

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**A NITRÁTOK HATÁSA POSZTINFARKTUSOS BETEGEKEN ÉS
ÁLLATKÍSÉRLETES ELHÍZÁSBAN**

DR. KIRÁLY CSABA

Témavezetők: PROF. DR. ÉDES ISTVÁN
egyetemi tanár

DR. BAGI ZSOLT
egyetemi adjunktus



Debreceni Egyetem
Laki Lálmán Doktori Iskola
Debrecen
2009

A doktori értekezés impresszuma

A NITRÁTOK HATÁSA POSZTINFARKTUSOS BETEGEKEN ÉS ÁLLATKÍSÉRLETES
ELHÍZÁSBAN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Király Csaba

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája kardiovaszkuláris megbetegedések programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Édes István és Dr. Bagi Zsolt

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

tagok: Dr. Habon Tamás, Ph.D.

Dr. Lőrincz István, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: 2010.január 22. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Kálmán, az MTA doktora

Dr. Bányász Tamás, Ph.D

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora

tagok: Dr. Habon Tamás, Ph.D.

Dr. Lőrincz István, kandidátus

Az értekezés védésének időpontja: 2010. január 22. 13:00

1. BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉSEK

A nitrátok alkalmazása az angina pectoris kezelésében és megelőzésében több, mint 130 évre nyúlik vissza. 1867-ben Sir Lauder Brunton írta le, hogy az amyl-nitrit belélegzése kedvezően befolyásolja a mellkasi diszkomfort érzést, 1879-ben William Murrell per os nitroglicerint oldattal képes volt az anginát megszüntetni. Ismert, hogy a nitrátok hatásai fokozottabban jelentkeznek a vénás érrendszerben, mint az artériás oldalon, így ennek következtében a nitrátok nagyobb mértékben csökkentik a szív előterhelését (preload), mint annak utóterhelését (afterload). Ezen mechanizmusok eredményeként csökken a bal kamrai töltőnyomás, a kamra dilatációja és a szisztolés falfeszülés, így csökken a szívimenergia és oxigénigénye és javul a szubendokardiális véráramlás. Korábbi tanulmányok szerint a nitrátok alkalmazása során a koronária nagy és az úgynevezett rezisztencia erek dilatációja is létrejön, ami közvetlen hozzájárul a szívim szöveti perfúziójának javításához. A klinikai gyakorlatban alkalmazott tartós nitrát kezeléssel a jelenleg rendelkezésünkre álló, a hatásosság és a mortalitás csökkentésre vonatkozó adatok nem egyértelműek. Nemzetközi ajánlások a transzdermális nitrát kezelést elsősorban a visszatérő iszkémiás állapotok kezelésére javasolják. Két jelentős, a miokardiális infarktusból és azt követően alkalmazott tartós nitrátkezeléssel foglalkozó vizsgálat javulást észlelt a halálozás kapcsán, a kardiogén shock és a posztinfarktusos anginaszám vonatkozásában, aminek hátterében álló mechanizmusok nem teljesen ismertek.

Újabb klinikai tanulmányok arra hívják fel a figyelmet, hogy a nitrát terápiára adott érrendszeri válaszkészség és az abból fakadó terápiás hatékonyság jelentős mértékben megváltozik bizonyos kórállapotokban. Ismert, hogy a kóros mértékű elhízás, aminek gyakorisága rohamos léptékben növekszik Magyarországon, jelentős mértékben fokozza a szívérrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát. Úgy gondolják, hogy elhízott betegekben kialakuló keringési zavarok nagymértékben hozzájárulnak az iszkémiás szívbetegség és magasvérnyomás betegség kialakulásához, valamint annak morbiditási és mortalitási rizikófaktorokhoz. Elhízásban a megváltozott koronária érműködés természete és a hátterében álló pontos kóreltani mechanizmusok azonban nem kellően ismertek, ezért az sem ismert, hogy a szöveti keringés fenntartására terápiásan alkalmazott nitrát terápia milyen hatékonysággal képes tágtani a koronária ereket ebben a betegségben.

Ezen elméleti megfontolások fényében a jelen disszertáció tudományos célkitűzéseit az alábbiakban fogalmaztuk meg:

- 1) megvizsgáljuk, hogy a miokardiális infarktust követően, 6 hónapig alkalmazott

transzdermális nitrát kezelés milyen hatással van az ehokardiográfiával detektált diasztolés és szisztolés bal kamra funkcióra.

2) megvizsgáljuk, hogy az elhízás állatkísérletes modelljeiben hogyan változik a koronária erek nitrátokra és nitrogén monoxid-donorokra adott relaxációs válaszkészsége.

