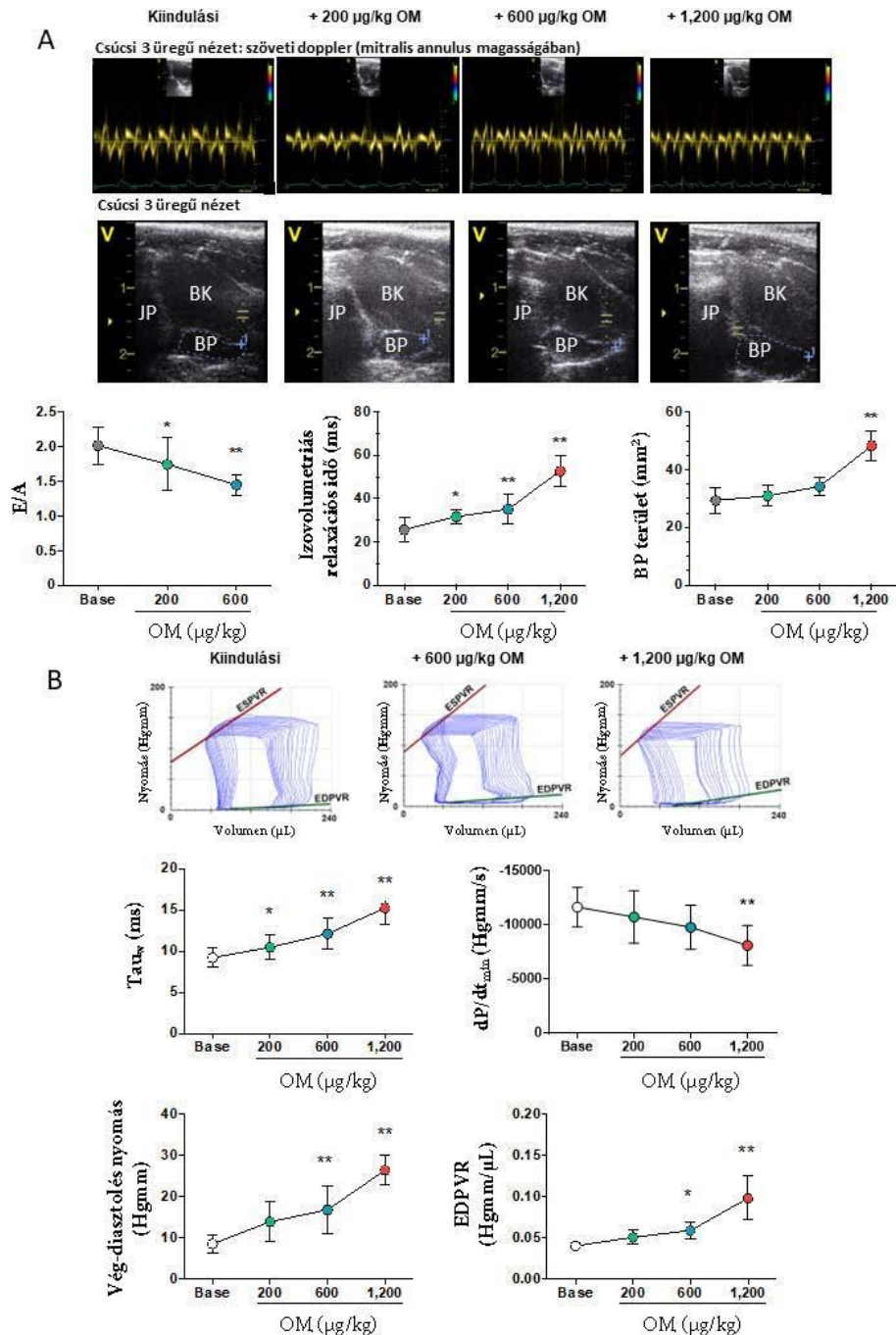


10. ábra: Az Omecantiv mecarbil javítja a bal kamra szisztolés funkcióját patkányban. Az Omecantiv mecarbilt (OM) patkányokon *in vivo* teszteltük 200-1200 µg/ttkg kumulatív dózisban. A bal kamra szisztolés funkcióját echokardiográfiával (A) és bal kamrai nyomás-térfogat analízissel (B) vizsgáltuk.

M-módot használtunk a parasternális hosszú tengely nézetben (reprezentatív felvételek a felső sorban), hogy meghatározzuk az ejekciós frakciót, a frakcionált rövidülést, a bal kamra vég-szisztolés belső átmérőjét és a bal kamra vég-diasztolés belső átmérőjét. A pulzatis (PW) Doppler módszerrel (a bal kamrai kiáramlási traktusból) meghatároztunk olyan hemodinamikai paramétereket (reprezentatív felvételek a nyomok alsó sorában), mint például a bal kamrai szisztolés ejekciós idő, maximális véráramlási sebesség a bal kamrai kiáramlásnál és bal kamrai kiáramlási traktus VTI értéke, amint az a grafikonokon látható. Reprezentatív bal kamrai nyomás-térfogat hurkokat kaptunk különböző kumulatív OM dózisoknál a nyomás-térfogat elemzés során (B). Az ejekciós frakció, a végszisztolés térfogat, a végdiasztolés térfogat, a lökettérfogat és a terheléstől független kontraktilitási indexek (a szisztolés végnyomás-térfogat összefüggés meredeksége; valamint a preload recruitable stroke work különböző OM dózisok esetén láthatók a grafikonokon. A független megfigyelések száma 8-14 volt az echokardiográfiánál és 9 a nyomás-térfogat elemzésnél. A szimbólumok az átlagot és S.E.M.-et jelentik. A kezdeti (alap) értékektől való szignifikáns eltéréseket az OM alkalmazásakor (a kumulatív dózisok a vízszintes tengelyeken láthatók) csillagokkal jelöltük: *P < 0,5; **P < 0,01.

IV.3.3 Az Omecamtiv mecarbil diasztolés diszfunkciót okozó patkányokban *in vivo*

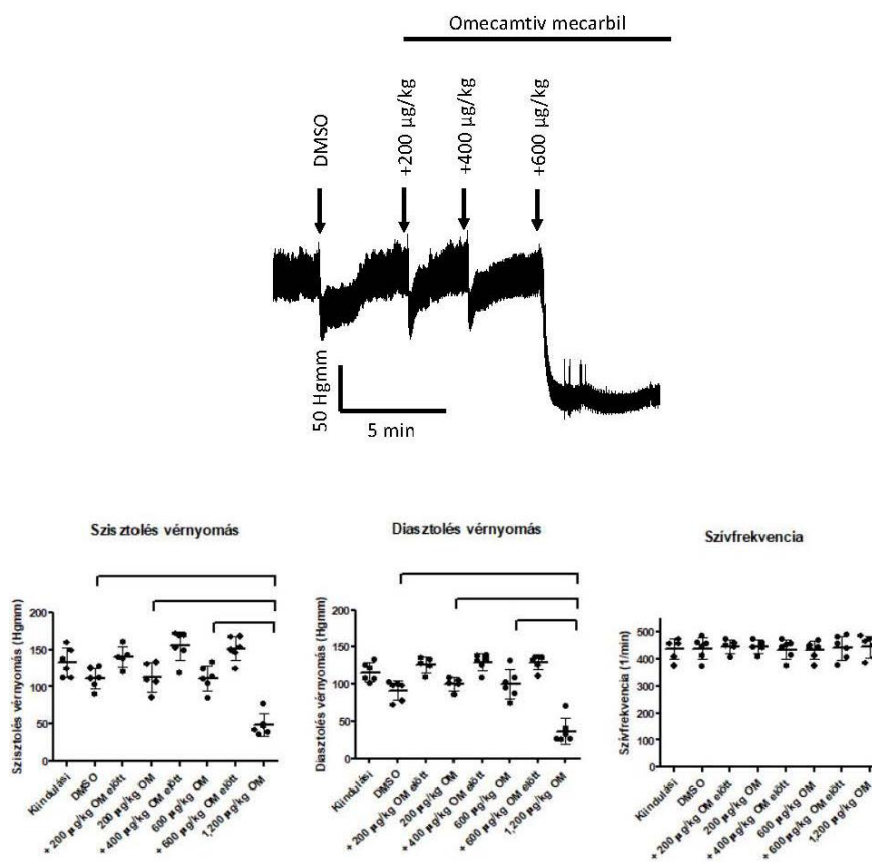
Az OM-kezelés a diasztolés diszfunkció jeleivel is összefüggésbe hozható az echokardiográfián (11A. ábra): a mitrális billentyű szintjében mért E/A arány $2,02 \pm 0,08$ -ról $1,45 \pm 0,03$ -ra csökkent; Az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) $25,6 \pm 1,6$ ms-ről $52,7 \pm 2,7$ ms-ra, a bal pitvari (LA) belső terület pedig $29,4 \pm 1,7$ -ről $48,3 \pm 2,0$ mm²-re nőtt. A diasztolés diszfunkcióra utaló jelek jelen voltak a P–V analízissel is (11B. ábra). 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}) - $11\,642 \pm 603$ -ról -8096 ± 614 -Hgmm/s -ra csökkent. A bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) $8,6 \pm 0,8$ -ról $26,4 \pm 1,2$ Hgmm-re nőtt, a végdiasztolés P-V összefüggés (EDPVR) pedig $0,040 \pm 0,001$ -ről $0,098 \pm 0,09$ Hgmm/μl-re (11B. ábra).



11. ábra: Az Omecamtiv mecarbil negatívan befolyásolja a bal kamra diasztolés telődését patkányban. Az Omecamtiv mecarbilt (OM) patkányokon *in vivo* teszteltük. A bal kamra diasztolés funkcióját echokardiográfiával (A) és bal kamrai nyomás-térfogat analízissel (B) vizsgáltuk. A mitralis billentyűnél pulzatilis Doppler beáramlást használtuk a kamrai töltődés két fázisa arányának (E/A) meghatározására. Az izovolumetriás relaxációs idő meghatározására a mitralis gyűrűnél alkalmazott szöveti Doppler módszert (reprezentatív egyéni felvételek a felső sorban) alkalmaztuk. A bal pitvar területét kétdimenziós képekből határoztuk meg apikális 3 üregű nézetben (a reprezentatív piktogramok a szöveti Doppler felvételek alatti sorban láthatók), és az értékeket a grafikonokon ábrázoltuk. A bal kamrai nyomás-térfogat összefüggések reprezentatív eredeti felvételei a vena cava inferior átmeneti okklúziója során különböző OM-dózisok mellett a (B) panel felső sorában láthatók. Nyomás-térfogat analízissel a következő diasztolés paramétereket kaptuk: a bal kamrai aktív relaxáció indexei (dP/dt_{min} és az izovolumikus relaxációs állandó) és a bal kamrai merevség (végdiasztolés nyomás és a végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége) indexei. A független megfigyelések száma 7-14 volt az echokardiográfiánál és 9 a nyomás-térfogat elemzésnél. A szimbólumok az átlagot és S.E.M.-et jelentik. A kezdeti (alap) értékektől való szignifikáns eltéréseket az OM alkalmazásakor (a kumulatív dózisok a vízszintes tengelyeken láthatók) csillagokkal jelöltük: *P < 0,5; **P < 0,01.

IV.3.4 Az Omecamtiv mecarbil magas dózisokban hipotenziót vált ki patkányban *in vivo*

Invazív vérnyomásméréseket végeztünk patkányokon (12. ábra). A DMSO (oldószer) önmagában a vérnyomás enyhe csökkenéséhez vezetett, mely az alkalmazás után 5 percen belül visszatért a normál szintre. Az OM mind a szisztolés (149 ± 6-ról 49 ± 6 Hgmm-re $P < 0.05$), mind a diasztolés (130 ± 4-ről 37 ± 4-re $P < 0.05$) vérnyomás értékeket jelentősen csökkentette 1200 µg/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) (12. ábra).

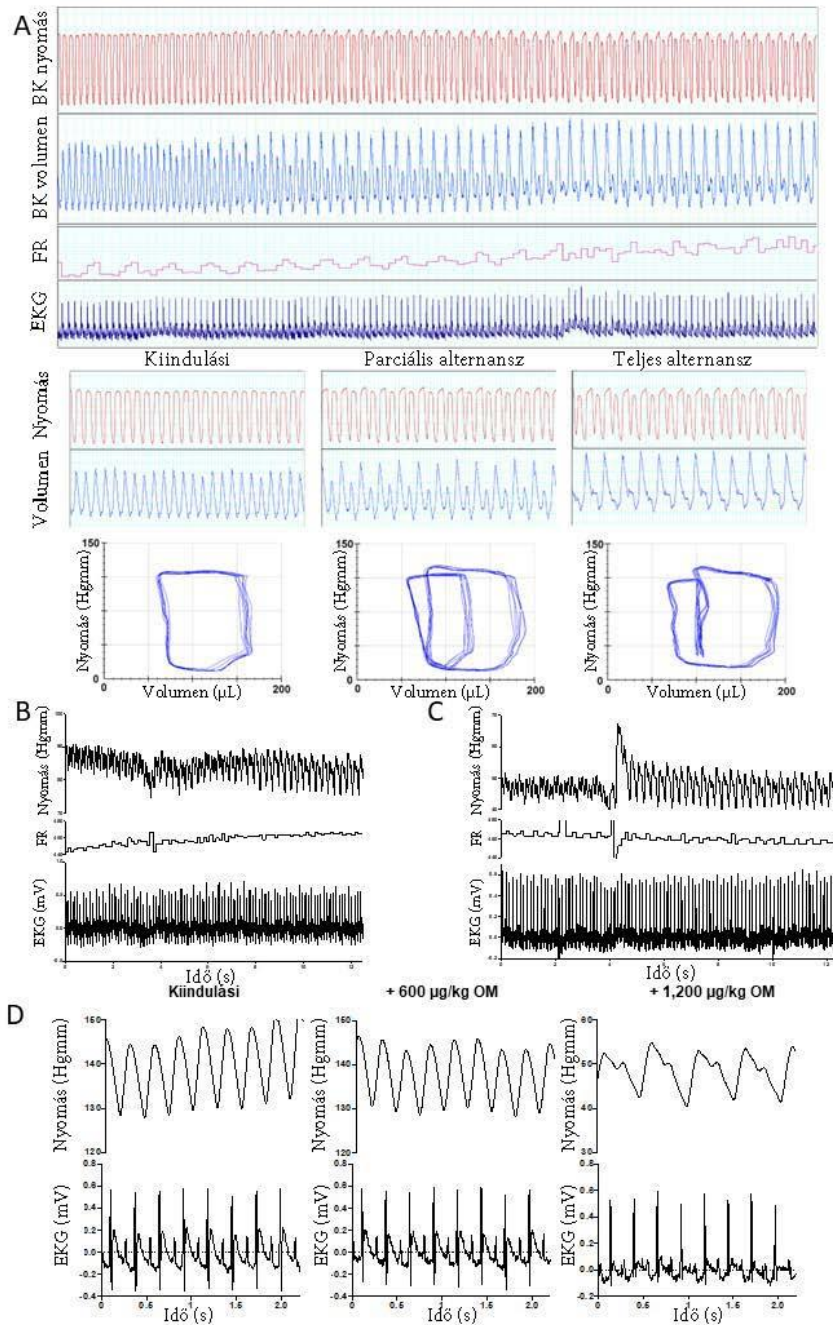


12. ábra: Az Omecamtiv mecarbil súlyos hipotenziót vált ki patkányban. Az oldószer (dimetil-szulfoxid [DMSO]) önmagában történő alkalmazása és az OM növekvő dózisa egy reprezentatív invazív vérnyomás-felvételben látható a tetején. A szisztolés és diasztolés vérnyomást és pulzusszámot közvetlenül a bolus injekciók előtt és 5 perccel azután határoztuk meg, ezeket a vízszintes tengelyen ábrázoltuk. Minden szimbólum egy egyedi mérést jelöl. A mérések átlaga és S.E.M.-je a grafikonokon látható. A szignifikáns ($P < 0,05$) különbségeket a kapcsok jelzik.

