

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A hiperinzulinémia és a metabolikus szindróma aritmogenezisre gyakorolt hatásainak és farmakológiai befolyásolási lehetőségeinek vizsgálata

Dr. Drimba László Péter

Témavezető: Dr. Peitl Barna



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	5
2.	CÉLKITŰZÉSEK	7
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1.	A metabolikus szindróma komponensei és patogenezeise	8
3.2.	A szívritmuszavarok patogenezeise	13
3.3.	Farmakológiai terápiás opciók metabolikus szindrómában	19
4.	METODIKÁK (ANYAG ÉS MÓDSZER).....	22
4.1.	Általános szempontok	22
4.2.	A „Hiperinzulinémia protokoll”	26
4.3.	A „Metabolikus szindróma protokoll”	31
4.4.	Statisztikai analízis.....	36
5.	EREDMÉNYEK	37
5.1.	A „Hiperinzulinémia protokoll” eredményei	37
5.2.	A „Metabolikus szindróma protokoll” eredményei	45
6.	MEGBESZÉLÉS.....	55
6.1.	A hiperinzulinémiás állapot preklinikai létrehozása	55
6.2.	A metabolikus szindróma preklinikai létrehozása.....	56
6.3.	A hiperinzulinémiás állapot hatása a kardiális aritmogenezisre	57
6.4.	A metabolikus szindróma hatása a kardiális aritmogenezisre.....	61
6.5.	A metoprolol terápiás jelentősége hiperinzulinémiában	64
6.6.	A cikletanin terápiás jelentősége metabolikus szindrómában.....	65
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	68
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	70
9.	TÁRGYSZAVAK	83
10.	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	84
11.	FÜGGELÉK.....	85

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGE: *advanced glycation end products*, glikozilált végtermékek

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

β_1 R: β_1 receptor

cAMP: ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát

CIC: cikletanin

DAD: *delayed afterdepolarization*, késői utódepolarizáció

DAG: diacil-glicerol

DM: diabétesz mellitusz, cukorbetegség

EAD: *early afterdepolarization*, korai utódepolarizáció

EKG: elektrokardiogramm

EMA: *European Medicines Agency*, Európai Gyógyszerügynökség

FFA: *free fatty acid*, szabadzsírsav

GLUT: glükóz transzporter

HDL: *high-density lipoprotein*

HEGC: Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp

hERG: *human Ether-á-go-go-Related Gene*, az I_{Kr} -t mediáló csatorna pórusformáló alegységet kódoló gén

HL: cAMP-dependens hormonszenzitív lipáz

HR: *heart rate*, szívfrekvencia

I_{Ca} : az L-típusú Ca^{2+} csatornákon folyó ionáram

I_{Kr} : a késői egyenirányító K^+ áram gyors komponense

I_{Ks} : a késői egyenirányító K^+ áram lassú komponense

I_{Na} : a gyors feszültségfüggő Na^+ csatornákon folyó ionáram

I_{NCX} : aNa^+/Ca^{2+} *exchanger* által mediált ionáram

I_{to} : tranziens kifelé irányuló ionáram

KPVT: Katecholaminerg Polimorf Ventrikuláris Tachikardia

KVB: kardiovaszkuláris betegség

LDL: *low-density lipoprotein*

LpL: lipoprotein lipáz

LQTS: Long QT szindróma

MABP: *Mean Arterial Blood Pressure*, artériás középnyomás

MB: *methylene-blue*, metilénkék

MET: metoprolol

NO: nitrogén-monoxid

NOS: nitrogén-monoxid szintáz

NSVT: *non-sustained ventricular tachycardia*, 15 másodpercnél rövidebb ideig tartó kamrai tachikardia

NZW: *New Zealand White*

PDE: foszfodiészteráz

PEI: programozott elektromos ingerlés

PKB: Protein Kináz B

PKC: Protein Kináz C

PL: placebo

QT intervallum: a Q-hullám kezdőpontjától a T-hullám végéig tartó intervallum

QT_c: korrigált QT intervallum (a *Bazett-formula* szerint)