2. METODIKÁK

2.1 Betegek és alkalmazott klinikai módszerek

A 2000.03.01.-2000.10.31. közti időszakban vizsgáltuk a stabil állapotú 18-85 éves miokardiális infarktust szenvedett betegeket. A miokardiális infarktust igazoltnak tekintettük, ha az alábbi feltételek teljesültek: Troponin T pozitivitás és/vagy az alábbi feltételekből legalább kettő. 1) 20 percnél hosszabb, sublingvális nitrátra nem reagáló mellkasi fájdalom, 2) a normál érték kétszeresét meghaladó mértékű CK és/vagy CK-MB szint emelkedés, 3) legalább két összetartozó standard, illetve végtagi elvezetésben 1 milliméteres, vagy nagyobb, vagy legalább két összetartozó mellkasi elvezetésben 2 milliméteres, vagy nagyobb ST eleváció, vagy friss bal Tawara szárblokk kialakulása. Stabil állapotúnak tekintettük a betegeket, ha: 1) nem voltak visszatérő anginás epizódok, 2) nem volt pulmonális pangás, 3) nem volt tervezett invazív beavatkozás és 4) a szisztolés vérnyomás 100-140 Hgmm, a diasztolés vérnyomás 65-90 Hgmm volt.

A kizárási kritériumok a következők voltak: 1) 14 napon belül nitrátot igénylő mellkasi fájdalom, 2) diuretikumot igénylő pulmonális pangás (NYHA II), 3) koronária intervenció, 4) súlyos hipotonia illetve hipertonia jelentkezése, 4) jobb kamrai infarktus, 5) nem tolerálható mellékhatás (fejfájás, allergia), 6) jelentős aorta vagy mitrális insufficiencia és 7) molsidomine kezelés.

A 8 hónapos vizsgálati időszakban 92 beteget vontunk be a vizsgálatba, közülük 33-nál jelentkezett kizárási feltétel. A fennmaradó 59 beteg adatait elemezték. Minden beteg az infarktust követő első 48 órában intravénás nitroglicerinnel részesült. Ezután két terápiás csoportot alakítottak ki: az egyik (nitrát csoport - 30 beteg) a 3. ápolási naptól kezdve 6 hónapon át naponta 12 órás terápia mentes időszak beiktatásával transzdermális nitroglicerinnel kezelésben (0,2 mg/h), másik felük nitrát mentes kezelésben részesült (kontroll csoport - 29 beteg). Minden egyéb kezelés - a megelőző szisztémás trombolízis, heparin, aszpirin, béta blokkoló, ACE gátló - megegyezett a szokásos klinikai gyakorlattal és a két kezelési csoportban nem volt statisztikai eltérés az alkalmazott gyógyszerek vonatkozásában. A 3.

ápolási napon történt a randomizáció, ahol a páratlan számú betegek a nitráttal kezelt csoportba, a páros számúak a kontroll csoportba kerültek. A vizsgálat megkezdése előtt a betegek írásbeli beleegyezésüket adták a vizsgálatba, melyet a helyi Etikai Bizottság jóváhagyásával végeztünk. A bevont betegeknél az infarktust követő 3, 14. napon (± 2 nap), 6. héten (± 3 nap), és 6. hónapban (± 2 hét) kontroll vizsgálat történt, mely részletes fizikális vizsgálatot, 12 elvezetéses EKG-t, valamint doppler ehokardiográfiás vizsgálatot foglalt magában. Az ehokardiográfia során az E,- és az A hullámot, a decelerációs időt (DT), valamint a véna pulmonálisban észlehető áramlás mértékét és az ejekciós frakciót (EF) határoztuk meg. Természetesen a falmozgások, az üregátmérők és a billentyűfunkciók meghatározása a szokásos klinikai gyakorlat szerint történt. A vizsgálatot két egymástól független, megfelelő ehokardiográfiás gyakorlattal rendelkező orvos végezte 2,5 MHz-es transzducerrel HP (Hewlett-Packard Co, Andover, MA, USA) SONOS 2000-es készülékkel. A CW doppler jelet közvetlenül a mitrális annulus fölé, kaudálisan, a mitrális vitorlák közé helyeztük el, és itt mértük a maximális koradiasztolés sebességet. A pulmonális áramlási sebességek mérése négyüregi képnél, a bal pitvari beömlésnél történt. Az ejekciós frakció meghatározására a módosított Simpson formulát alkalmaztuk.

A terheléses vizsgálatokra a 14. napos, illetve a 6 hetes ellenőrző vizsgálatokon került sor Marquette treadmill készülékkel. Az első terhelés a korai infarktusnak megfelelően Naughton protokoll, míg a 6 hetes vizsgálat Bruce protokoll szerint történt. Minden beteg a kiadott naplóban rögzítette a nitrátigényes anginaszámot, melyet a viziteken tekintettünk át. Vérnyomásmérés ülő testhelyzetben öt perc pihenő után történt, higanyos vérnyomásmérővel Korotkoff módszere szerint. A pulzusellenőrzés a vérnyomásméréssel egy időben történt az artéria radiáliszon 1 percig számolva.

2.2 Az elhízás állatkísérletes modellje

Vizsgálatainkhoz hím Wistar patkányokat használtunk, a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága jóváhagyásával. Az elhízást magas zsírtartalmú diéta (High Fat Diet; HFD; Testdiet; PMI Nutrition International) segítségével idéztük elő. A HFD állatok (n=20) magas (60%-os) zsírtartalmú tápot kaptak 10 héten keresztül. A kontrollként használt patkányokat (n=20) 10 hétig normál zsírtartalmú táppal etettük.