IV.3.5 Az Omecamtiv mecarbil tranzien elektromechanikus váltakozást vált ki patkányban nagy dózisok mellett *in vivo* körülmények között

Az OM tranzien, periodikus, elektromechanikus váltakozásokat váltott ki. Ezeket a normál és az alacsony vagy hiányzó kilökődések közötti oszcilláció jellemezte ütésről-

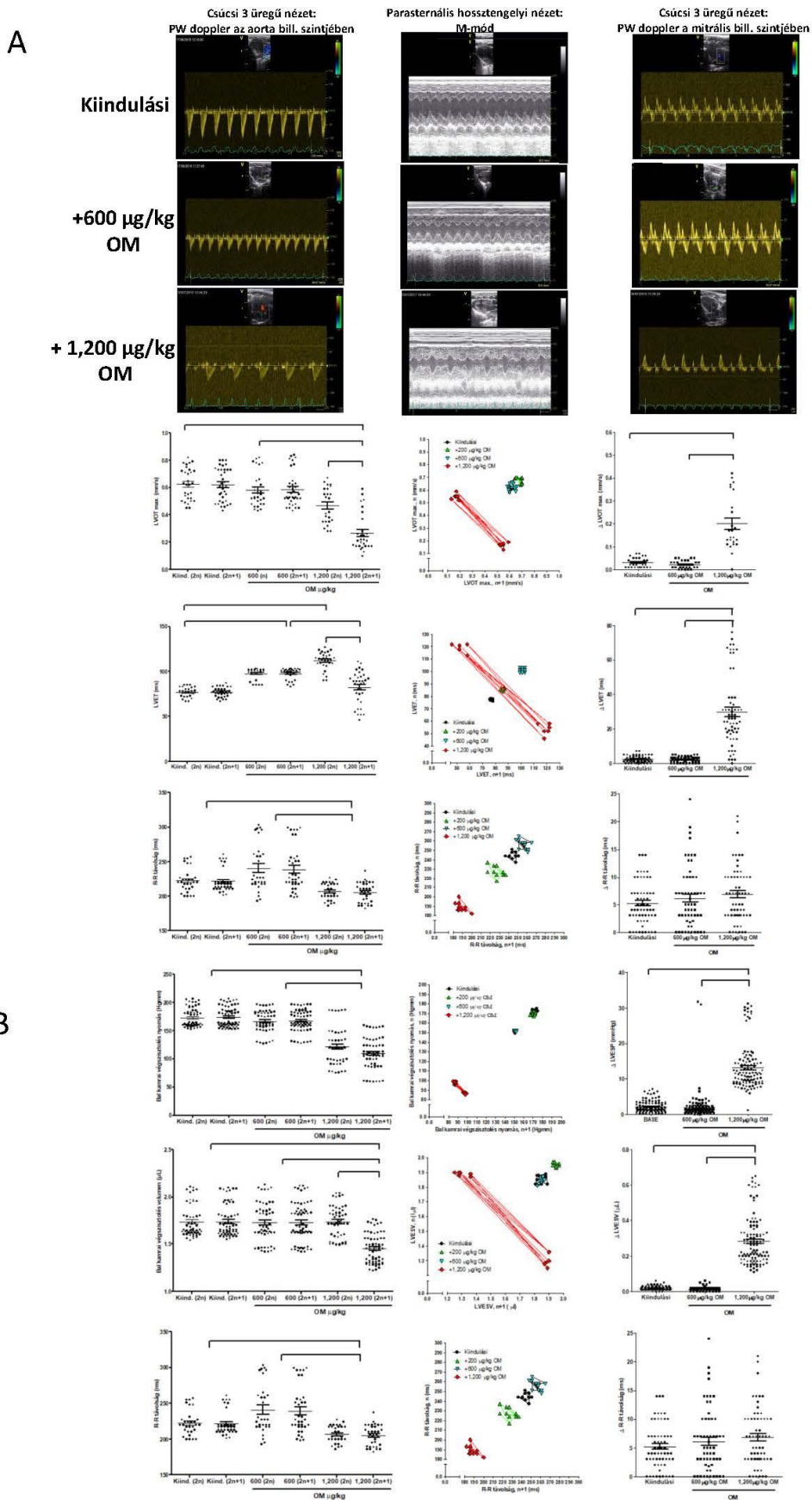
ütésre (13A. ábra). Ezt a mintázatot a 30 vizsgált patkány közül 23-nál figyeltük meg. Váltakozó kontraktilis diszfunkció részleges vagy teljes formában nyilvánul meg, és a bal kamra diasztolés telődése különbözteti meg a két formát. A részleges alternánsokat akkor határoztuk meg, amikor a normál szisztolét 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 összehúzódás következett a normál systole után (13A. ábra). A nagy dózisú OM (1200 µg/ttkg) beadása után a szisztémás vérnyomás *in vivo* intraartériás mérése rávilágított ezen átmeneti időszakok kezdetére. Az alternáns mintázat vagy fokozatosan, párhuzamosan a pulzusszám emelkedésével (13B. ábra), vagy pedig egy extra ütéssel indult el (13C. ábra). Az artériás vérnyomás váltakozó emelkedéseként jelentkeztek, hasonlóan a pulsus alternans néven ismert klinikai jellemzőhöz (13D. ábra). Ezt a jelenséget nem figyeltük meg alacsonyabb OM-dózisok esetén.



13. Ábra: Az Omecamtiv mecarbil átmeneti pulzus alternanst idéz elő patkányban. Az omecamtiv mecarbil (OM) nagy dózisa (1200 µg/ttkg kumulatív dózis) tranziens (rövid ideig tartó, visszatérő) elektromechanikus alternansokat (váltakozó pulzus nélküli elektromos aktivitást) váltottak ki patkányban. A jelenség megfigyelhető volt bal kamrai (LV) nyomás-térfogat analízis (A) és invazív vérnyomásmérés (B-D) során is. Az elektromechanikus alternánok jellemzőit és kifejlődését reprezentatív kísérletek mutatják be. A bal kamrai nyomás, térfogat, pulzusszám (HR) és az elektrokardiogram (EKG) párhuzamos mérésének egyedi, reprezentatív felvétele az (A) panel felső részében látható. Az (A) panel alsó részében a kiindulási állapot, részleges és total alternans esetén ábrázoltunk reprezentatív bal kamrai nyomás, térfogat regisztrátumokat és P-V hurkokat. Az alternansok fejlődését reprezentatív felvételek is mutatják invazív artériás vérnyomásmérésekkel (B, C). Az elektromechanikus alternansok a szívfrekvencia enyhe emelkedése (A, B) vagy extrasystole (C) hatására alakultak ki. A kezdettől függetlenül az alternans-t pulzus elektromos aktivitás jellemezte, amely ismételt megjelent egy normál ütés után, amit a párhuzamos nyomású hullámforma és az EKG-felvételek mutatnak az kiindulási helyzetben, és a kumulatív OM-dózis 1200 µg/kg beadását követően (D). Az ábrán egyedi, reprezentatív felvételeket mutatunk be, amelyeket kifejezetten e funkció illusztrálására választottunk ki.

Echokardiográfiát (14A–D. ábra) és közvetlen LV P–V méréseket (14E–G. ábra) végeztünk a normál és a csökkent összehúzódások közötti oszcilláció jellemzésére. Az összehúzódások oszcilláló jellege leginkább a Poincaré-diagramokon értékelhető. A pincarré diagramokon az echokardiográfiából és a P–V felvételekből származó paraméterek két különálló adatpontcsoportját ábrázoltuk (amelyek a normál és az egymást követő frusztrált összehúzódásokat jelentik). A maximális LVOT-sebesség ütésről-ütésre alapon $0,47 \pm 0,03$ mm/s-ról $0,27 \pm 0,03$ mm/s-ra változott az egymást követő normál és csökkent effektivitású ütések során 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OM dózis mellett és az egymást követő értékek közötti különbségek nagyobb szórása tükröződött az adatokból ($0,030 \pm 0,004$ -tól $0,200 \pm 0,024$ mm/s-ig; 14B. ábra). Hasonlóképpen, a SET kifejezett váltakozást mutatott OM 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kumulatív dózis mellett, $111,9 \pm 1,8$ ms-ról $82,1 \pm 3,0$ ms-ra az egymást követő ütések esetén (14C. ábra) és ennek megfelelően a magasabb dózis mellett az egymást követő értékek közötti különbség is jelentősebbnek mutatkozott az alaphelyzethez képest (14C. ábra) ($2,3 \pm 0,2$ vs. $29,8 \pm 2,7$ ms). Ezzel szemben a szív ciklus hosszában (R-R távolság) nem figyeltünk meg változást (14D. ábra).

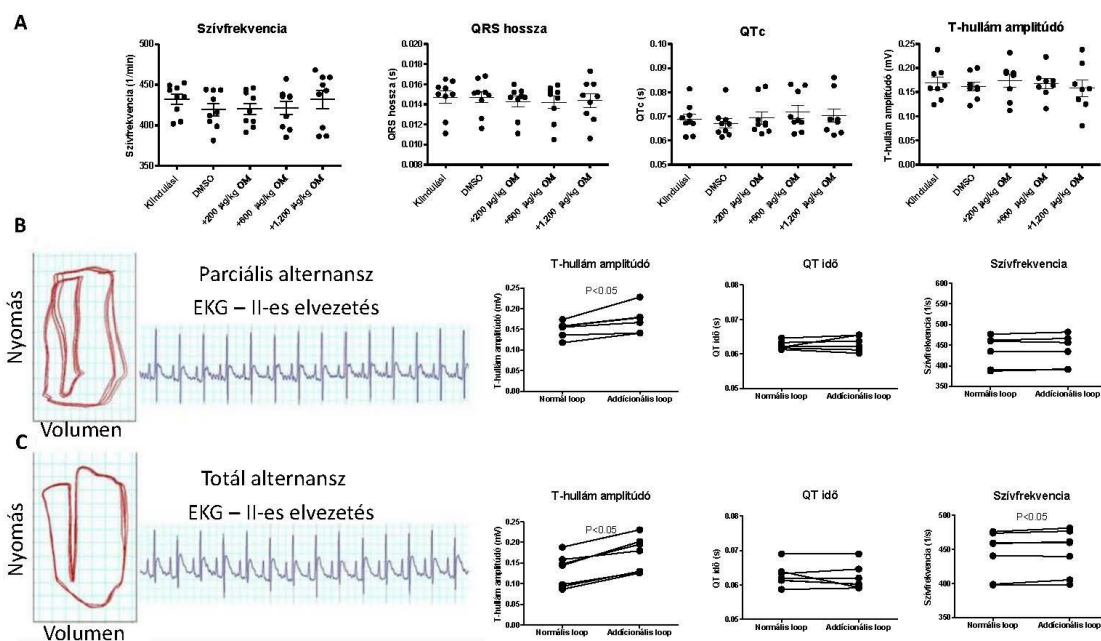
Ennek a váltakozásnak a funkcionális jellemzőit közvetlen P–V felvételekkel vizsgáltuk tovább (14E–G. ábra). Az LV végszisztolés nyomásértékei 172 ± 2 -ről 92 ± 6 Hgmm-re csökkentek (14E. ábra), és az ütésről ütésre variabilitás jelentős váltakozását figyeltük meg (az ütések közötti variabilitás $2,0 \pm 0,2$ -ről $13,1 \pm 0,6$ mm-re emelkedett) a kumulatív 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ OM dózis elérését követően. Az LV végszisztolés volumen (LVESV) szintén alternansz mintázatot mutatott 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ OM-dózis mellett, amit az egymást követő ütések közötti különbségek szemléletesen mutatnak: 183 ± 6 μL a normál ütéseknel és 111 ± 5 μL az 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ OM dózis mellett (14F. ábra). Ez a tulajdonság különösen szembetűnő volt a Poincaré-görbén, ami az egymást követő értékek közötti különbségek nagyobb diverzitásával jellemezhető ($0,5 \pm 0,7$ vs. 71 ± 5 μL baseline és 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ OM dózis esetén). A párhuzamosan készített EKG-t szintén megvizsgáltuk. Az R-R távolság 141 ± 1 ms-ról 137 ± 1 ms-ra csökkent ($P < 0,05$) anélkül, hogy az R–R időtartam változott volna: az R–R távolság értéke 137 ± 2 ms volt normál ütések és 137 ± 1 ms a csökkent effektivitású ütések után 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ OM-dózis mellett (14G. ábra).



14. ábra: Az omecamtiv mecarbil periodikus elektromechanikus alternánst váltott ki patkányban *in vivo*. Echokardiográfiát (A–D) és a bal kamrai nyomás–térfogat összefüggéseket (E–G) rögzítettük az omecamtiv mecarbil (OM) 1200 µg/ttkg (BW) dózisa által kiváltott elektromechanikus alternánsok

további értékelésére. A reprezentatív echokardiográfiás felvételek az (A) panelen láthatók. Minden szimbólum egy egyedi mérést jelöl (12 egymást követő szívciklus minden állatban), az átlaggal és a standard hibával együtt a bal oldali grafikonokon. Az ütések közötti variabilitás a Poincaré-grafikonokon látható a grafikonok középső részén, ahol a tényleges ütés értéke a következő ütés értékének függvényeként van ábrázolva egy egyedi reprezentatív felvételen. A Poincaré ploton az egymást követő értékeket vonalak kötik össze. Az OM kumulatív dózisát a vízszintes tengelyeken markerek vagy a Poincaré-grafikonon pedig színkódolt szimbólumok jelzik. Az egymást követő ütéspárok közötti különbséget a jobb oldali grafikonok ábrázolják. Szignifikáns különbségek ($P < 0,05$) az 5-6 (echokardiográfia) és 9 (nyomás-térfogat-elemzés) mérések értékei között a kapcsok jelzik. A bal kamrai kiáramlási pálya sebességét (B) és a bal kamrai szisztolés ejekciós idejét (C) pulzatis Dopplerrel határoztuk meg az aortabillentyű szintjén, csúcsi 3 üregű nézetben, míg a szívciklus hosszát (D) párhuzamos elektrokardiográfiával határoztuk meg. felvétel. Az elektromechanikus alternánsok jellemzőit a bal kamrai nyomás-térfogat összefüggések segítségével is rögzítettük, az echokardiográfiás adatokhoz hasonlóan ábrázolva az adatokat (E–G). A bal kamrai végszisztolés nyomást (E) és a bal kamrai végdiasztolés térfogatot (F) a bal kamrába helyezett szondával, míg a szívciklus hosszát (G) a párhuzamos EKG-felvétel alapján határoztuk meg.