QT_p: QT_{peak} szakasz, a Q-hullám kezdőpontjától a T-hullám csúcsáig tartó intervallum

RCT: *reverse cholesterol transport*, reverz koleszterol transzport

ROS: *reactive oxygen species*, reaktív szabadgyök molekulák

sGC: szolubilis guanilát cikláz

SOT: sotalol

SQTS: Short QT szindróma

SR: szarkoplazmatikus retikulum

SVT: *sustained ventricular tachycardia*, 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó kamrai tachikardia

T1DM: I. típusú diabétesz mellitusz

T2DM: II. típusú diabétesz mellitusz

TdP: *torsade de pointes* kamrai tachikardia

TDR: *transmural dispersion of repolarization*, transzmurális repolarizációs diszperzitás

TG: triglicerid

T_p-T_e: T_{peak}-T_{end}, a T-hullám csúcsa és vége közötti távolság

VERP: ventrikuláris effektív refrakter periódus

VF: kamrafiibrilláció

VLDL: *very-low-density lipoprotein*

VPB: *ventricular premature beat*, kamrai extraszisztole

1. BEVEZETÉS

Az inzulinrezisztencia, az obezitás, a diszlipidémia, valamint a hipertónia kórállapotainak egymással való, jellegzetes kombinációja eredményeként létrejövő metabolikus szindróma korunk egyik legjelentősebb népegészségügyi problémájának tekinthető. Egyes becslések szerint a világ népességének körülbelül 20-25%-a szenved metabolikus szindrómában, ezáltal a kóregyüttes vezető helyet foglal el az ún. nem-fertőző betegségek (*non-communicable diseases /NCD/*) sorában.¹ A metabolikus szindróma prevalenciája a fejlett és fejlődő országokban egyaránt magas és a kóregyüttes előfordulási gyakorisága folyamatosan és robbanásszerűen növekszik. A metabolikus szindróma legfőbb komponense, az inzulinrezisztencia incidenciájának populáción belüli permanens emelkedése kiemelten fontos szereppel bír a kóregyüttes „járványszerű” terjedésében.² Bizonyos becslések alapján világszerte 371 millió ember (a teljes népesség 8,3%-a) érintett a cukorbetegség (*diabétesz mellitusz /DM/*) valamelyik formájában.³ Egyes predikciók szerint, globálisan a *DM*-ban szenvedők száma 2030-ra várhatóan 552 millió főre fog emelkedni.^{4,5} Figyelembe véve azt, hogy a cukorbetegség eseteinek nagyságrendileg 90%-át a *II. típusú diabétesz mellituszban (T2DM)* szenvedő betegek alkotják, joggal tekinthetjük az inzulinrezisztencia állapotának növekvő incidenciáját az egyik legfontosabb mozgatórugónak a metabolikus szindróma eseteinek explozív emelkedésében.⁶

A fent említett kórállapotok egy adott ország egészségügyi ellátórendszerén túl annak gazdaságára is jelentős terheket rónak.⁷ A metabolikus szindróma következményes kórállapotai közül csak a *T2DM*-re vonatkozóan állnak rendelkezésre statisztikai adatok, amelyek szerint 2003-ban az *Európai Unió* 25 tagországában a cukorbetegségre fordított közvetlen egészségügyi kiadások hozzávetőlegesen 64,9 milliárd amerikai dollárra rúgtak, ami a fenti országok évi teljes egészségügyi kiadásainak 7,2%-át jelentette.⁸ A *DM* előfordulási gyakoriságára vonatkozó predikciók szerint ez az összeg 2025-re világszinten várhatóan eléri a 396 milliárd dollárt is, sőt egyes magas prevalenciájú országok a jövőben kénytelenek lennének teljes költségvetésük körülbelül 40%-át a cukorbetegséggel kapcsolatos egészségügyi kiadásokra fordítani.⁹