A plazmából teljes koleszterin és glükóz meghatározás történt kolorimetriás assay segítségével (Cobas Integra, Roche). Az inzulinszintet radioimmun alapú assay segítségével mértük (BYK Sangtec)

A Western immunoblottok elvégzéséhez kipreparált koronária érdarabokat 20 μ l SDS-

mintapufferben homogenizáltuk, majd 5 percig főztük. A mintákban lévő fehérjét 8%-os SDS-poliakrilamid gélen történő gélelektroforézissel szeparáltuk, majd a fehérjét nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A vizsgált fehérjeket detektálásra a szolubilis guanilát cikláz $\beta 1$ alegysége elleni IgG antitestet (Sigma), illetve loading kontrollként β -aktin-ellenes IgG antitestet (Abcam) alkalmaztunk. A kemilumineszcenciával kapott jelet autoradiográfia segítségével rögzítettük. A sávok optikai denzitását Image J szoftver segítségével mértük és kvantifikáltuk.

Izolált mikroér kísérleteinket koronária arteriolákon (~120 μm) végeztük. A mellkas megnyitását követően steril körülmények között eltávolított szívét és izoláltuk a szeptális artéria intramuszkulárisan futó másodrendű ágának 1-2 mm-es szakaszát. Az arteriolát sztereomikroszkóp segítségével egyik oldalán kanuláltuk és átöblítettük. Ezután az ér disztális végét is megkanuláltuk, beállítottuk az eredeti érhosszt, majd egy állandó hőmérsékletű ($T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.4$), oxigenizált szervfürdőbe helyeztük. A szervkamrát folyamatosan oxigenizált Krebs oldattal áramoltattuk át (40 ml/min). Az intraluminális nyomást visszacsatolásos elven működő nyomásszabályozó segítségével lassan 80 Hgmm-re emeltük és ~60 percig azon tartottuk miközben az intraluminális nyomást folyamatosan nyomástranzducerekkel mértük. Az inkubációs idő elteltével az arteriolákban spontán miogén tónus fejlődött ki. A belső érátmérő változását egy videómikroszkóphoz (Nikon, Eclipse 80i) rögzített digitális kamerával (CFW1310, Scion Corp) detektáltuk és számítógép segítségével mértük.

Kísérleteinkben elsőként a kontroll és a HFD állatokból izolált koronária arteriolák válaszait ismert hatásmechanizmusú receptor-mediálta vagy receptor független vazoaktív farmakonokkal teszteltük. Az egyes kumulatív dózishatásgörbéket kimosási periódus követte, melynek során az arteriolák visszanyerték kiindulási tónusukat. Ennek megfelelően az egyes dózishatásgörbék között minimum 10 percet vártunk. NO donorként a natrium-nitroprusszid (10^{-9} - 10^{-6} mol/L), illetve a NONO-át (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) dózisfüggő hatásait vizsgáltuk. A NO donorok hatására kialakuló érválaszokat a szolubilis guanilát cikláz gátló oxadiazolo-quinoline (ODQ) (1 $\mu\text{mol/L}$) 30 perces inkubációját követően is megmértük. Végezetül a sejtpermeábilis cGMP-analóg 8-bromo-cGMP emelkedő koncentrációinak (10^{-9} - 10^{-6} mol/L) hatására kialakuló érválaszt is megmértük.

2.3 Statisztikai értékelés

Minden adatot átlag \pm SD vagy \pm SEM formátumban adtuk meg. A kategóriás adatokat

Fischer'exakt teszttel hasonlítottuk össze. A független adatokat (kor, angina pectorisz, állatkísérletes adatok) Student't teszttel, az E, A, E/A, S, D, AR, EF, terhelési adatok, vérnyomás, szívfrekvencia értékelése ANOVA-val történt. A post hoc analízishez a Tukey tesztet használtuk. A vazóaktív szerek hatására kialakuló átmérőváltozásokat a maximális dilatáció százalékában fejeztük ki. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük. A statisztikai analízishez a SAS (6.12. verzió) software csomagot használtuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Miokardiális infarktuson átesett betegeken nyert eredmények

Először a két betegcsoport (nitrát és kontroll csoport) homogenitását vizsgáltuk meg. A megvizsgált rizikótényezők között - életkor, nemek aránya, hipertonia, dohányzás, hiperlipoproteinaemia, diabetes mellitus, előzetes miokardiális infarktus - nem volt értékelhető különbség a két kezelési csoport között. A miokardiális infarktus lokalizációbeli megoszlásán belül sem volt különbség a két csoport között. Tehát kijelenthetjük, hogy a két betegcsoport (nitrát és kontroll csoport) epidemiológiai és klinikai szempontból hasonlóknak, közel homogénnek volt tekinthető. Az utánkövetés során részletesen megvizsgáltuk a mitrális billentyűsíkon mért áramlási sebességeket (E, A hullám, E/A arány, DT). Eredményeink szerint a fél éves utánkövetés során az egyes csoportokon belül lényegében nem változtak a mitrális áramlási sebességek (E, A hullám, E/A arány, DT). Nem találtunk szignifikáns különbséget továbbá a két csoport között sem, a vizsgálat egész tartama alatt.