Az elektrokardiográfiás felvételek részletes kiértékelése azt mutatta, hogy az OM 1200 $\mu\text{g}/\text{tkg}$ dózisa nem volt hatással a pulzusszámra, a QRS időtartamára, a korigált QT-intervallumra vagy a T-hullám amplitúdójára az alternans nélküli periódusokban (15A. ábra). Azonban T-hullám váltakozás volt megfigyelhető olyan esetekben, amikor elektromechanikus alternans jelenség állt fent (15B. ábra). Ezen túlmenően a szívciklus látszólag hosszabbnak tűnt a hatékony (normális) összehúzódások esetén, amit az alacsonyabb pulzusszám jellemez, mint amikor teljes elektromechanikus alternans jelenség volt (15C. ábra).

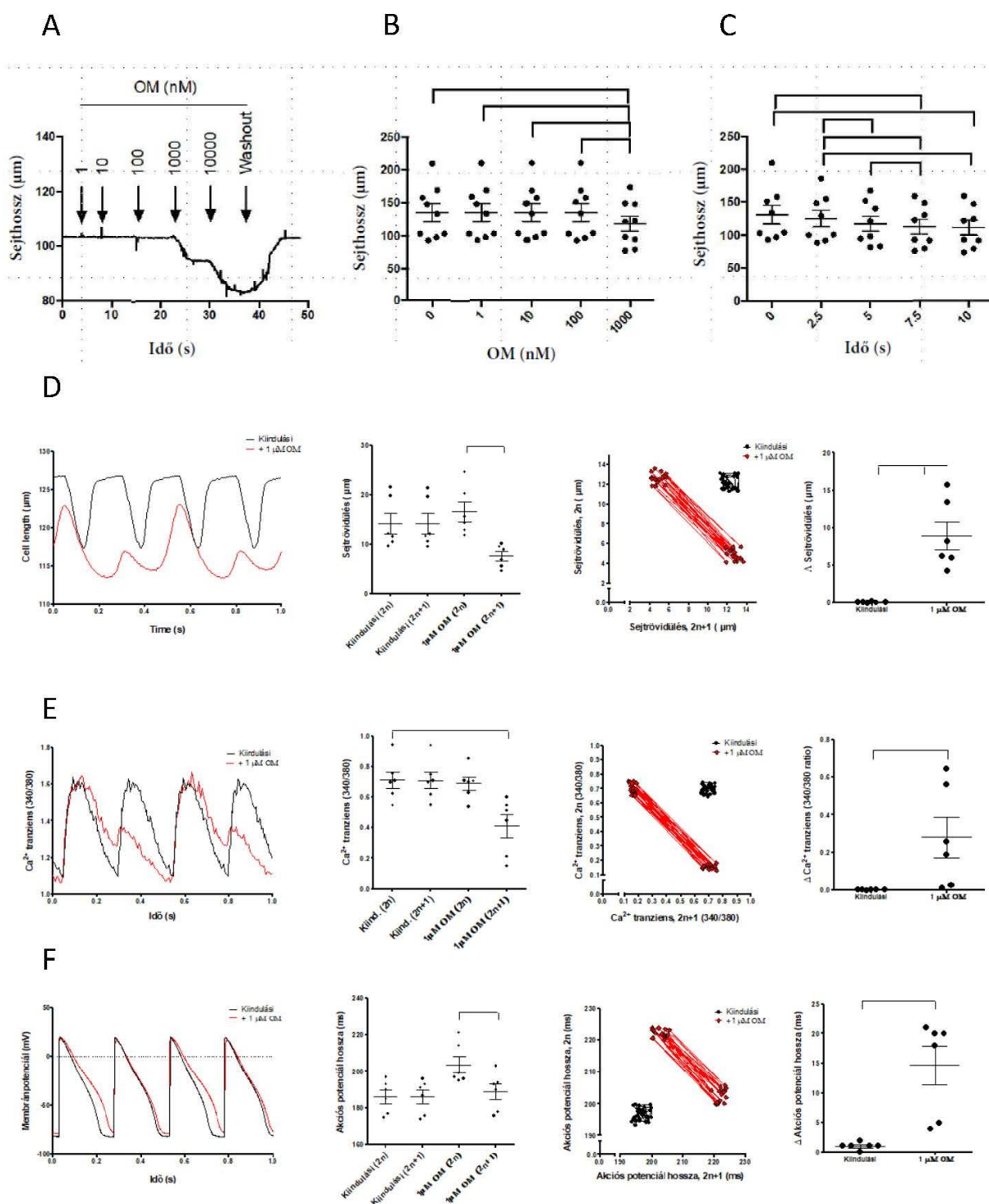


15. ábra: Az Omecamtiv mecarbil átmeneti T-hullámot alternanszt vált ki patkányban. Patkányokon szív elektrokardiogramot rögzítettünk az *in vivo* kísérletekkel párhuzamosan. Az ábrán egy reprezentatív kísérletet és emellett összesített elemzést mutatunk be. A pulzusszámot, a QRS időtartamát, a korrigált QT-intervallumot (QTc; Bazett-formula) és a T-hullám amplitúdóját rögzítettük és ábrázoltuk elektromechanikus alternansok nélküli periódusokban, valamint 1200 µg/testtömeg-kg omecamtiv mecarbil (OM) (a) jelenlétében. A szimbólumok 8 és 9 ismétlés közötti egyedi értékeket jelölnek. Az átlag átlagát és standard hibáját a szórásdiagramok mutatják. Alternans nélküli állapotban nem találtunk statisztikai különbséget a csoportok között. Ezt követően a szív elektrokardiográfiás (EKG) paramétereit értékeltük azokban az átmeneti időszakokban, amikor részleges vagy teljes elektromechanikus alternans jelen volt (b). A reprezentatív nyomás-térfogat hurkok és EKG-felvételek a bal oldalon láthatók. A jobb oldali grafikonok a T-hullám amplitúdóit, a QT-intervallumot és a pulzusértékeket mutatják a normál és az egymást követő csökkent effektivitású hurkokban. A szimbólumok a hat biológiai ismétlésből meghatározott egyedi értékeket jelölik. A szignifikáns eltéréseket a grafikonok jelzik.

IV.3.6. Az Omecamtiv mecarbil megváltoztatja az intracelluláris Ca^{2+} háztartást kutya szívmiocytesekben *in vitro*

Az OM elektrofiziológiai hatásait sejtszinten vizsgáltuk izolált kutya LV kardiomiociták felhasználásával, mivel ezek adják a legjobb modellt az ember számára (16. ábra). Az 1 µM OM-val végzett kezelés növelte a nem stimulált sejtek merevségét (reprezentatív példa a 16A. ábrán). A nem stimulált kardiomiociták hossza 1 µM OM jelenlétében 131 ± 14 -ről 112 ± 11 µm-re csökkent (16B. ábra). Ez az OM által kiváltott csökkent diasztolés hosszúság az alkalmazás után nagyjából 10 percen belül alakult ki (16C. ábra). Az izolált LV szívmiocytesek stimulálása (3 Hz-nél gyorsabb) az *in vivo* mérésekhez hasonlóan oszcillációt eredményezett a normál és a csökkent összehúzódások között ütésről-ütésre. A 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 Ca^{2+} -koncentráció és a membránpotenciál (AP) változásának párhuzamos rögzítésével (16D–F. ábra). Nem volt különbség a kontrakcióban (a sejthossz rövidülése) az OM kezelés előtt az egymást követő kontrakciókban ($14,20 \pm 2,09$ és $14,16 \pm 2,06 \mu\text{m}$), míg az OM beadása után szignifikáns különbség alakult ki ($16,6 \pm 2,0$ és $7,6 \pm 0,9 \mu\text{m}$) (16D. ábra). Ez a váltakozás szembeutó a Poincaré-diagramon, jól látható az egymást követő értékek közötti különbség ($0,09 \pm 0,03$ -ról $8,97 \pm 1,9 \mu\text{m}$ -re $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében; 16D. ábra). Ezzel párhuzamosan a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója (CaT amplitúdó) $0,69 \pm 0,04$ -ről $0,41 \pm 0,08$ -ra csökkent (16E. ábra) $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében, ami ismét látható volt a Poincaré diagramon az egymást követő értékek közötti jelentősen megnövekedett különbségek formájában ($0,002 \pm 0,0007$ -től $0,28 \pm 0,11$ -ig; 16E. ábra). Ezzel összhangban a hosszú akciós potenciálok (AP-k, amelyek normális összehúzóásokat jelentenek) váltakoztak a nem érintett AP-vel (amelyek a csökkent összehúzóásokat jelentik) (akciós potenciál időtartama 90%-os repolarizációnál, az APD90 204 ± 4 és 189 ± 4 ms között váltakozott 16F. ábra.) ami különösen szembeutó volt a Poincaré ploton markáns diszperzió formájában (16F. ábra).



16. ábra: Az Omecamtiv mecarbil befolyásolja a Ca^{2+} ciklust izolált ép kutya bal kamrai szívizomsejtekben. A reprezentatív felvételek az (A–C) paneleken láthatók. A sejthosszakat 10 perces inkubálás után értékeltük ki a megadott koncentrációkkal (0–1000 nM; $n = 9$; omecamtiv mecarbil jelenlétében). Az 1 μM OM kinetikája a szívizomsejtek diasztolés hosszának terhelés nélküli (stimuláció nélkül bekövetkező) csökkenését váltotta ki, amint az az (A–C) paneleken látható. A második kísérletsorozatban párhuzamosan mértük a sejthosszt (optikai mérés; D), az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt (a FURA-2 fluoreszcencia intenzitási arány változásának mérése; E) és a membránpotenciált (mért patch clamp; F) ugyanazon az izolált kardiomiocitán. A stimulációs frekvencia 5 Hz volt. Az OM-kezelés előtti felvételek „Base”, míg az ugyanabból a sejtől OM jelenlétében rögzített jelek „1 μM OM” jelzéssel vannak ellátva. A reprezentatív felvételek a bal oldali grafikonokon láthatók.

Hat biológiai ismétlést rögzítettünk minden paraméterre, majd ezeket értékeltük. Minden szimbólum egyetlen mérést jelöl egy egyedi sejten. Az átlagot vízszintes vonalak jelölik, a hibasávok pedig az átlag standard hibáját. Az egymást követő értékek változásainak megjelenítéséhez Poincaré-diagramokat állítottunk össze 30 egymást követő ciklusból. Ezekon a diagramokon a páros ciklusok ($2n$) paraméterértékei a következő páratlan ciklus ($2n + 1$) értékének függvényében vannak ábrázolva. Végül a jobb oldali grafikonokon minden szimbólum egy egyedi sejt átlagos változékonyságát jelenti. A csoportok közötti szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) a kapcsok mutatják.

V. Megbeszélés

Kísérleteink során a cerebrovaszkuláris öregedés két aspektusát vizsgáltuk meg és vizsgálatainkra támaszkodva több következtetést is levonhatunk. Egyrészt az IGF-1 hiánya negatívan látszik befolyásolni a magas vérnyomás okozta adaptív media hipertrófiát és a szabályozott extracelluláris mátrix (ECM) remodellinget, csökkenti az elasztintartalmat 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 vaszkuláris simaizom sejtek (VSMC) fenotípus változására és az artériás fal adaptív átépülésére, így idős korban hozzájárulhat az intracerebrális mikrovérzésekhez és a következményes kognitív károsodásokhoz (Sonntag et al., 2013; Tarantini, Valcarcel-Ares, et al., 2017). Másrészt kísérleteink által elsőként bizonyítottuk, hogy nem csak az artériás rendszer patológiás elváltozásai járhatnak hozzá a kognitív funkció romlásához, hanem a vénás rendszer hibás működése is oki szereppel bírhat. Kísérleteink alapján az agyi vénás pangás önmagában a vér-agy gát károsításán keresztül neuroinflammációhoz és következményes kognitív diszfunkcióhoz vezethet.

Az életkor előrehaladtával az agyi artériákban a fal/lumen arány és az erek rugalmassága csökken, míg a fal kerületi feszültsége nő, ami az agyi artériák stress-strain görbéjének a balra történő eltolódásával jár (Diaz-Otero et al., 2016). 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. Korábbi tanulmányok az IGF-1 szint csökkenését az aorta falfeszülésével és elmerevedésével hozták összefüggésbe emberekben (Hopkins et al., 1993), illetve az aortafal rugalmasságának a csökkenése szintén kimutatható volt IGF-1 hiányos egerekben (Reddy et al., 2014).

Korábbi tanulmányokkal (Baumbach & Heistad, 1989) összehangban azt találtuk, hogy a magas vérnyomás kontroll egerekben adaptív hipertrófiás átalakulást indukál az agyi artériákban, a belső átmérő csökkenésével, valamint a média hipertrófiájával és az ECM komponensek expressziójának megváltozásával. Az emberekben a magas vérnyomás gyakran hipertófiás átépülést is eredményez, az agyi erek media/lumen

arányának növekedésével (Rizzoni et al., 2009). A médiahipertrófia és az ECM-remodelling olyan adaptív folyamatok, amelyek csökkentik a falfeszülést, védik az érfal integritását magas vérnyomásban. Ezen túlmenően a fent említett szerkezeti változások a szegmentális hidrodinamikai ellenállás növelésével védő hatást fejtenek ki a disztális agyi mikroerekre is, megakadályozva a nagy nyomás behatolását ezen sérülékeny kiserekbe. Az adaptív átalakulások balra eltolódást eredményeznek a hipertóniás kontroll egerek agyi artériáinak stress-strain viszonyában, hasonlóan a spontán hipertóniás patkányok ereihez (Izzard et al., 2003; Izzard et al., 2006). Az esszenciális hipertóniában szenvedő betegek agyi artériáiban a stress-strain görbe szintén balra tolódik (Rizzoni et al., 2009). Ez az eltolódás az érfal elmerevedésére utal ezen kórállapotokban. Több adat utal arra is, hogy az agyi artériáknak nem csak strukturális, hanem funkcionális adaptációja is megjelenik a magas vérnyomás hatására (Toth et al., 2013). Különösen magas vérnyomás esetén fokozódik az agyi artériák miogén tónusa, és kibővül az agyi keringési autoreguláció tartománya, ami hozzájárul az agyi mikrocirkuláció magas nyomástól való védelméhez (Toth et al., 2013). Több bizonyíték is van arra, hogy az öregedés rontja az agyi artériák strukturális és funkcionális alkalmazkodását a magas vérnyomáshoz. Az öregedés a vaszkuláris rugalmasság ellen hat azáltal, hogy negatívan befolyásolja mind a média hipertrófiáját, mind az ECM-remodellinget (Toth et al., 2013). A rendelkezésre álló bizonyítékok azt sugallják, hogy az öregedés az érfali rugalmasság elvesztését eredményezi részben a csökkent elasztin lerakódás és/vagy az mátrix metalloproteinázok fokozott expressziója/aktivitása következtében fellépő fokozott elasztin fragmentáció miatt (Duca et al., 2016; Toth et al., 2015). Az öregedés ezen felül nem csak a strukturális hanem egyben a funkcionális kapacitást is károsíthatja, azaz az agy autoregulációs védelmét is rontja, súlyosbítva a magas vérnyomás okozta potenciális agyi érrendszeri károsodást (Toth et al., 2015; Toth et al., 2013). Feltételezték, hogy a fent említett öregedés által kiváltott strukturális és funkcionális cerebrovaszkuláris változások elősegítik a mikrovérzések keletkezését hipertóniás idősebb egyéneknél (Ungvari et al., 2017). Számos bizonyíték támasztja alá azt az elképzelést, hogy az agyi artériák szerkezeti és funkcionális adaptációja a magas vérnyomáshoz károsodott IGF-1-hiányos egerekben, ami az öregedés fenotípusát utánozza. 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. Másodsor, a korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a

hipertónia által kiváltott hipertrófiás átépülés a penetráló arteriolákban IGF-1-hiány esetén károsodik (Tarantini, Valcarcel-Ares, et al., 2017). Harmadszor, eredményeink azt mutatják, hogy az IGF-1 hiány károsan befolyásolja a vaszkuláris elasztintartalom adaptív változásait és az ECM-komponensek expresszióját, valamint az ECM-összeállítást, térhálósodást és átépülést szabályozó tényezőket. Negyedszer, korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a hipertóniás IGF-1-hiányos egerekben az autoreguláció elégtelen, és az arteria cerebri mediák ezen állatokból károsodott miogén tónussal rendelkeznek (Toth et al., 2014). Ezen felül ismert, hogy vaszkuláris simaizomréteg és az ECM adaptív változásai kulcsszerepet játszanak az artériás fal ellenálló képességének megőrzésében, a sérülések és az artériás fal szakadásának megelőzésében. Eredményeink fontos transzlációs jelentőséggel bírhatnak 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 egyes adatok szerint az ICH-k előfordulása nem csökkent az elmúlt évtizedekben (van Asch et al., 2010). Bár egyes adatok szerint a magas vérnyomás megfelelő kezelésével elérhető csökkenés (Hong et al., 2013). Ezzel párhuzamosan az egyre fejlődő képalkotó módszerekkel intracerebrális mikrovérzéseket is ki tudunk már mutatni, melyek egyes kutatások szerint az idős populáció közel 50%-ában előfordulhatnak és hozzájárulhatnak a kognitív diszfunkció kialakulásához (Ungvari et al., 2017). Továbbá IGF-1 hiány esetén az aorta merevsége, elmerevedése is növeli a pulzusnyomást és a patológiás artériás átépülést, ami az agyi autoreguláció hatékonyságának csökkenéséhez vezethet. Ennek során a magas pulzáló nyomás elérheti az agyi artériás arborizáció sérülékeny disztális részeit. A fokozott nyomásváltozások pedig elősegíthetik a kis méretű ICH-k kialakulását (Kato et al., 2002; Smeda, 1992; Toth et al., 2014), melyek hozzájárulhatnak a kognitív diszfunkció kialakulásához (Akoudad et al., 2016).

A juguláris vénás nyomásemelkedés 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. A megnövekedett vénás nyomás kritikus szerepét az emberi neuronális diszfunkció kialakulásában. Ezt alátámasztják azok az eredmények, amelyek szerint az előrehaladott szívelégtelenségben szenvedő betegek (Dinc et al., 2019; Morparia et al., 2012; Racine et al., 2008; Randall et al., 2015) gyakran (jóllehet potenciálisan

reverzibilis) kognitív károsodást mutatnak. Ebből a szempontból érdekes, hogy egy transzgenikus egérmodellben a lassan kialakuló izolált szívelégtelenség a bal kamrai diasztolés diszfunkció korai szakaszában (megőrzött ejekciós frakcióval) már kognitív károsodással társul (Adamski et al., 2018). Az arteriovenosus anasztomózis által okozott agyi vénás pangás rágcshalómodelljei szintén kognitív károsodást mutatnak, (Hai et al., 2009; Zhang et al., 2019). Ezenkívül 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 a jugularis vénabillentyű (Lepori et al., 1999), amely időseknél gyakran csak részlegesen látja el funkcióját (Inano et al., 2010; Uchino et al., 2007). Ez elősegíti az agyi vénás nyomásfokozódás kialakulását (pl. tartós Valsalva manőver során (Ungvari, Yabluchanskiy, et al., 2018)). Fontos, hogy a nyaki billentyű inkompetencia előfordulási gyakorisága elérheti a ~ 30-90%-ot az átlagpopulációban (Valecchi et al., 2010). 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 vér-agy gát (BBB) károsodását, ami jelentős neuroinflammációval (mikroglia-aktiváció, valamint a gyulladást elősegítő citokinek és kemokinek lokális koncentrációjának a növekedése) társul. A vénás pangás jelei (magnagyobbodott pitvarok) a szívelégtelenség transzgenikus egérmodelljében is összefüggésbe hozhatók a BBB károsodásával (Adamski et al., 2018). A vénás obstrukcióhoz kapcsolódó BBB-zavar mechanizmusai valószínűleg a vékony falú venulák és kapillárisok mechanikai károsodását foglalják magukban. Eredményeink azt mutatják, hogy a JVL-ben szenvedő egerekben látható sérült BBB révén a plazma összetevői (köztük az IgG) bejutnak az agyba. A plazmából származó faktorok többféle mechanizmussal is befolyásolhatják az idegsejtek működését (Zlokovic, 2008), beleértve a neuroinflammáció kiváltását (Bruce-Keller et al., 2010; Tucsek et al., 2014). A plazmaeredetű IgG különösen erős stimulusa a mikroglia aktivációnak az IgG Fc γ receptorok aktiválásán keresztül (Tucsek et al., 2014). Egyéb plazmaösszetevők is hozzájárulhatnak a mikroglia aktiválásához a BBB károsodása esetén, többek között a trombin, a fibrinogén és a gyulladáscitokinek (Carreno-Muller et al., 2003; Davalos et al., 2012). Kísérleteink által bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy agyi vénás pangásban szenvedő egerekben a BBB károsodása, és ezáltal az IgG és

valószínűleg más plazmaösszetevők fokozott extravazációja fokozott neuroinflammációs válaszreakcióval jár (Adamski et al., 2018), amint azt az aktivált mikroglia megnövekedett száma is mutatja. A proinflammatorikus citokinek, kemokinek, proteázok és az aktivált mikrogliaiból származó reaktív oxigénradikálok neuronális diszfunkcióhoz vezetnek (Gao et al., 2003; Kaneko et al., 2012). Fontos, hogy kísérleteink alapján, az agyi vénás pangásnak a vér-agy gát integritására és a gyulladásos folyamatokra gyakorolt káros hatásait súlyosbítja a magas vérnyomás. Ennek a megfigyelésnek fontos klinikai jelentősége van. A szívelégtelenségben szenvedő betegek nagy százalékának a kórtörténetében szerepel hipertónia, és ezek a betegek tendenciózusan rosszabbul teljesítenek a kognitív tesztekben, mint azok, akiknek nincs magas vérnyomása (Alosco et al., 2012). További mechanizmusok, amelyek révén a megnövekedett agyi vénás nyomás elősegítheti a kognitív hanyatlást, az egyrészt az agyi véráramlás csökkenése másrészt a mikrovérzések megjelenése (Ungvari, Yabluchanskiy, et al., 2018) végül pedig a megváltozott liquor keringés (Fulop et al., 2019). A szívelégtelenségben szenvedő betegeknél gyakran diagnosztizálnak radiológiai vizsgálatok során fehérállomány-hiperintenzitást is (Alosco et al., 2013), ami szintén összefüggésbe hozható a kognitív diszfunkcióval (Alosco et al., 2015). A szöveti ischaemia mellett (Makedonov et al., 2013) a megnövekedett agyi vénás nyomást okozati összefüggésbe hozták a ezen fehérállomány károsodások patogenezisével (Fulop et al., 2019; Moody et al., 1995). Jelen kísérleteink alapján az OM 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 alternáció (magasabb OM-dózisoknál), amelyben a normál ütések váltakoznak csökkent effektívitású szívizom összehúzódásokkal ütésről-ütésre. A jelenség hasonló a pulsus alternans-hoz. A közelmúltban végzett klinikai vizsgálatok során az OM-t farmakokinetikai titrálással tesztelték, ami során 318 ± 129 ng/ml plazmakoncentrációt értek el ($0,79 \mu\text{M}$) (Teerlink, Felker, McMurray, Solomon, et al., 2016). Az egyik legfrissebb vizsgálatban pedig az OM beadott napi dózisát megnövelték azoknál a betegeknél, akiknek OM plazmakoncentrációja 300 ng/ml ($0,75 \mu\text{M}$) alatt volt, de csökkentették (felezték) azoknál a betegeknél akiknél 1000 ng/ml ($2,49 \mu\text{M}$) fölé emelkedett (Teerlink et al., 2021). Megjegyzendő, hogy az 1200 ng/ml feletti dózisok (ezek körülbelül háromszor magasabbak, mint az általunk elvégzett *in vitro* kísérleteinkben) korábban a szisztole túlzott megnyúlásához vezettek. Ez korlátozta a

koszorúér véráramlását a diasztolé alatt, és ilyen módon szívizom ischaemiát okozott egyes esetekben (Greenberg et al., 2015). A kísérleteinkben alkalmazott maximális intravénásan beadott OM dózis a klinikai alkalmazásoknak megfelelt (1000 µg/ttkg kezdeti dózis az első órában) (Cleland et al., 2011). *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 (Cleland et al., 2011; Greenberg et al., 2015; Teerlink et al., 2011; Teerlink et al., 2021; Teerlink, Felker, McMurray, Solomon, et al., 2016; Teerlink, Felker, McMurray, Ponikowski, et al., 2016). Jelen kísérletek során megerősítettük korábbi állatmodellben szerzett eredményeinket (Nagy et al., 2015) miszerint az OM-et terápiás dózisban alkalmazva igen robusztus Ca²⁺-szenzitizációs hatást lehet elérni humán szívizomsejteken is. Sejtszinten ez a hatás lelassult kontrakciós és relaxációs kinetikával, valamint jelentősen megnövekedett passzív merevséggel társult. *In vivo* eredményeinket tekintve, az OM pozitív hatásai a patkány szisztolés funkciójára (amint azt a szisztolés ejekciós idő, EF, ESPVR_q és PRSW változásai jelzik) 600 µg/ttkg dózisonál jelentkeztek. Érdekes módon néhány diasztolés paramétert (E:A, IVRT és τ_w) már az OM legalacsonyabb dózisa is negatívan befolyásolt (200 µg/kg). Fontos megjegyezni, hogy az EF (szívelégtelenség egyik fő diagnosztikus paramétere) javulását a stroke volumen jelentős növekedése nélkül figyeltük meg. Ez felveti a kérdést, hogy önmagában az EF javulását kedvező eredménynek kell-e tekinteni az OM-el végzett szívelégtelenség-vizsgálatok során. Jelen kísérleteinkben azt találtuk, hogy a javuló EF fő tényezője a bal kamra diasztolés térfogatának csökkenése volt, ami nem eredményezett jelentős javulást az LV szisztolés funkciójában, de párhuzamosan jelentős diasztolés diszfunkcióval járt.

A sejtszintű kontraktilitás, Ca²⁺ tranziens és akciós potenciál méréseket izolált kutya LV kardiomiocitákon végeztük. Ezeket azért választottuk, mert elektrofiziológiai tulajdonságaik nagyon hasonlítanak az emberéhez (Szabo et al., 2005; Szentadrassy et al., 2005). Az OM-kezelés pozitív inotrópiát és diasztolés diszfunkciót eredményezett izolált kutya szívizomsejteken, hasonlóan az *in vivo* kísérletek eredményeihez. 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 szívimsejtek passzív merevségének növekedése nagyon alacsony (diasztolés) Ca^{2+} -koncentrációnál jelentkezett. Felvetették már korábban is, hogy az OM diasztolés diszfunkcióhoz vezethet (Mamidi et al., 2017; Swenson et al., 2017), amely lehetőséggel a gyógyszer fejlesztői foglalkoztak COSMIC-HF vizsgálatban is, egy a post hoc analízis erejéig. Ennek során azt találták, hogy az OM mellett az IVRT növekszik az E:A arány és az E hullám változása nélkül, ennek megfelelően úgy diszkutálták az adatokat, hogy érdemi diasztolés diszfunkciót okozó hatás nem valószínűsíthető (absztrakt RF299, bemutatva az American Heart Association Scientific Sessions konferencián 2019. november 16–18-án, Philadelphia, PA). A bal pitvar átmérőjének értékeit, illetve a pulsus alternans és a T-hullám alternans lehetséges előfordulását nem említették a klinikai vizsgálatokban. A szisztolés ejekciós idő növekedése is magyarázható a Ca^{2+} -érzékenység robosztus növekedésével: vagyis az alacsony citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció elegendő a kontrakció elindításához és fenntartásához. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy az erőgenerálás és a relaxáció sebessége jelentősen csökken olyan körülmények között, amikor a Ca^{2+} koncentráció elérte az egyensúlyi állapotot a permeabilizált humán kardiomiocitákban, ami arra utal, hogy az OM korábban nem azonosított hatást gyakorol az aktin-miozin komplex Ca^{2+} szabályozására. Úgy tűnik, hogy a Ca^{2+} -függő aktiváció és disszociáció is sokkal lassabb OM jelenlétében. Az OM a szívimsejtek nyugalmi merevségét is növelte. Ez magyarázható (1) az aktív összehúzódás Ca^{2+} -független beindulásával vagy (2) azzal, hogy az OM a miozin 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, hasonlóan az EMD 57,033 Ca^{2+} -érzékenyítő szer által kiváltott hatásokhoz (Wang et al., 2017). 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 magyarázhatók. Munkánk második nagy újdonsága, hogy az OM dózis- és látszólag pulzuszfüggő, tranziens, elektromechanikus alternációt váltott ki patkányban, amely a pulsus alternanséhoz 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 szívműködésében (14 sejtből kilenc esetében 5 Hz-es stimulációs frekvencián), ami arra utal, hogy ez a tulajdonság szívfrekvencia-függő lehet. Az alternans jelenség során egy mechanikailag normális de megnyúlt szisztolét követ egy csökkent effektivitású szisztolét, melynek egyik oka feltehetően az, hogy a megnyúlt szisztoléma miatt nem volt elegendő idő a diasztolés telődéshez. 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 alternans jelenség során. Szívelégtelenségben szenvedő betegeknél többnyire a betegség progressziójával párhuzamosan írták le a T-hullám alternánst. Kutatási adatok alapján feltételezik, hogy a T-hullám alternans megjelenése fokozhatja az életveszélyes aritmiák kialakulásának valószínűségét (Sipido, 2004). Diaz és mtsai. azt javasolták, hogy a RyR nyitási valószínűségének változása a felelős a T-hullám alternansáért (Diaz et al., 2002), ez a nézet összhangban van Nanasi és mtsai által találtakkal, akik leírták, hogy az OM megváltoztatja a RyR nyitási valószínűségét (Nanasi et al., 2017). A T-hullám alternansok mellett az OM által kiváltott robusztus Ca^{2+} -érzékenyítő hatás is növelheti a kamrai aritmiák valószínűségét. Baudenbacher és mtsai. (Baudenbacher et al., 2008) azt találták, hogy a troponin T (TnT) és troponin I gének bizonyos mutációi Ca^{2+} -érzékenyítés révén szubsztrátot hozhatnak létre a kamrai aritmiákhoz. Az aritmiákat az EMD 57,033 Ca^{2+} -érzékenyítő szerrel tudták indukálni, míg a blebbistatinnal (miofilamentum Ca^{2+} -deszenzibilizátor) meg tudták akadályozni. Ugyanezek a szerzők azt is felvetették, hogy a Ca^{2+} -szenzitizáció Ca^{2+} -tranzien alternanszon keresztül válthat ki kamrai aritmiákat. Kísérleteink során mi is leírtunk OM által kiváltott Ca^{2+} -tranzien alternánst. Ezenkívül a TnT mutációk közevetében azt is kimutatták, hogy a Ca^{2+} -szenzibilizáció változása az AP jellemzőinek megváltozásához vezethet (Wang et al., 2017). Ezzel összhangban mi is változásokat találtunk az AP karakterisztikában az OM kezelés hatására, például az AP hosszának váltakozó mintázatát. Ezen túlmenően, több kutatócsoport tárgyalta a Ca^{2+} -alternansok potenciális szerepét a miociták ingerlékenységének és refrakteritásának megnövekedett diszperziójában, ami által ezen sejtek szubsztrátként szolgálhatnak a re-entry mechanizmusokhoz és ezáltal a kamrai aritmiákhoz (Landstrom et al., 2017; Sato et al., 2006; Weiss et al., 2015). Patkányokon végzett *in vivo* kísérleteink dóziszfüggően súlyos vérnyomáscsökkenéshez vezettek, amely a súlyos diasztolés diszfunkció és/vagy alternans következménye lehet. A GALACTIC-HF vizsgálatban