A véna pulmonálisban észlelt szisztolés és diasztolés áramlási sebesség (S, és D hullám) nem különbözött szignifikánsan a két kezelési csoportban (nitrát és kontroll csoport) a vizsgálat kezdetekor. Fél év alatt a pulmonális szisztolés sebesség (S hullám) szignifikáns mértékben nőtt mindkét csoportban, a 6. hónapos viziten ez a növekedés statisztikailag kimutathatóan nagyobb volt a nitrátot kapó betegeknél. A pulmonális diasztolés sebesség (D hullám) értéke mindkét csoportban jelentősen csökkent az utolsó viziten a kiindulási értékhez viszonyítva. Ez a csökkenés szintén jelentősebb volt a nitrát csoportban. Hasonló jelenséget észleltünk a pitvari reverz áramlási sebesség (AR hullám) vizsgálatára kapcsán is. Az 1. vizit során az AR értéke hasonló volt a két csoportban (nitrát és kontroll), majd az utánkövetés során szignifikáns csökkenést mutatott. A csökkenés mértéke ebben az esetben is statisztikailag kimutathatóan nagyobb volt a nitrát csoportban, mint a kontroll csoportban. Az adatok áttekinthetőbb értékelésére külön kiszámítottuk az S, D hullámok, az S/D arány és a AR hullám százalékos változásait az utánkövetés során, a kiindulási értékhez képest és valamennyi paraméternél lényegesen nagyobb százalékos változást észleltünk a nitrát csoportban.

Adataink validálására elvégeztük ugyanazon vizsgáló esetében az egyes vizsgálatok közötti variabilitás és a különböző vizsgálók közötti variabilitás vizsgálatát. Eredményeink (átlag \pm SD; az első adatsor mindig az ugyanazon vizsgáló eredményei közötti variabilitást, a második adatsor a különböző vizsgálók közötti variabilitást mutatja) a következők voltak: 1) mitrális billentyűsíkon mért áramlási sebesség E hullám: 2 ± 1 és 3 ± 2 cm/s, 2) mitrális billentyűsíkon mért áramlási sebesség A hullám: 3 ± 2 és 3 ± 3 cm/s, 3) DT 8 ± 6 és 10 ± 8 msec, 4) pulmonális szisztolés sebesség S hullám: $1,5\pm 1$ és 2 ± 2 cm/s, 5) pulmonális diasztolés sebesség D

hullám: $1,8 \pm 1$ and $2,3 \pm 2$ cm/s. Adataink alapján egyértelmű, hogy mind a mitralis síkon, mind a véna pulmonálisban végzett ehokardiográfiás vizsgálatok igen alacsony variabilitással elvégezhetőek. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a kapott eredmények egyértelműen valós eltéréseket/elváltozásokat tükröznek.

A szisztolés bal kamra funkcióra utaló ejekciós frakció (EF) a 4. viziten szignifikánsan jobbnak bizonyult a nitrátot kapó csoportban, mint a nitrát kezelés nélküli csoportban. A féléves utánkövetés során ez az érték mindkét csoportban javulást mutatott, de a növekedés lényegesen nagyobb volt a nitrát csoport betegeinél. A terheléses vizsgálat eredményeit megvizsgálva a nitrát csoportban a 6. héten szignifikáns mértékben csökkent a terhelés során kialakuló ST depresszió mértéke. A nitrát nélküli betegeknél (kontroll csoport) nem változott lényegesen a két terhelésen észlelt ST depresszió mértéke. A két csoport betegeinél a féléves utánkövetés során lényegében azonos sublingvális nitrátra szűnő anginaszám jelentkezett. Az utánkövetés során nem különbözött egymástól a két csoport (nitrát és kontroll) a szisztolés és diasztolés vérnyomásértékekben. A nitráttal kezelt betegekben kissé magasabb pulzusfrekvenciát észleltünk, melynek mértéke nem érte el a szignifikancia határát.

A mortalitás vonatkozásában sem volt értékelhető különbség a két kezelési csoport között. A nitrát csoportban 2 beteg exitált (1 hirtelen otthoni halál és egy közlekedési baleset következtében), a nitrátmentes csoportban 3 beteg halt meg (egy apoplexia, egy pneumonia, egy akut balszívfél-elégtelenség miatt). Tekintettel klinikai vizsgálatunk jellegére (relatív kis betegszám) és időtartamára (fél év utánkövetés), a mortalitás nem szerepelt a kítűzött és vizsgálandó végpontok között.

3.2. Az elhízás állatkísérletes modelljében kapott eredmények

A koronária arteriolák érválaszait az elhízás kísérletes állatmodelljében vizsgáltuk. 10 hetes táplálást követően a magas zsírtartalmú diétával (angol rövidítéssel élve, high fat diet; HFD) táplált állatok testtömege, illetve retroperitoneális zsírpárnáik tömege szignifikánsan magasabb volt a normál zsírtartalmú diétán tartott állatokhoz képest (kontroll). A HFD állatok esetén szignifikánsan emelkedettnek találtuk továbbá a szérum glükóz, inzulin és összkoleszterin szinteket.