(Teerlink et al., 2021) csökkent bal kamrai ejekciós frakciójú szívelégtelenségben szenvedő betegek orális OM-kezelése csak mérsékelt klinikai előnyt mutatott annak ellenére, hogy jól dokumentált pozitív hatásai voltak a szisztolés funkcióra (Cleland et al., 2011; Teerlink et al., 2021; Teerlink, Felker, McMurray, Solomon, et al., 2016). Jelen adataink, amelyek arra utalnak, hogy a szisztolés funkció javulását ellensúlyozhatják vagy tompíthatják az OM által kiváltott negatív hatások a diasztolés funkcióra, magyarázatot adhatnak ezekre a klinikai tapasztalatokra. Sajnos a GALACTIC-HF vizsgálati adatok nem teszik lehetővé a diasztolés funkció részletes értékelését (Teerlink et al., 2021). Ezért további klinikai vizsgálatokra van szükség a diasztolés funkció hipotetikus változásainak észlelésére az OM beadása után. Különösen azt javasoljuk, hogy olyan echocardiográfiás mutatókat, mint az IVRT, a bal pitvari méret és a Tei index vegyenek figyelembe a jövőbeni beteg kiválasztás és a személyre szabott OM-kezelések során. Fontos hangsúlyozni, hogy a klinikai gyakorlatban az OM szigorú és rendszeres plazmakoncentrációinak kontrollja során nem számoltak be elektromechanikus váltakozások vagy az életveszélyes aritmiák számának növekedéséről. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy az OM csak azoknál a betegeknél hatásos, akiknél nincs pitvarfibrilláció vagy pitvarlebegés, ami kölcsönhatásra utal az aritmiák mechanizmusa és az OM-kezelések klinikai hatékonysága között.

Az OM hatásaival kapcsolatos kísérleteink limitációi között ki kell emelnünk azt, hogy az *in vivo* kísérleteket patkányokon, míg az *in vitro* kísérleteket izolált kutya és humán szívizomsejteken végeztük. Óvatosan érdemes eljárni, amikor ezen kísérleti adatokat extrapoláljuk humán eredményekre. Azt is meg kell jegyezni, hogy az összes kísérletet egészséges állatokon végeztük.

VI. Összefoglalás

VI.1. 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 dóziszfüggő módon diasztolés diszfunkcióhoz és tranziens elektromechanikus alternans kialakulásához vezethet. Ezen hatásokat in vivo és in vitro mérésekkel is igazolni tudtuk patkánymodellen, valamint humán és kutya szívmuszkuláris sejteken, is. Továbbá igazoltuk, hogy a tranziens elektromechanikus alternans 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.

VI.2. Summary

The prevalence of many diseases increases with ageing. These include dementia and heart failure, two diseases that together affect more than 100 million people today. In the case of dementia, despite intensive research, very limited progress has been achieved in terms of both prevention and slowing down the progression. In contrast, therapies for heart failure have made explosive progress in recent decades, but 10-year survival is still below 40% (Arvanitakis & Bennett, 2019; Groenewegen et al., 2020). In both cases, understanding the pathophysiology and the impact of potential therapies can bring us closer to effective treatments.

In our work, we aimed to better understand the pathophysiology of cognitive dysfunction. To this end, we investigated two areas that are underrepresented in research: changes in adaptive vascular remodelling in ageing and the role of cerebral venous pressure enhancement. On the other hand, we aimed to better understand the *in vivo* and *in vitro* effects of the direct myosin activator Omecamtiv Mecarbil, developed for the treatment of heart failure with reduced ejection fraction.

We have made several findings using a variety of *in vivo* and *in vitro* methods in our experiments. First, we found that IGF-1 deficiency with aging causes impaired adaptive responses to hypertension in cerebral arteries. This effect may contribute to a deeper penetration of the arterial pressure wave, increasing the vulnerability of blood vessels, which, according to further publications of our research group, may lead to the development of microbleeds, local neuroinflammation and consequent cognitive dysfunction. On the other hand, we found that cerebral venous pressure enhancement in a mouse model causes damage to the blood-brain barrier, leading to neuroinflammation and consequent cognitive impairment, which has been demonstrated at gene expression level.

Finally, we demonstrate that the direct myosin activator Omecamtiv Mecarbil can lead to diastolic dysfunction and transient electromechanical alternans in a dose-dependent manner. These effects were demonstrated *in vivo* and *in vitro* in rat models as well as in human and canine cardiac myocytes. Furthermore, we have demonstrated that transient electromechanical alternans is associated with T-wave alternans, which, based on literature data, may lead to the development of ventricular arrhythmias. All these results may cast a negative light on the positive inotropic effect of OM.

Our research results may bring us closer to finding new targets for the treatment of dementia and to preventing potentially fatal side effects from occurring when using Omecamtiv Mecarbil by understanding its mechanism of action.

VII. Irodalomjegyzék

- Adamski, M. G., Sternak, M., Mohaissen, T., Kaczor, D., Wieronska, J. M., Malinowska, M., Czaban, I., Byk, K., Lyngso, K. S., Przyborowski, K., Hansen, P. B. L., Wilczynski, G., & Chlopicki, S. (2018). Vascular Cognitive Impairment Linked to Brain Endothelium Inflammation in Early Stages of Heart Failure in Mice. *J Am Heart Assoc*, 7(7). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007694>
- Adler, A., Messina, E., Sherman, B., Wang, Z., Huang, H., Linke, A., & Hintze, T. H. (2003). NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(3), H1015-1022. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01047.2002>
- Akoudad, S., Wolters, F. J., Viswanathan, A., de Bruijn, R. F., van der Lugt, A., Hofman, A., Koudstaal, P. J., Ikram, M. A., & Vernooij, M. W. (2016). Association of Cerebral Microbleeds With Cognitive Decline and Dementia. *JAMA Neurol*, 73(8), 934-943. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.1017>
- Alosco, M. L., Brickman, A. M., Spitznagel, M. B., Griffith, E. Y., Narkhede, A., Raz, N., Cohen, R., Sweet, L. H., Hughes, J., Rosneck, J., & Gunstad, J. (2013). Independent and interactive effects of blood pressure and cardiac function on brain volume and white matter hyperintensities in heart failure. *J Am Soc Hypertens*, 7(5), 336-343. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2013.04.011>
- Alosco, M. L., Brickman, A. M., Spitznagel, M. B., van Dulmen, M., Raz, N., Cohen, R., Sweet, L. H., Colbert, L. H., Josephson, R., Hughes, J., Rosneck, J., & Gunstad, J. (2012). The independent association of hypertension with cognitive function among older adults with heart failure. *J Neurol Sci*, 323(1-2), 216-220. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.09.019>
- Alosco, M. L., Penn, M. S., Brickman, A. M., Spitznagel, M. B., Cleveland, M. J., Griffith, E. Y., Narkhede, A., & Gunstad, J. (2015). Preliminary observations on MRI correlates of driving independence and performance in persons with heart failure. *Int J Neurosci*, 125(6), 424-432. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.945643>
- Antila, S., Sundberg, S., & Lehtonen, L. A. (2007). Clinical Pharmacology of Levosimendan. *Clinical Pharmacokinetics*, 46(7), 535-552. <https://doi.org/10.2165/00003088-200746070-00001>
- Arvanitakis, Z., & Bennett, D. A. (2019). What Is Dementia? *JAMA*, 322(17), 1728. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11653>
- Auletta, L., Greco, A., Albanese, S., Meomartino, L., Salvatore, M., & Mancini, M. (2017). Original Research: Feasibility and safety of two surgical techniques for the development of an animal model of jugular vein occlusion. *Exp Biol Med (Maywood)*, 242(1), 22-28. <https://doi.org/10.1177/1535370216657446>
- Avolio, A. P., Deng, F. Q., Li, W. Q., Luo, Y. F., Huang, Z. D., Xing, L. F., & O'Rourke, M. F. (1985). Effects of aging on arterial distensibility in populations with high and low prevalence of hypertension: comparison between urban and rural communities in China. *Circulation*, 71(2), 202-210. <https://doi.org/10.1161/01.cir.71.2.202>
- Bailey-Downs, L. C., Mitschelen, M., Sosnowska, D., Toth, P., Pinto, J. T., Ballabh, P., Valcarcel-Ares, M. N., Farley, J., Koller, A., Henthorn, J. C., Bass, C., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2012). Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: a novel model of vascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67(4), 313-329. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr164>
- Bartke, A., Brown-Borg, H., Mattison, J., Kinney, B., Hauck, S., & Wright, C. (2001). Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. *Exp Gerontol*, 36(1), 21-28. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00205-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00205-9)
- Barzilai, N., Crandall, J. P., Kritchevsky, S. B., & Espeland, M. A. (2016). Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab*, 23(6), 1060-1065. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.011>

- Baudenbacher, F., Schober, T., Pinto, J. R., Sidorov, V. Y., Hilliard, F., Solaro, R. J., Potter, J. D., & Knollmann, B. C. (2008). Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest*, *118*(12), 3893-3903. <https://doi.org/10.1172/JCI36642>
- Baumbach, G. L., & Heistad, D. D. (1989). Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*, *13*(6 Pt 2), 968-972. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.13.6.968>
- Bender, S. B., Castorena-Gonzalez, J. A., Garro, M., Reyes-Aldasoro, C. C., Sowers, J. R., DeMarco, V. G., & Martinez-Lemus, L. A. (2015). Regional variation in arterial stiffening and dysfunction in Western diet-induced obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *309*(4), H574-582. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00155.2015>
- Bouvy, W. H., Kuijf, H. J., Zwanenburg, J. J., Koek, H. L., Kappelle, L. J., Luijten, P. R., Ikram, M. K., Biessels, G. J., & Utrecht Vascular Cognitive Impairment Study, g. (2017). Abnormalities of Cerebral Deep Medullary Veins on 7 Tesla MRI in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *J Alzheimers Dis*, *57*(3), 705-710. <https://doi.org/10.3233/JAD-160952>
- Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., & Klinge, P. (2014). A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, *11*, 10. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-10>
- Bruce-Keller, A. J., White, C. L., Gupta, S., Knight, A. G., Pistell, P. J., Ingram, D. K., Morrison, C. D., & Keller, J. N. (2010). NOX activity in brain aging: exacerbation by high fat diet. *Free Radic Biol Med*, *49*(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.006>
- Cardillo, C., Kilcoyne, C. M., Cannon, R. O., 3rd, & Panza, J. A. (2000). Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension*, *35*(6), 1237-1241. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.6.1237>
- Carreno-Muller, E., Herrera, A. J., de Pablos, R. M., Tomas-Camardiel, M., Venero, J. L., Cano, J., & Machado, A. (2003). Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. *J Neurochem*, *84*(5), 1201-1214. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01634.x>
- Cernadas, M. R., Sanchez de Miguel, L., Garcia-Duran, M., Gonzalez-Fernandez, F., Millas, I., Monton, M., Rodrigo, J., Rico, L., Fernandez, P., de Frutos, T., Rodriguez-Feo, J. A., Guerra, J., Caramelo, C., Casado, S., & Lopez, F. (1998). Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*, *83*(3), 279-286. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.279>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, *354*(6311), 472-477. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>
- Cleland, J. G., Teerlink, J. R., Senior, R., Nifontov, E. M., Mc Murray, J. J., Lang, C. C., Tsyrlin, V. A., Greenberg, B. H., Mayet, J., Francis, D. P., Shaburishvili, T., Monaghan, M., Saltzberg, M., Neyses, L., Wasserman, S. M., Lee, J. H., Saikali, K. G., Clarke, C. P., Goldman, J. H., . . . Malik, F. I. (2011). The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet*, *378*(9792), 676-683. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61126-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61126-4)
- Comi, G., Battaglia, M. A., Bertolotto, A., Del Sette, M., Ghezzi, A., Malferrari, G., Salvetti, M., Sormani, M. P., Tesio, L., Stolz, E., Zaratin, P., Mancardi, G., & Co, S. C. S. G. (2013). Observational case-control study of the prevalence of chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis: results from the CoSMo study. *Mult Scler*, *19*(11), 1508-1517. <https://doi.org/10.1177/1352458513501231>
- Crimmins, E. M. (2015). Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise. *Gerontologist*, *55*(6), 901-911. <https://doi.org/10.1093/geront/gnv130>
- 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>
- Csiszar, A., Gautam, T., Sosnowska, D., Tarantini, S., Banki, E., Tucsek, Z., Toth, P., Losonczy, G., Koller, A., Reglodi, D., Giles, C. B., Wren, J. D., Sonntag, W. E., & Ungvari, Z. (2014). Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes

- anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307(3), H292-306. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00307.2014>
- Csiszar, A., Podlutzky, A., Podlutzkaya, N., Sonntag, W. E., Merlin, S. Z., Philipp, E. E., Doyle, K., Davila, A., Recchia, F. A., Ballabh, P., Pinto, J. T., & Ungvari, Z. (2012). Testing the oxidative stress hypothesis of aging in primate fibroblasts: is there a correlation between species longevity and cellular ROS production? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67(8), 841-852. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr216>
- Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2008). Endothelial dysfunction and vascular inflammation in type 2 diabetes: interaction of AGE/RAGE and TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(2), H475-476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00644.2008>
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J. G., Kaminski, P., Wolin, M. S., Koller, A., & Kaley, G. (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*, 90(11), 1159-1166. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000020401.61826.ea>
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J. G., & Kaley, G. (2003). Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J*, 17(9), 1183-1185. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1049fje>
- Czibere I., Rácz A., Szilvási H., Szikszai Z., Imre S., Examination of life quality, mental conditions and cognitive status of people over the age of 90: Results of a Hungarian local research; *Cent Eur J Public Health*. 2019 Mar;27(1):17-23. doi: 10.21101/cejph.a4753.
- Davalos, D., Ryu, J. K., Merlini, M., Baeten, K. M., Le Moan, N., Petersen, M. A., Deerinck, T. J., Smirnov, D. S., Bedard, C., Hakozaki, H., Gonias Murray, S., Ling, J. B., Lassmann, H., Degen, J. L., Ellisman, M. H., & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun*, 3, 1227. <https://doi.org/10.1038/ncomms2230>
- de Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M. N., & Madeo, F. (2014). The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell*, 157(7), 1515-1526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.031>
- Diaz-Otero, J. M., Garver, H., Fink, G. D., Jackson, W. F., & Dorrance, A. M. (2016). Aging is associated with changes to the biomechanical properties of the posterior cerebral artery and parenchymal arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(3), H365-375. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00562.2015>
- Diaz, M. E., Eisner, D. A., & O'Neill, S. C. (2002). Depressed ryanodine receptor activity increases variability and duration of the systolic Ca²⁺ transient in rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 91(7), 585-593. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000035527.53514.c2>
- Dichgans, M., & Leys, D. (2017). Vascular Cognitive Impairment. *Circ Res*, 120(3), 573-591. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308426>
- Dinc, N., Won, S. Y., Eibach, M., Quick-Weller, J., Keil, F., Berkefeld, J., Konczalla, J., Marquardt, G., & Seifert, V. (2019). Thrombosis of the straight sinus and microbleedings due to deep seated arteriovenous fistula - Hemodynamic changes, cognitive impairment and improvement after microsurgery. A technical report. *J Clin Neurosci*, 68, 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.07.012>
- Donato, A. J., Machin, D. R., & Lesniewski, L. A. (2018). Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. *Circ Res*, 123(7), 825-848. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312563>
- Donato, A. J., Pierce, G. L., Lesniewski, L. A., & Seals, D. R. (2009). Role of NFkappaB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging (Albany NY)*, 1(8), 678-680. <https://doi.org/10.18632/aging.100080>
- Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Laffargue, M., Gayral, S., El Btaouri, H., Kawecki, C., Guillot, A., Martiny, L., Debelle, L., & Maurice, P. (2016). Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc Res*, 110(3), 298-308. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw061>
- Eurostat. (2020). *Eurostat Regional Yearbook*. Eurostat. Retrieved 20 August 2022 from <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-statistical-books/-/ks-02-20-655>

- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*, 161(1), 106-118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020>
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321-326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Fulop, G. A., Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., Farkas, E., Bari, F., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2018). Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation. *Geroscience*, 40(5-6), 513-521. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0047-6>
- 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>
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J. S. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*, 17(13), 1954-1956. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0109fje>
- Gardner, S. E., Humphry, M., Bennett, M. R., & Clarke, M. C. (2015). Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1alpha-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(9), 1963-1974. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305896>
- Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., Decarli, C., Greenberg, S. M., Iadecola, C., Launer, L. J., Laurent, S., Lopez, O. L., Nyenhuis, D., Petersen, R. C., Schneider, J. A., Tzourio, C., Arnett, D. K., Bennett, D. A., Chui, H. C., Higashida, R. T., Lindquist, R., Nilsson, P. M., . . . Anesthesia. (2011). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*, 42(9), 2672-2713. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182299496>
- Greenberg, B. H., Chou, W., Saikali, K. G., Escandon, R., Lee, J. H., Chen, M. M., Treshkur, T., Megreladze, I., Wasserman, S. M., Eisenberg, P., Malik, F. I., Wolff, A. A., & Shaburishvili, T. (2015). Safety and tolerability of omecamtiv mecarbil during exercise in patients with ischemic cardiomyopathy and angina. *JACC Heart Fail*, 3(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2014.07.009>
- 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>
- Hadi, H. A., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1(3), 183-198. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319104>
- Hai, J., Wan, J. F., Lin, Q., Wang, F., Zhang, L., Li, H., Zhang, L., Chen, Y. Y., & Lu, Y. (2009). Cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in a rat model associated with arteriovenous malformations. *Brain Res*, 1301, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.001>
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hong K.S., Bang O.Y., Kang D.-W., Yu K.-H., Bae H.-J., Lee J.S., Heo J.H., Kwon S.U., Oh C.W., Lee B.C., Kim J.S., Yoon B.W. Stroke statistics in Korea: part I. Epidemiology and risk factors: a report from the Korean stroke society and clinical research center for stroke. *J Stroke*. 2013 Jan;15(1):2-20. doi: 10.5853/jos.2013.15.1.2.
- Hopkins, K. D., Lehmann, E. D., Gosling, R. G., Parker, J. R., & Sonksen, P. H. (1993). Biochemical correlates of aortic distensibility in vivo in normal subjects. *Clin Sci (Lond)*, 84(6), 593-597. <https://doi.org/10.1042/cs0840593>
- Horvath, B., Szentandrassy, N., Veress, R., Almassy, J., Magyar, J., Banyasz, T., Toth, A., Papp, Z., & Nanasi, P. P. (2017). Frequency-dependent effects of omecamtiv mecarbil on cell shortening

- of isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 390(12), 1239-1246. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1422-z>
- Hugo J., Ganguli M.(2014) Dementia and Cognitive Impairment: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Clin Geriatr Med*. 2014 Aug; 30(3): 421–442. [doi: 10.1016/j.cger.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cger.2014.04.001)
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Imre S., Szikszai Z., Blögh B.M., Batra M. Vitality diagnostics and preventive medicine for the well-being of people at advanced age; *Acta Physiol Hung*. 1999;86(3-4):181-3.
- Inano, S., Itoh, D., Takao, H., Hayashi, N., Mori, H., Kunimatsu, A., Abe, O., Aoki, S., & Ohtomo, K. (2010). High signal intensity in the dural sinuses on 3D-TOF MR angiography at 3.0 T. *Clin Imaging*, 34(5), 332-336. <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2009.06.028>
- Izzard, A. S., Graham, D., Burnham, M. P., Heerkens, E. H., Dominiczak, A. F., & Heagerty, A. M. (2003). Myogenic and structural properties of cerebral arteries from the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(4), H1489-1494. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00352.2003>
- Izzard, A. S., Horton, S., Heerkens, E. H., Shaw, L., & Heagerty, A. M. (2006). Middle cerebral artery structure and distensibility during developing and established phases of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, 24(5), 875-880. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000222757.54111.06>
- Jessen, N. A., Munk, A. S., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*, 40(12), 2583-2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jones, N. R., Roalfe, A. K., Adoki, I., Hobbs, F. D. R., & Taylor, C. J. (2019). Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail*, 21(11), 1306-1325. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1594>
- Kaneko, Y. S., Nakashima, A., Mori, K., Nagatsu, T., Nagatsu, I., & Ota, A. (2012). Microglial activation in neuroinflammation: implications for the etiology of neurodegeneration. *Neurodegener Dis*, 10(1-4), 100-103. <https://doi.org/10.1159/000332936>
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 285(11), 8171-8184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031575>
- Kato, H., Izumiyama, M., Izumiyama, K., Takahashi, A., & Itoyama, Y. (2002). Silent cerebral microbleeds on T2*-weighted MRI: correlation with stroke subtype, stroke recurrence, and leukoaraiosis. *Stroke*, 33(6), 1536-1540. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000018012.65108.86>
- Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A., & Zlokovic, B. V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 18(7), 419-434. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
- Kisler, K., Nelson, A. R., Rege, S. V., Ramanathan, A., Wang, Y., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P. S., Zhao, Z., Zhou, Y., Boas, D. A., Sakadzic, S., & Zlokovic, B. V. (2017). Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci*, 20(3), 406-416. <https://doi.org/10.1038/nn.4489>
- Knox E.G., Aburto M.R., Clarke G., Cryan J.F., O'Driscoll C.M., The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration, *Molecular Psychiatry* volume 27, pages2659–2673 (2022), doi: 10.1038/s41380-022-01511-z
- Kovacs, A., Fulop, G. A., Kovacs, A., Csipo, T., Bodi, B., Priksz, D., Juhasz, B., Beke, L., Hendrik, Z., Mehes, G., Granzier, H. L., Edes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., & Toth, A. (2016). Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(11), H1671-1682. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>
- Kovacs A., Szikszai Z., Várady É., Sándor I., Study on the hemorheological parameters of oldest-old residents in the East-Hungarian city, Debrecen; *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35(1-2):83-8.

- Landstrom, A. P., Dobrev, D., & Wehrens, X. H. T. (2017). Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*, 120(12), 1969-1993. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310083>
- Laron Z., Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone; *Mol Pathol*. 2001 Oct; 54(5): 311–316. doi: 10.1136/mp.54.5.311
- Lepori, D., Capasso, P., Fournier, D., Genton, C. Y., & Schnyder, P. (1999). High-resolution ultrasound evaluation of internal jugular venous valves. *Eur Radiol*, 9(6), 1222-1226. <https://doi.org/10.1007/s003300050822>
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Kecskemeti, V., & Nanasi, P. P. (2004). Effects of norfluooxetine on the action potential and transmembrane ion currents in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 370(3), 203-210. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0954-1>
- Makedonov, I., Black, S. E., & MacIntosh, B. J. (2013). Cerebral small vessel disease in aging and Alzheimer's disease: a comparative study using MRI and SPECT. *Eur J Neurol*, 20(2), 243-250. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03785.x>
- Malik, F. I., & Morgan, B. P. (2011). Cardiac myosin activation part 1: from concept to clinic. *J Mol Cell Cardiol*, 51(4), 454-461. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.05.006>
- Mamidi, R., Li, J., Gresham, K. S., Verma, S., Doh, C. Y., Li, A., Lal, S., Dos Remedios, C. G., & Stelzer, J. E. (2017). Dose-Dependent Effects of the Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil on Cross-Bridge Behavior and Force Generation in Failing Human Myocardium. *Circ Heart Fail*, 10(10). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004257>
- McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E. A., ... Skibellund, A. K. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, 42(36), 3599–3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
- Minamino, T., & Komuro, I. (2007). Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res*, 100(1), 15-26. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256837.40544.4a>
- Mitchell, G. F., Parise, H., Benjamin, E. J., Larson, M. G., Keyes, M. J., Vita, J. A., Vasan, R. S., & Levy, D. (2004). Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*, 43(6), 1239-1245. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa>
- Moody, D. M., Brown, W. R., Challa, V. R., & Anderson, R. L. (1995). Periventricular venous collagenosis: association with leukoaraiosis. *Radiology*, 194(2), 469-476. <https://doi.org/10.1148/radiology.194.2.7824728>
- Morparia, N., Miller, G., Rabinstein, A., Lanzino, G., & Kumar, N. (2012). Cognitive decline and hypersomnolence: thalamic manifestations of a tentorial dural arteriovenous fistula (dAVF). *Neurocrit Care*, 17(3), 429-433. <https://doi.org/10.1007/s12028-012-9746-5>
- Mueller, S., Riedel, H. D., & Stremmel, W. (1997). Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*, 90(12), 4973-4978. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389716>
- Muzykantov, V. R. (2001). Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release*, 71(1), 1-21. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00215-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00215-2)
- 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., & Almassy, 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>

- Nation D.A., Sweeney M.D., Montagne A., Sagare A.P., D'orazio L.M., Pachicano M., Sepelband F., Nelson A.R., Buennagel D.P., Harrington M.G., Benzinger T.L.S., Fagan A.M., Ringman J.M., Schneider L.S., Morris J.C., Chui H.C., Law M., Toga A.W. Zlokovic B.V., *Nat Med.* 2019 Feb;25(2):270-276. doi: 10.1038/s41591-018-0297-y.
- Oeppen, J., & Vaupel, J. W. (2002). Demography. Broken limits to life expectancy. *Science*, 296(5570), 1029-1031. <https://doi.org/10.1126/science.1069675>
- Oudegeest-Sander, M. H., Olde Rikkert, M. G., Smits, P., Thijssen, D. H., van Dijk, A. P., Levine, B. D., & Hopman, M. T. (2013). The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: a randomized factorial design trial. *Exp Gerontol*, 48(12), 1509-1517. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.10.009>
- Patterson. (2018). *World Alzheimer Report 2018, The state of the art dementia research: New frontiers*. Alzheimer's Disease International. Retrieved 20 August 2022 from
- Pennington, K. A., Ramirez-Perez, F. I., Pollock, K. E., Talton, O. O., Foote, C. A., Reyes-Aldasoro, C. C., Wu, H. H., Ji, T., Martinez-Lemus, L. A., & Schulz, L. C. (2016). Maternal Hyperleptinemia Is Associated with Male Offspring's Altered Vascular Function and Structure in Mice. *PLoS One*, 11(5), e0155377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155377>
- 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>
- Racine, C. A., Lawton, M. T., Hetts, S. W., & Josephson, S. A. (2008). Neuropsychological profile of reversible cognitive impairment in a patient with a dural arteriovenous fistula. *Neurocase*, 14(3), 231-238. <https://doi.org/10.1080/13554790802232677>
- Radovits, T., Olah, A., Lux, A., Nemeth, B. T., Hidi, L., Birtalan, E., Kellermayer, D., Matyas, C., Szabo, G., & Merkely, B. (2013). Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(1), H124-134. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00108.2013>
- Randall, A., Ellis, R., Hywel, B., Davies, R. R., Alusi, S. H., & Lerner, A. J. (2015). Rapid cognitive decline: not always Creutzfeldt-Jakob disease. *J R Coll Physicians Edinb*, 45(3), 209-212. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2015.307>
- Reddy, A. K., Hartley, C. J., Pham, T. T., Darlington, G., Entman, M. L., & Taffet, G. E. (2014). Young little mice express a premature cardiovascular aging phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(2), 152-159. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt055>
- Rizzoni, D., De Ciuceis, C., Porteri, E., Paiardi, S., Boari, G. E., Mortini, P., Cornali, C., Cenzato, M., Rodella, L. F., Borsani, E., Rizzardì, N., Platto, C., Rezzani, R., & Rosei, E. A. (2009). Altered structure of small cerebral arteries in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, 27(4), 838-845. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832401ea>
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., . . . Group, G.-N.-J. G. B. o. C. D. W. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*, 76(25), 2982-3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Sato, D., Shiferaw, Y., Garfinkel, A., Weiss, J. N., Qu, Z., & Karma, A. (2006). Spatially discordant alternans in cardiac tissue: role of calcium cycling. *Circ Res*, 99(5), 520-527. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000240542.03986.e7>
- Sipido, K. R. (2004). Understanding cardiac alternans: the answer lies in the Ca²⁺ store. *Circ Res*, 94(5), 570-572. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000124606.14903.6F>
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol*, 71, 40-56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Smeda, J. S. (1992). Cerebral vascular changes associated with hemorrhagic stroke in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 70(4), 552-564. <https://doi.org/10.1139/y92-070>