A NO donorok, a nátrium nitroprusszid (SNP) és a NONO-át hatására kialakuló, endotélium independens dilatáció tekintetében a HFD erekben szignifikánsan nagyobb választ kaptunk, mint a kontroll csoportból izolált arteriolák esetében. Ugyanakkor, a sejtpemeábilis cGMP analóg 8-bromo-cGMP kiváltotta dilatáció nagysága nem különbözött a kontroll és a HFD állatokból izolált erek esetében.

Megvizsgáltuk a szolubilis guanilát cikláz (sGC) inhibitor oxadiazolo-quinoxalin (ODQ) jelenlétében a SNP és a NONO-át által kiváltott érválaszokat is. Eredményeink szerint az ODQ mindkét csoport esetében ugyanolyan szintre csökkentette az izolált koronária arteriolák dilatációs válaszát.

A funkcionális vizsgálatok mellett részletes Western immunoblott analízist végeztünk a HFD és a kontroll patkányok szívéből izolált koronáriákból. A kontroll és a HFD állatokból izolált koronáriák sGC $\beta 1$ alegység expressziójának tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoportban. A Western immunoblot eredmények valószínűsítik, hogy a HFD állatok arterioláinak megnövekedett nitrát érzékenysége nem az sGC $\beta 1$ alegység mennyiségének direkt változásával függ össze.

4. MEGBESZÉLÉS

Korábbi klinikai megfigyelések és elméleti megfontolások alapján felmerült annak lehetősége, hogy az akut miokardiális infarktust követően alkalmazott nitrátok hatékonyak lehetnek a bal kamrai funkció hosszú távú javításában, azonban az adatok nem egyértelműek. A trombolízis bevezetése előtti korszakban az első ez irányú vizsgálat tanulmányozta a Q hullámmal járó anterior lokalizációjú infarktuszos betegeket, akik kis dózisú intravénás nitroglicerint kaptak 48 órán át, majd további 6 hétig buccális nitroglicerint, vagy placebo. Excentrikus adagolási módot választottak, 8 órás nitrátmentes időszakkal. Placebóval összehasonlítva a nitrátcsoportban megőrződött a bal kamra geometriája és javult a működése ehokardiográfiás adatok alapján, valamint a nitrátcsoportban izotóp technikával is megerősítve kisebb volt a bal kamra térfogata és a klinikumban is tartós előnyöket észleltek még 8,5 hónappal a kezelés felfüggesztése után is. Újabban a nitrátok mortalitásra gyakorolt hatásával akut miokardiális infarktuszban két nagy, multicentrikus tanulmány a GISSI-3, és az ISIS-4 foglalkozott. Ez a két vizsgálat összességében csaknem 77000 beteg adatait dolgozta fel. Azt vizsgálták, hogy a nitrátok és az ACE inhibitorok adása képes-e csökkenteni a posztinfarktuszos halálozást. A GISSI-3 vizsgálatban az intravénás nitroglicerint adását 6 hetes transzdermális nitrátkezelés követte, míg az ISIS-4-ben 5 hétig elhúzó hatású izoszorbid-5-mononitrát tablettát használtak. Kismértékű csökkenést észleltek a 6 hetes halálozás vonatkozásában mindkét vizsgálatban (1000 beteg esetében ez a csökkenés 2,1 volt az ISIS-4, és 3,9 a GISSI-3 tanulmányban), melynek mértéke nem érte el a szignifikancia szintet. Ugyanakkor a GISSI-3 vizsgálatban a posztinfarktuszos anginaszám, és a kardiogén shock előfordulása is jelentősen csökkent ($p=0,03$, $p=0,009$), a nitrát és a lisinopril kombinációja 17%-al csökkentette az összhálózást ($p=0,02$), az ISIS-4-ben pedig az első 48 órában a

mortalitás szignifikánsan alacsonyabb volt a nitrátcsoportban ($p < 0,0001$). Ezek az adatok a nitrátok előnyös hatásaira utalnak.

Már az 1999-es ACC/AHA ajánlásban a 24-48 órás intravénás nitroglicerinnel Class I (abszolút javallat) ajánlásként szerepel a kongesztív szívelégtelenséggel, a nagy anterior infarktusos és a perzisztáló iszkémiás, illetve hipertóniás betegeknek. A 48 órán túli adását visszatérő angina, és a perzisztáló pulmonális pangás esetén ajánlja. A transzdermális formát kizárólag a rekurráló iszkémia esetén javasolja, ezt is a Class II/a ("javasolt") csoportban. Az újabb ajánlások lényegében nem változtattak a nitrátok klinikai alkalmazását illetően miokardiális infarktusból.

A miokardiális infarktust követően alkalmazott tartós nitrát kezeléssel legújabb ajánlások alapján azonban megoszlanak a vélemények. A nagy multicentrikus, randomizált tanulmányok ugyan igazoltak mortalitás csökkentő hatást, de ennek mértéke nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. Ugyanakkor a kardiogén shock, és a posztinfarktusos anginaszám vonatkozásában szignifikáns mértékű javulást értek el a nitrátkezelés alkalmazásával. A klinikai gyakorlat szerint ma Magyarországon elsősorban a jobb életminőség és a tünetek csökkentése-megelőzése érdekében kontraindikáció hiányában - panaszmentesség esetén is - infarktust követően fél évig alkalmazzák a tartós transzdermális vagy tablettás nitrát kezelést.

Kutatásaink első részében célkitűzésünknek megfelelően a tartós nitrát kezelés hatását tanulmányoztuk ehokardiográfiás paraméterek segítségével a szisztolés és a diasztolés bal kamrafunkcióra. Eredményeink szerint a bal kamrai ejekciós frakció és a véna pulmonálisban észlelt szisztolés áramlási sebesség szignifikáns növekedését észleltünk a nitráttal kezelt betegcsoportban. Jelentősen nagyobb volt a véna pulmonálisban mért diasztolés-és pitvari reverz áramláscsökkenés a nitrátcsoportban a kontroll csoporthoz képest. Azt találtuk, hogy nőtt az S/D arány, a mitrális síkon végzett áramlásvizsgálatok nem mutattak különbséget a két csoport között (E, A, E/A, DT). Az a tény, hogy a mitrális síkon végzett áramlásvizsgálatokban (E, A, E/A, DT) nem mutatkozott statisztikailag jelentős különbség a nitrát és a nitrátmentes csoport között a következő tényezőkkel magyarázható: 1) a nitrátok elsősorban a preloadra hatnak (az afterloadra gyakorolt hatásuk csekélyebb), 2) a pulmonális áramlási sebességek valószínűleg érzékenyebb indikátorai a diasztolés diszfunkciónak, mint a mitrális áramlási sebességek, 3) a véna pulmonalis áramlás folyamatos (mind szisztolében, mind diasztolében), ugyanakkor a mitralis áramlás kizárólag a diasztolében történik és függ a bal kamra állapotától és 4) a mitralis E/A hányados önmagában nehezen használható ehokardiográfiás paraméter a szívelégtelenség súlyosságának megítélésére a

pseudonormalizáció jelensége miatt.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a nitrátok milyen hatással vannak egyéb klinikai paraméterekre, és azt találtuk hogy a terheléssel kiváltható maximális ST depresszió mértékében az alapvizsgálatnál nem mutatkozott eltérés a két kezelési csoportban, viszont a 6 hetes terhelésen szignifikánsan kisebb ST depresszió jelentkezett a nitrát csoport betegeinél. A 6 hónap alatt a betegek által regisztrált anginaszám vonatkozásában kismérvű, nem szignifikáns csökkenést észleltünk a nitrát csoportban. Sem a szisztolés, sem a diasztolés vérnyomásértékek között nem mutatkozott statisztikailag kimutatható különbség a féléves kezelési időszak alatt a két csoportban. A szívfrekvencia is teljesen hasonló volt a vizsgálat tartama alatt. Mortalitás vizsgálata (a viszonylag kicsi esetszám miatt) nem szerepelt a végpontok között. Ugyanakkor tanulmányunkban is kimutatható volt, hogy a nitrátkezelés nem növelte a halálozási arányokat.

Mi lehet a nitrátok klinikai hatékonyságának a magyarázata miokardiális infarktust követően? A nitrátok hatása valószínűleg komplex és sok tényezővel is összefügg. A korai remodeling az infarktus kezdetétől számított néhány napon belüli lokális dilatációt, az elhalt terület növekedését okozza. Ez a folyamat globális kamrai dilatációt, és emelkedett diasztolés falfeszülést hoz létre mind az infarktos, mind az ép területen. Az infarktus első óráiban elindított nitrátkezelés csökkenti a falfeszülést és ezáltal az infarktus terjedését, a regionális diasztolés kiboltosulást (bulging), a kollagén matrix felbomlását, a szívizomsejtek eltolódását (slippage) és a regionális tágulékonyságot. Továbbá a nitrátok általánosságban csökkentik a miokardiális iszkémia kialakulását (amit eredményeink szerint a nitrátos betegcsoportban a terhelésre kialakuló maximális ST depresszió mértékének csökkenése is jelzett).

Adataink alapján tehát úgy tűnik, hogy a tartós nitrátkezelés miokardiális infarktust követően (panaszmentes betegeknél is) jótékony hatással van a bal kamra funkcióra. Későbbiekben nagyobb betegszámmal, más kardiológiai centrumok bevonásával az újabb módszerek segítségével (pl. szöveti Doppler echokardiográfia) a vizsgálat kiterjesztését tervezzük.

Kísérleteink második részében azt vizsgáltuk, hogy a magas zsírtartalmú diéta hatására fellépő elhízásban és metabolikus szindrómában hogyan változik a koronária mikroerek működése. Jól ismert, hogy a szöveti perfúzió elsősorban a kis artériák és arteriolák átmérőjétől függ. A koronária keringés esetében, ahol különösen fontos szereppel bír az oxigén ellátottság, az arterioláris dilatáció károsodása jelentős következményekkel járhat a miokardium perfúzió tekintetében. Az elhízással összefüggésben számos vizsgálat mutatta ki eltérő szövetekből izolált arteriolák esetében az endotél-függő dilatáció csökkenését.