- Sonntag, W. E., Deak, F., Ashpole, N., Toth, P., Csiszar, A., Freeman, W., & Ungvari, Z. (2013). Insulin-like growth factor-1 in CNS and cerebrovascular aging. *Front Aging Neurosci*, *5*, 27. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00027>
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., & Hagen, T. M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(10), 3381-3386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400282101>
- Sweeney, M. D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2018). The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci*, *21*(10), 1318-1331. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>
- Swenson, A. M., Tang, W., Blair, C. A., Fetrow, C. M., Unrath, W. C., Previs, M. J., Campbell, K. S., & Yengo, C. M. (2017). Omecamtiv Mecarbil Enhances the Duty Ratio of Human beta-Cardiac Myosin Resulting in Increased Calcium Sensitivity and Slowed Force Development in Cardiac Muscle. *J Biol Chem*, *292*(9), 3768-3778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748780>
- Szabo, G., Szentandrassy, N., Biro, T., Toth, B. I., Czifra, G., Magyar, J., Banyasz, T., Varro, A., Kovacs, L., & Nanasi, P. P. (2005). Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch*, *450*(5), 307-316. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1445-z>
- Szentandrassy, N., Banyasz, T., Biro, T., Szabo, G., Toth, B. I., Magyar, J., Lazar, J., Varro, A., Kovacs, L., & Nanasi, P. P. (2005). Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*, *65*(4), 851-860. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.022>
- Tarantini, S., Hertelendy, P., Tucsek, Z., Valcarcel-Ares, M. N., Smith, N., Menyhart, A., Farkas, E., Hodges, E. L., Towner, R., Deak, F., Sonntag, W. E., Csiszar, A., Ungvari, Z., & Toth, P. (2015). Pharmacologically-induced neurovascular uncoupling is associated with cognitive impairment in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, *35*(11), 1871-1881. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.162>
- Tarantini, S., Tran, C. H. T., Gordon, G. R., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2017). Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Exp Gerontol*, *94*, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.11.004>
- 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>
- Tarantini, S., Valcarcel-Ares, N. M., Yabluchanskiy, A., Springo, Z., Fulop, G. A., Ashpole, N., Gautam, T., Giles, C. B., Wren, J. D., Sonntag, W. E., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2017). Insulin-like growth factor 1 deficiency exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice, mimicking the aging phenotype. *Aging Cell*, *16*(3), 469-479. <https://doi.org/10.1111/acel.12583>
- 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>
- Teerlink, J. R., Clarke, C. P., Saikali, K. G., Lee, J. H., Chen, M. M., Escandon, R. D., Elliott, L., Bee, R., Habibzadeh, M. R., Goldman, J. H., Schiller, N. B., Malik, F. I., & Wolff, A. A. (2011). Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *Lancet*, *378*(9792), 667-675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61219-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61219-1)
- Teerlink, J. R., Diaz, R., Felker, G. M., McMurray, J. J. V., Metra, M., Solomon, S. D., Adams, K. F., Anand, I., Arias-Mendoza, A., Biering-Sorensen, T., Bohm, M., Bonderman, D., Cleland, J. G. F., Corbalan, R., Crespo-Leiro, M. G., Dahlstrom, U., Echeverria, L. E., Fang, J. C., Filippatos, G., . .

- . Investigators, G.-H. (2021). Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med*, 384(2), 105-116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2025797>
- Teerlink, J. R., Felker, G. M., McMurray, J. J., Solomon, S. D., Adams, K. F., Jr., Cleland, J. G., Ezekowitz, J. A., Goudev, A., Macdonald, P., Metra, M., Mitrovic, V., Ponikowski, P., Serpytis, P., Spinar, J., Tomcsanyi, J., Vandekerckhove, H. J., Voors, A. A., Monsalvo, M. L., Johnston, J., . . . Investigators, C.-H. (2016). Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 388(10062), 2895-2903. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32049-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32049-9)
- Teerlink, J. R., Felker, G. M., McMurray, J. J. V., Ponikowski, P., Metra, M., Filippatos, G. S., Ezekowitz, J. A., Dickstein, K., Cleland, J. G. F., Kim, J. B., Lei, L., Knusel, B., Wolff, A. A., Malik, F. I., Wasserman, S. M., & Investigators, A.-A. (2016). Acute Treatment With Omecamtiv Mecarbil to Increase Contractility in Acute Heart Failure: The ATOMIC-AHF Study. *J Am Coll Cardiol*, 67(12), 1444-1455. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.01.031>
- Thijssen, D. H., Carter, S. E., & Green, D. J. (2016). Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol*, 594(8), 2275-2284. <https://doi.org/10.1113/JP270597>
- Toth, P., Tarantini, S., Springo, Z., Tucsek, Z., Gautam, T., Giles, C. B., Wren, J. D., Koller, A., Sonntag, W. E., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2015). Aging exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice: role of resveratrol treatment in vasoprotection. *Aging Cell*, 14(3), 400-408. <https://doi.org/10.1111/ace1.12315>
- Toth, P., Tucsek, Z., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Tarantini, S., Deak, F., Koller, A., Sonntag, W. E., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2013). Age-related autoregulatory dysfunction and cerebrovascular injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(11), 1732-1742. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.143>
- 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>
- Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2014). Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69(10), 1212-1226. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt177>
- Uchino, A., Nomiya, K., Takase, Y., Nakazono, T., Tominaga, Y., Imaizumi, T., & Kudo, S. (2007). Retrograde flow in the dural sinuses detected by three-dimensional time-of-flight MR angiography. *Neuroradiology*, 49(3), 211-215. <https://doi.org/10.1007/s00234-006-0186-9>
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., Monticone, R. E., Telljohann, R., Pinto, J. T., de Cabo, R., Sonntag, W. E., Lakatta, E. G., & Csiszar, A. (2011). Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66(8), 866-875. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr092>
- Ungvari Z., Csiszar A., The Emerging Role of IGF-1 Deficiency in Cardiovascular Aging: Recent Advances, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Jun; 67A(6): 599–610. doi: 10.1093/gerona/gls072
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Labinsky, N., Rivera, A., Xiangmin, Z., Smith, K., & Csiszar, A. (2007). Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B 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., Podlutsky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., & Sonntag, W. E. (2013). Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular

- radiosensitivity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(12), 1443-1457. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt057>
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Donato, A. J., Galvan, V., & Csiszar, A. (2018). Mechanisms of Vascular Aging. *Circ Res*, 123(7), 849-867. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378>
- 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>
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Nyul-Toth, A., Kiss, T., Yabluchanskiy, A., Csipo, T., Balasubramanian, P., Lipecz, A., Benyo, Z., & Csiszar, A. (2019). Nrf2 dysfunction and impaired cellular resilience to oxidative stressors in the aged vasculature: from increased cellular senescence to the pathogenesis of age-related vascular diseases. *Geroscience*, 41(6), 727-738. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00107-w>
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Sorond, F., Merkely, B., & Csiszar, A. (2020). Mechanisms of Vascular Aging, A Geroscience Perspective: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*, 75(8), 931-941. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.11.061>
- Ungvari, Z., Yabluchanskiy, A., Tarantini, S., Toth, P., Kirkpatrick, A. C., Csiszar, A., & Prodan, C. I. (2018). Repeated Valsalva maneuvers promote symptomatic manifestations of cerebral microhemorrhages: implications for the pathogenesis of vascular cognitive impairment in older adults. *Geroscience*, 40(5-6), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0044-9>
- Valcarcel-Ares, M. N., Gautam, T., Warrington, J. P., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., de Cabo, R., Losonczy, G., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2012). Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67(8), 821-829. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr229>
- Valdúeza, J. M., Doepp, F., Schreiber, S. J., van Oosten, B. W., Schmierer, K., Paul, F., & Wattjes, M. P. (2013). What went wrong? The flawed concept of cerebrospinal venous insufficiency. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(5), 657-668. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.31>
- Valecchi, D., Bacci, D., Gulisano, M., Sgambati, E., Sibilio, M., Lipomas, M., & Macchi, C. (2010). Internal jugular vein valves: an assessment of prevalence, morphology and competence by color Doppler echography in 240 healthy subjects. *Ital J Anat Embryol*, 115(3), 185-189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287973>
- van Asch, C. J., Luitse, M. J., Rinkel, G. J., van der Tweel, I., Algra, A., & Klijn, C. J. (2010). Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 9(2), 167-176. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70340-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70340-0)
- Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y. P., Lisanti, M. P., Kensler, T. W., & Galbiati, F. (2013). Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol Biol Cell*, 24(12), 1852-1862. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0666>
- Wang, L., Kryshchal, D. O., Kim, K., Parikh, S., Cadar, A. G., Bersell, K. R., He, H., Pinto, J. R., & Knollmann, B. C. (2017). Myofilament Calcium-Buffering Dependent Action Potential Triangulation in Human-Induced Pluripotent Stem Cell Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 70(20), 2600-2602. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.033>
- Weiss, J. N., Garfinkel, A., Karagueuzian, H. S., Nguyen, T. P., Olcese, R., Chen, P. S., & Qu, Z. (2015). Perspective: a dynamics-based classification of ventricular arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol*, 82, 136-152. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.017>
- Winder, N. R., Reeve, E. H., & Walker, A. E. (2021). Large artery stiffness and brain health: insights from animal models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 320(1), H424-H431. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00696.2020>
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*, 12(3), 88-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896077>

- Zamboni, P. (2006). The big idea: iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. *J R Soc Med*, 99(11), 589-593. <https://doi.org/10.1258/jrsm.99.11.589>
- Zhang, N. N., Zhao, K. T., Zhao, Z. A., Chen, W. L., Xu, H. B., & Chen, H. S. (2019). A novel rat model of cerebral artery occlusion complicated with prior venous stagnation. *J Neurosci Methods*, 318, 100-103. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.01.016>
- Zhou, T., Zhang, M., Zhao, L., Li, A., & Qin, X. (2016). Activation of Nrf2 contributes to the protective effect of Exendin-4 against angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell senescence. *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(4), C572-C582. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00093.2016>
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>

VIII. Tárgyszavak

Öregedés; Demencia; Vaszkuláris eredetű kognitív károsodás, Agyi vénás nyomásfokozódás, Vér-agy gát károsodás, Szívelégtelenség, Csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség, Omecamtiv Mecarbil, Elektromechanikus alternansz, T-hullám alternansz,

IX. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani mentoraimnak, Prof. Dr. Tóth Attilának, Prof. Dr. Papp Zoltánnak, Prof. Dr. Ungvári Zoltánnak és Dr. Rutkai Ibolyának. Hálás vagyok Dr. Rutkai Ibolyának, aki megtanított a mikroerekkel végzett kísérletek alapjaira és nagyon sokat segített a diplomamunkám megírásában. Prof. Dr. Tóth Attila és Prof. Dr. Papp Zoltán volt, akik bevezettek az orvosi alap kutatás világába és lehetővé tették számomra, hogy PhD tanulmányokat kezdjek a Debreceni Egyetem Klinikai Fiziológiai Tanszékén. Tőlük volt lehetőségem megtanulni a tudományos munka alapjait. Külön hálás vagyok a sok jótanácsért, útmutatásért és baráti beszélgetésért. Prof. Dr. Ungvári Zoltán pedig lehetővé tette számomra, hogy tanulmányaimat Oklahoma City-ben a Reynolds Oklahoma Center on Aging falaiban belül folytassam, amiért elmondhatatlanul hálás vagyok, hiszen elképesztően sok ajtót nyitott ki számomra az ott eltöltött két év.

Hálás vagyok továbbá Dr. Kovács Árpádnak, akivel rengetek kísérletet és tudományos beszélgetést folytattunk és minden igyekezetem ellenére sosem adta fel, hogy megneveljen és én is hasonlóan precíz kutató lehessek, mint ő. Hálás vagyok Dr. Csípő Tamásnak is, akivel számtalan órát töltöttünk el a vaszkuláris laboratóriumban és aztán később Oklahoma City-ben is. Köszönöm, hogy formálta a tudományos érdeklődésem és mindig lehetett rá számítani egy baráti beszélgetés erejéig is.

Az Oklahoma City-ben eltöltött időszakból mindenképp szeretném kiemelni Stefano Tarantini-t, Andriy Yabluchanskiy-t és Albert Orock-ot, akik nélkül nem tudtam volna megvetni a lábam. Köszönöm Stefano Tarantini-nek, hogy szinte családtaggá válhattam és Andriy Yabluchanskiy-val, valamint Albert Orock-al együtt olyan önzetlenül segítette a beilleszkedésem, hogy az számomra életem végéig például szolgál majd.

Köszönet illeti továbbá a Debreceni Egyetem és a Semmelweis Egyetem azon dolgozóit, akikkel együtt dolgoztam munkám során. Kiemelném közülük a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden dolgozóját, valamint Dr. Oláh Attilát és Dr. Radovits Tamást, akiktől mind a mai napig nagyon sokat tanulhatok.

Végül pedig köszönetet szeretnék mondani a szüleimnek is, akik biztosították a hátteret mindezen munka elvégzéséhez és mindig mindenben támogattak. Külön köszönet Dr. Párkányi Annának, akinek a támogatása nélkül, a klinikai munka mellett, sosem fejeztem volna be a PhD tézisem.