Kutatócsoportunk korábban azt találta, hogy mind koronária, mind perifériás vázizom erekben csökkent az endotél nitrogén monoxid termelése magas zsírtartalmú diétán tartott állatokban. Jelen kísérletes eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy a magas zsírtartalmú diétán tartott állatok koronária ereiben fokozott a koronária simaizom NO érzékenysége, ami arra utal hogy az elhízás e kísérletes modelljében a koronária mikroerek falában olyan adaptációs mechanizmusok aktiválódnak, amelyek szerepet játszhatnak a koronária arteriolák dilatációs válaszainak megőrzésében. A koronáriák fokozott NO érzékenység elvileg felveti a nitrátok hatékonyságát is a humán obezitás különböző stádiumaiban.

Érdekes módon kísérleteink eredményeihez hasonlóan több közlemény jelent meg mostanában mely szerint az elhízás állatmodelljében a koronária arteriolák dilatációja megőrzött, sőt akár megnövekedett is lehet. Ezen kutatási eredmények arra engednek következtetni, hogy elhízás és inzulin rezisztencia fennállása esetén eddig ismeretlen adaptív vaszkuláris mechanizmusok aktiválódhatnak a károsodott dilatáció kompenzálására és a kellő miokardialis szöveti perfúzió biztosítására. Mivel az endotélialis eredetű NO kiemelkedő szerepet játszik koronária arteriolák átmérőjének fenntartásában, ezért a NO-mediálta folyamatok károsodása a megfelelő kompenzációs mechanizmusok hiányában a vérátáramlás csökkenéséhez vezethetne. Kísérleteinkben ezért arra kerestünk választ, hogy milyen adaptációs folyamatok vezethetnek a koronária arteriolák megtartott agonista-függő dilatációs válaszához kialakulásához. Mivel a direkt NO donorok, azaz a nátrium nitroprusszid és a NONO-át használatakor szignifikánsan nagyobb dilatációs választ kaptunk HFD koronária arteriolák esetében, ezért eredményeink alapján úgy tűnik, hogy HFD koronária mikroerekben fokozódik az arterioláris simaizom NO érzékenysége. A kérdést tovább vizsgálva a direkt cGMP függő dilatáció tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a két csoportban, mivel a sejt-permeábilis stabil cGMP analóg, a 8-bromo-cGMP ugyanolyan mértékű dilatációt okozott mindkét csoportból izolált erekben. Ebből arra következtettünk, hogy a fokozott NO érzékenység hátterében a cGMP fokozott termelődése állhat. Ezen megállapításunkat támasztotta alá, hogy a szolubilis guanilát cikláz gátló ODQ jelenlétében a nátrium nitroprusszid és a NONO-át kiváltotta vazodilatáció nem különbözött a két csoportban, tehát a sGC gátlása mindkét NO donor kiváltotta dilatációt azonos szintre csökkentette, eltüntetve a két csoport között gátlószer nélkül meglévő különbséget. A fokozott cGMP termelés hátterében a szolubilis guanilát cikláz megnövekedett expressziója is állhat, ezért megvizsgáltuk a szolubilis guanilát cikláz $\beta 1$ protein mennyiségét Western immunoblott segítségével. A sGC $\beta 1$ alegységének expressziója nem különbözött a két csoportból izolált koronária erekben. Ebből arra következtettünk, hogy a fokozott cGMP produkció hátterében a

szolubilis guanilát cikláz aktivitásának fokozódása áll. Jelen vizsgálati eredményeink összhangban állnak Brandes és kutatócsoportjának (Hypertension 2000; 35:231-236) eredményével, akik eNOS knockout egerekben, tehát az endotéliális NO szintézis hiányában a szolubilis guanilát cikláz aktivitásának kompenzatórikus fokozódását tapasztalták. A megnövekedett szolubilis guanilát cikláz aktivitás háttérében álló mechanizmusok (oxidatív stressz) azonban még nem kellőképpen tisztázottak és a hatásmechanizmus megértéséhez további adatok/vizsgálatok szükségesek.