X. Függelék



**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/65/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fülöp Gábor Áron
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Fülöp, G. Á.**, Oláh, A., Csípő, T., Kovács, Á., Pórszász, R., Veress, R., Horváth, B., Nagy, L., Bódi, B., Fagyas, M., Helgadottir, S. L., Bánhegyi, V., Juhász, B., Bombicz, M., Priksz, D., Nánási, P. P. i., Merkely, B., Édes, I., Csanádi, Z., Papp, Z., Radovits, T., Tóth, A.: Omecantív mecarbil evokes diastolic dysfunction and leads to periodic electromechanical alternans.
Basic Res. Cardiol. 116 (1), 24, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-021-00866-8>
IF: 12.416
- Fülöp, G. Á.**, Ahire, C., Csípő, T., Tarantini, S., Kiss, T., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., Farkas, E., Tóth, A., Nyúl-Tóth, Á., Tóth, P., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Cerebral venous congestion promotes blood-brain barrier disruption and neuroinflammation, impairing cognitive function in mice.
GeroScience. 41 (5), 575-589, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00110-1>
- Fülöp, G. Á.**, Ramirez-Perez, F. I., Kiss, T., Tarantini, S., Valcarcel Ares, M. N., Tóth, P., Yabluchanskiy, A., Conley, S. M., Ballabh, P., Martinez, L. L. A., Ungvári, Z., Csiszár, A.: IGF-1 Deficiency Promotes Pathological Remodeling of Cerebral Arteries: a Potential Mechanism Contributing to the Pathogenesis of Intracerebral Hemorrhages in Aging.
J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci. 74 (4), 446-454, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gly144>
IF: 5.236





További közlemények

4. Németh, B. T., Hizoh, I., Nowotta, F., Ruzsa, Z., Szűk, T., Kulyassa, P., **Fülöp, G. Á.**, Szablics, F., E., Becker, D., Merkely, B., Édes, I. F.: Comparison of Safety of RADial comPRESSION Devices: a Multi-Center Trial of Patent Hemostasis following Percutaneous Coronary Intervention from Conventional Radial Access (RAD-PRESS Trial). *Diagnostics*. 13 (1), 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13010143>
IF: 3.992 (2021)
5. **Fülöp, G. Á.**, Lakatos, B., Ruppert, M., Kovács, A., Juhász, V., Dér, G., Tállay, A., Vágó, H., Kiss, B., Merkely, B., Zima, E.: A Case Series of SARS-CoV-2 Reinfection in Elite Athletes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 19 (21), 1-7, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph192113798>
IF: 4.614 (2021)
6. Csipő, T., Czíkora, Á., **Fülöp, G. Á.**, Gulyás, H., Rutkai, I., Pásztorné Tóth, E., Pórszász, R., Szalai, A., Bölcskei, K., Helyes, Z., Pintér, E., Papp, Z., Ungvári, Z., Tóth, A.: A Central Role for TRPM4 in Ca²⁺-Signal Amplification and Vasoconstriction. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (3), 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031465>
IF: 6.208 (2021)
7. Nyúl-Tóth, Á., **Fülöp, G. Á.**, Tarantini, S., Kiss, T., Ahire, C., Faakye, J. A., Ungvári, A., Tóth, P., Tóth, A., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Cerebral venous congestion exacerbates cerebral microhemorrhages in mice. *GeroScience*. 44 (2), 805-816, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-021-00504-0>
IF: 7.581 (2021)
8. **Fülöp, G. Á.**, Gógl, Á., Lakatos, B., Sydó, N., Csulak, E., Mester, B., Tóth, S., Petrov, Á., Nagy, V. K., Merkely, G., Merkely, B.: Swimming competitions in the era of COVID-19: Lessons from successfully hosting the International Swimming League. *Physiol Int*. 109 (4), 511-523, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/2060.2022.00153>
IF: 1.697 (2021)





9. Fagyas, M., Bánhegyi, V., Úri, K., Enyedi, A., Lizanecz, E., Mányiné Siket, I., Mártha, L., **Fülöp, G. Á.**, Radovits, T., Pólos, M., Merkely, B., Kovács, Á., Szilvássy, Z., Ungvári, Z., Édes, I., Csanádi, Z., Boczán, J., Takács, I., Szabó, G., Balla, J., Balla, G., Seferović, P. M., Papp, Z., Tóth, A.: Changes in the SARS-CoV-2 cellular receptor ACE2 levels in cardiovascular patients: a potential biomarker for the stratification of COVID-19 patients. *GeroScience*. 43 (5), 2289-2304, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-021-00467-2>
IF: 7.581
10. Csongrádi, A., Altorjay, I., **Fülöp, G. Á.**, Enyedi, A., Enyedi, E. E., Hajnal, P., Takács, I., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Chitotriosidase gene polymorphisms and mutations limit the determination of chitotriosidase expression in sarcoidosis. *Clin. Chim. Acta*. 513, 50-56, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.025>
IF: 6.314
11. Koliijn, D., Pabel, S., Tian, Y., Lódi, M., Herwig, M., Carrizzo, A., Zhazykbayeva, S., Kovács, Á., **Fülöp, G. Á.**, Falcao-Pires, I., Reusch, P. H., Linthout, S. V., Papp, Z., Heerebeek, L. v., Vecchione, C., Maier, L. S., Ciccarelli, M., Tschöpe, C., Mügge, A., Bagi, Z., Sossalla, S., Hamdani, N.: Empagliflozin Improves Endothelial and Cardiomyocyte Function in Human Heart Failure With Preserved Ejection Fraction via Reduced Pro-Inflammatory-Oxidative Pathways and Protein Kinase G α Oxidation. *Cardiovasc. Res*. 117 (2), 495-507, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvaa123>
IF: 13.081
12. Bánhegyi, V., Enyedi, A., **Fülöp, G. Á.**, Oláh, A., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bottyán, K., Lódi, M., Csongrádi, A., Umar, M. A. J., Fagyas, M., Czuriga, D., Édes, I., Pólos, M., Merkely, B., Csanádi, Z., Papp, Z., Szabó, G., Radovits, T., Takács, I., Tóth, A.: Human Tissue Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity Is Regulated by Genetic Polymorphisms, Posttranslational Modifications, Endogenous Inhibitors and Secretion in the Serum, Lungs and Heart. *Cells*. 10 (7), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071708>
IF: 7.666
13. Skoda, R., Bárczi, G., Vágó, H., Nemes, A., Szabó, L., **Fülöp, G. Á.**, Hizoh, I., Domokos, D., Törő, K., Dinya, E., Merkely, B., Becker, D.: Prognosis of the non-ST elevation myocardial infarction complicated with early ventricular fibrillation at higher age. *GeroScience*. 43 (5), 2561-2571, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-021-00377-3>
IF: 7.581





14. Molnár, A., Nádasy, G. L., Dörnyei, G., Patai, B. B., DeFavero, J., **Fülöp, G. Á.**, Kirkpatrick, A. C., Ungvári, Z., Merkely, B.: The aging venous system: from varicosities to vascular cognitive impairment.
GeroScience. 43 (6), 2761-2784, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-021-00475-2>
IF: 7.581
15. Yabluchanskiy, A., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Kiss, T., Csípő, T., **Fülöp, G. Á.**, Lipécz, Á., Ahire, C., DeFavero, J., Nyúl-Tóth, Á., Sonntag, W. E., Schwartzman, M. L., Campisi, J., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Pharmacological or genetic depletion of senescent astrocytes prevents whole brain irradiation-induced impairment of neurovascular coupling responses protecting cognitive function in mice.
GeroScience. 42 (2), 409-428, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-020-00154-8>
IF: 7.713
16. Lódi, M., Priksz, D., **Fülöp, G. Á.**, Bódi, B., Gyöngyösi, A., Nagy, L. N., Kovács, Á., Kertész, A. B., Kocsis, J., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárdy, Z., Juhász, B., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Advantages of prophylactic versus conventionally scheduled heart failure therapy in an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy.
J. Transl. Med. 17, 229, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-1978-0>
IF: 4.124
17. Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Perz, A., O'Connor, D., Johnson, E., Sorond, F. A., Ungvári, Z., Csiszár, A.: Age-Related Alterations in Gait Function in Freely Moving Male C57BL/6 Mice: translational Relevance of Decreased Cadence and Increased Gait Variability.
J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci. 74 (9), 1417-1421, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gly242>
IF: 5.236
18. Csípő, T., Lipécz, Á., **Fülöp, G. Á.**, Hand, R. A., Ngo, B. T. N., Dzialendzik, M., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Kiss, T., Yabluchanska, V., Silva-Palacios, F., Courtney, D. L., Dasari, T. W., Sorond, F. A., Sonntag, W. E., Csiszár, A., Ungvári, Z., Yabluchanskiy, A.: Age-related decline in peripheral vascular health predicts cognitive impairment.
GeroScience. 41 (2), 125-136, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00063-5>



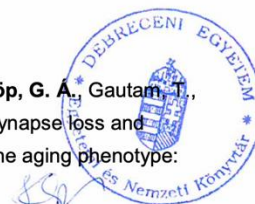


19. **Fülöp, G. Á.**, Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Molnár, A., Prodan, C. I., Kiss, T., Csípő, T., Lipécz, Á., Balasubramanian, P., Farkas, E., Tóth, P., Sorond, F. A., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Role of age-related alterations of the cerebral venous circulation in the pathogenesis of vascular cognitive impairment.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 316 (5), H1124-H1140, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00776.2018>
IF: 3.864
20. Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Csípő, T., **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Balasubramanian, P., DelFavero, J., Ahire, C., Ungvári, A., Nyúl-Tóth, Á., Farkas, E., Benyó, Z., Tóth, A., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Treatment with the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34 improves cerebrovascular endothelial function, neurovascular coupling responses and cognitive performance in aged mice, supporting the NAD⁺ depletion hypothesis of neurovascular aging.
GeroScience. 41 (5), 533-542, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00101-2>
21. Ahn, B., Pharaoh, G., Premkumar, P., Huseman, K., Ranjit, R., Kinter, M., Szveda, L., Kiss, T., **Fülöp, G. Á.**, Tarantini, S., Csiszár, A., Ungvári, Z., Van Remmen, H.: Nrf2 deficiency exacerbates age-related contractile dysfunction and loss of skeletal muscle mass.
Redox Biol. 17, 47-58, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.004>
IF: 7.793
22. **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., Farkas, E., Bari, F., Ungvári, Z., Csiszár, A.: Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation.
GeroScience. 40 (5-6), 513-521, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-018-0047-6>
IF: 6.444
23. Csípő, T., **Fülöp, G. Á.**, Lipécz, Á., Tarantini, S., Kiss, T., Balasubramanian, P., Csiszár, A., Ungvári, Z., Yabluchanskiy, A.: Short-term weight loss reverses obesity-induced microvascular endothelial dysfunction.
GeroScience. 40 (3), 337-346, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-018-0028-9>
IF: 6.444
24. Tarantini, S., Valcarcel Ares, M. N., Yabluchanskiy, A., **Fülöp, G. Á.**, Hertelendy, P., Gautam, T., Farkas, E., Perz, A., Rabinovitch, P. S., Sonntag, W. E., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Treatment with the mitochondrial-targeted antioxidant peptide SS-31 rescues neurovascular coupling responses and cerebrovascular endothelial function and improves cognition in aged mice.
Aging Cell. 17 (2), 1-12, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/accel.12731>
IF: 7.346





25. Vecsernyés, M., Szokol, M., Bombicz, M., Priksz, D., Gesztelyi, R., **Fülöp, G. Á.**, Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tószaki, Á.: Alpha-Melanocyte-stimulating Hormone Induces Vasodilation and Exerts Cardioprotection Through the Heme-Oxygenase Pathway in Rat Hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.227
26. Nagy, L., Gődény, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csípő, T., Csongrádi, A., **Fülöp, G. Á.**, Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecamtiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
27. Ungvári, Z., Tarantini, S., Hertelendy, P., Valcarcel Ares, M. N., **Fülöp, G. Á.**, Logan, S., Kiss, T., Farkas, E., Csiszár, A., Yabluchanskiy, A.: Cerebromicrovascular dysfunction predicts cognitive decline and gait abnormalities in a mouse model of whole brain irradiation-induced accelerated brain senescence.
GeroScience. 39 (1), 33-42, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-9964-z>
28. Ungvári, Z., Valcarcel Ares, M. N., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Csiszár, A.: Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies.
GeroScience. 39 (5-6), 491-498, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-9995-5>
29. Tarantini, S., **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Farkas, E., Zölei-Szénási, D., Galvan, V., Tóth, P., Csiszár, A., Ungvári, Z., Yabluchanskiy, A.: Demonstration of impaired neurovascular coupling responses in TG2576 mouse model of Alzheimer's disease using functional laser speckle contrast imaging.
GeroScience. 39 (4), 465-473, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-9980-z>
30. Csiszár, A., Tarantini, S., **Fülöp, G. Á.**, Kiss, T., Valcarcel Ares, M. N., Galvan, V., Ungvári, Z., Yabluchanskiy, A.: Hypertension impairs neurovascular coupling and promotes microvascular injury: role in exacerbation of Alzheimer's disease.
GeroScience. 39 (4), 359-372, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-9991-9>
31. Tucsek, Z., Noa Valcarcel-Ares, M., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., **Fülöp, G. Á.**, Gautam, T., Orock, A., Csiszár, A., Deák, F., Ungvári, Z.: Hypertension-induced synapse loss and impairment in synaptic plasticity in the mouse hippocampus mimics the aging phenotype: implications for the pathogenesis of vascular cognitive impairment.
GeroScience. 39 (4), 385-406, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-9981-y>





32. Tarantini, S., Valcarcel Ares, M. N., Yabluchanskiy, A., Springó, Z., **Fülöp, G. Á.**, Ashpole, N., Gautam, T., Giles, C. B., Wren, J. D., Sonntag, W. E., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Insulin-like growth factor 1 deficiency exacerbates hypertension-induced cerebral microhemorrhages in mice, mimicking the aging phenotype.
Aging Cell. 16 (3), 469-479, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ace.12583>
IF: 7.627
33. Szokol, M., Priksz, D., Bombicz, M., Varga, B., Kovács, Á., **Fülöp, G. Á.**, Csipő, T., Pósa, A., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Long term osmotic mini pump treatment with alpha-MSH improves myocardial function in Zucker Diabetic Fatty rats.
Molecules. 22 (10), 1-18, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22101702>
IF: 3.098
34. Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., **Fülöp, G. Á.**, Hertelendy, P., Valcarcel Ares, M. N., Kiss, T., Bagwell, J. M., O'Connor, D., Farkas, E., Sorond, F. A., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Pharmacologically induced impairment of neurovascular coupling responses alters gait coordination in mice.
GeroScience. 39 (5-6), 601-614, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-017-0003-x>
35. Kovács, Á., **Fülöp, G. Á.**, Kovács, A., Csipő, T., Bódi, B., Priksz, D., Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 310 (11), H1671-H1682, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>
IF: 3.348
36. Csató, V., Pető, A., **Fülöp, G. Á.**, Rutkai, I., Pásztorné Tóth, E., Fagyas, M., Kalász, J., Édes, I., Tóth, A., Papp, Z.: Myeloperoxidase evokes substantial vasomotor responses in isolated skeletal muscle arterioles of the rat.
Acta Physiol. 214 (1), 109-123, 2015.
IF: 4.066
37. Nagy, L., Kovács, Á., Bódi, B., Pásztorné Tóth, E., **Fülöp, G. Á.**, Tóth, A., Édes, I., Papp, Z.: 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, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13235>
IF: 5.259





38. Fagyas, M., Uri, K., Mányiné Siket, I., **Fülöp, G. Á.**, Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Szentkirályi, I., Maros, T. M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human.
PLoS One. 9 (4), 1-28, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF: 3.234

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 169,371

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
17,652**

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

Debrecen, 2023.03.03.