Állatkísérletes eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy jóllehet a magas zsírtartalmú diéta hatására károsodik a koronária mikroerek endotéliális NO szintézise, azonban a vaszkuláris simaizom szolubilis guanilát cikláz aktivitása megnövekedett, ami miatt fokozódik a simaizom NO érzékenysége. Feltételezzük, hogy elhízásban ezen folyamatok jelentős szerepet játszhatnak a koronária mikrokeringés fenntartásában. Valószínűleg vizsgálataink elsősorban a humán elhízás kezdeti folyamatát reprezentálhatják (modellezhetik) és nem feltétlenül vonatkoznak az előrehaladott obezitásban (extrém elhízásban) és súlyos egyéb általános betegségekben (diabetes, hiperkoleszterinémia) szenvedő betegekre. Ugyanakkor lehetséges, hogy a humán elhízás kezdeti stádiumában is fokozódik a koronária erek nitrát érzékenysége, aminek igazolására, az értekezés első részében részletezett módszerekkel további humán vizsgálatokat tervezünk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos kutatásainkban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a miokardiális infarktust követően 6 hónapig alkalmazott transzdermális nitrát kezelés diasztolés és szisztolés bal kamra funkcióra gyakorolt hatását ehokardiográfiával. Továbbá, megvizsgáljuk hogy az elhízás során hogyan változik a koronária erek nitrátokra adott relaxációs válaszkészsége. Vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük. 1) A tartós nitrátkezelés posztinfarktusos betegeknél szignifikánsan javította az ehokardiográfiával detektált szisztolés bal kamra funkciót, 2) jelentősen növelte a véna pulmonálisban a szisztolés áramlási sebességet, 3) jelentősen csökkentette a véna pulmonálisban észlelhető diasztolés áramlási sebességet, és a pitvari reverz flow-t, 4) valamint statisztikailag szignifikánsan csökkentette a nitrát csoportban a 6 hetes terhelésen kiváltott ST depresszió mértékét. Adataink alapján igazoltnak véljük a tartós nitrátkezelés jogosultságát miokardiális infarktust követően, (panaszmentes betegeknél is). A magas zsírtartalmú diétán tartott, elhízott állatokban azt figyeltük meg, hogy 5) fokozódik a koronária mikroerek NO-donor és nitrát érzékenysége, 6) aminek háttérében a vaszkuláris simaizom szolubilis guanilát cikláz

megnövekedett aktivitása állhat. Feltételezzük, hogy elhízásban ezen folyamatok szerepet játszhatnak a koronária mikrokeringés fenntartásában. A koronária erek fokozott nitrát érzékenysége ugyanakkor részben magyarázattal szolgálhat a nitrát kezelés előnyös kardiovaszkuláris hatásaira elhízásban és más kórállapotokban, aminek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

6. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

Király C, Kiss A, Timar S, Kristof E, Hegedus I, Edes I. Effects of long-term transdermal nitrate treatment on left ventricular function in patients following myocardial infarction. Clin Cardiol. 2003; 26: 120-126. **IF: 1,221**

Jebelovszki E, **Király C**, Erdei N, Feher A, Pasztor ET, Rutkai I, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294: H2558-H2564. **IF: 3,643**

Egyéb közlemények:

Vécsei, L., **Király, Cs.**, Bollók, I., Nagy, A., Varga, J., Penke, B., Telegdy, Gy.: Comparative studies with somatostatin and cysteamine in different behavioral tests on rats. PHARMACOL BIOCHEM BEHAV 1984; 21: 833-837 **IF: 1,573**

Szűk T., Homoródi N., Kristóf É., Fülöp T., Csapó K., Vajda G., Szokol M., **Király Cs.**, Édes F.I., Bódi A., Mohácsi A., Édes I. Clinical comparison of the timing of clopidogrel administration after coronary stenting: loading dose at the time of intervention versus treatment prior to intervention AMERICAN HEART JOURNAL 2007; 153: 289-295 **IF:3,649**

Király, Cs., Kiss,Z., Benczúr B., Timár S.: Clinical application of Nitrolingual lingual spray. AMERICAN JOURNAL THERAPEUTICS 1998; 5: 135-138

Király, Cs., Timár S.: Repeat thrombolysis in myocardial infarction. ORVOSI HETILAP 2001; 142: 665-671

Király Cs., Kristóf É., Édes I., Czuriga I.: A nitrátok kardiovaszkuláris hatásai. *LEGE ARTIS MEDICINAE* 2003; 13: 288-296

Király Cs., Édes I., Czuriga I.: A nitrátkezelés a klinikai gyakorlatban *HÁZIORVOSI TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE* 2005; 10: 386-393

Király Cs., Édes I. The Effect of Nitrate Treatment on the Left Ventricular Function in Patients following Myocardial Infarction *EUROPEAN CARDIOLOGIST JOURNAL BY FAX* 2003; 8:52

Király Cs., Édes I., Czuriga I.: Nitrates in the treatment of cardiovascular diseases *JACC-HU* 2003; 2: 61-64

Bozóky G., Góhér I., Mohos A., Ruby É., Lengyel M., Szabó E., **Király Cs.** Szeptikus pulmonális embólia *MEDICINA THORACALIS* 2006; 59

Idézhető absztraktok

Nagy, A., Vécsei, L., **Király, Cs.,** Bollók, I., Telegdy, Gy.: The role of exogenous and endogenous somatostatin in the organisation of behavior in the rat. *ACTA PHYSIOL. HUNG.* 1984; 63: 360 IF: 0,26

Király, Cs., Vécsei, L., Nagy, A., Bollók, I., Telegdy, Gy.: Behavioral effects of somatostatin and cysteamine in rats. *ACTA PHYSIOL. HUNG.* 1985; 66: 354 IF: 0,26

Király, Cs., Kiss, Z., Benczúr B., Timár S.: Ismételt thrombolysis myocardialis infarctusban. *CARDIOLÓGIA HUNGARICA* (abstract) 1997; 16, Suppl.

Király Cs., Kiss A., Kristóf É., Édes I. Nitrate treatment in myocardial infarct patients. 11th. Alpok-Adria Meeting Proceedings, Balatonfüred, Hungary (2003. 06. 04-06)