A metabolikus szindrómás betegek fokozott szív- és érrendszeri kockázattal bírnak, ugyanis a kóregyüttesben szenvedőkben az egészséges populációhoz viszonyítva kétszer nagyobb eséllyel alakul ki kardiovaszkuláris betegség (*KVB*).¹⁰ Hasonló tendencia figyelhető meg a cukorbetegség esetén is, mivel a *DM* mortalitásának körülbelül 80%-áért a kórállapot következményeként létrejövő *KVB*-ek felelősek.¹¹

Azok a tanulmányok, amelyek a fent említett kórállapotok és a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás közötti kapcsolatot vizsgálták, a KVB-ek közül elsősorban az iszkémiás szívbetegség (*ISZB*) és a perifériás artériás betegség (*PAB*) eseteit vették figyelembe.^{12,13} Erősen limitált azon preklinikai és klinikai kutatások száma, amelyek az inzulinrezisztencián alapuló kórállapotok kardiális aritmogenezisre gyakorolt hatásait vizsgálták.¹⁴ Következésképpen jelenleg sem tisztázott teljesen az, hogy a szívritmuszavarok mekkora szereppel bírnak a fenti metabolikus abnormalitásokhoz társuló emelkedett kardiovaszkuláris morbiditásban és mortalitásban. Mindezek alapján könnyen érthető, hogy az inzulinrezisztencián alapuló kórállapotok széles gyógyszeres terápiás arzenálja miatt nem tartalmaz olyan farmakont, amely kifejezett antiaritmiás hatásspektrummal rendelkezik.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az inzulinrezisztencia preklinikai és klinikai kifejlődésének szekvenciáját (kompenzatórikus hiperinzulinémia, manifeszt inzulinrezisztencia) szigorúan szem előtt tartva, tudományos kutatásaimban a következő célokat fogalmaztam meg:

A hiperinzulinémia, valamint a metabolikus szindróma patofiziológiai tüneteit stabilan és megbízhatóan expresszáló állatmodelleken a fenti kórállapotokhoz társuló

- ritmuszavar-kiválthatóság,
- az aritmiák kifejlődésének hátterében álló patomechanizmusok,
- a ritmuszavar-kiválthatóságot feltehetőleg hatékonyan csökkenteni képes farmakonok,
- valamint azok lehetséges kardioprotektív hatásmechanizmusainak

preklinikai vizsgálata.

Tanulmányunk elősegítheti az inzulinrezisztencián alapuló betegségekhez társuló kardiális aritmogenezis pontosabb megismerését, kórélettani hátterének részletes feltárását, továbbá hozzájárulhat a fenti kórállapotokban jelenleg alkalmazott gyógyszeres terápiás stratégia hatékonyabbá tételéhez.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A metabolikus szindróma komponensei és patogenezeise

Konvencionális értelemben a szindróma olyan tünetek együttes előfordulását jelenti, amelyek önmagukban egy betegségre nem mindig jellemzőek, azonban közös csoportosulásuk az adott betegség tekintetében az átlagosnál jóval gyakoribb. A fenti megállapítás a metabolikus szindrómára, mint betegségre is igaz, ámbar itt nem tünetek, hanem patológiás állapotok jellegzetes konstellációja figyelhető meg. A metabolikus szindróma az inzulinrezisztencia, az obezitás, a diszlipidémia és a hipertónia kórállapotainak jellegzetes, „szőlőfürtszerű” aggregációjából jön létre.¹⁵ Ezen kórállapotok önmagukban is jelentős kockázatot jelentenek következményes betegségek (KVB, T2DM) kialakulására nézve, azonban egymással való kombinációjuk ezt a rizikót jelentős mértékben megnöveli.¹⁶ Mindez azt is jelenti, hogy a metabolikus szindrómában egyidejűleg fennálló morbiditások száma és súlyossági foka szorosan korrelál az egyén KVB, valamint T2DM kialakulására mutatott kockázatával.

A metabolikus szindróma létrehozásáért felelős kórállapotok patogenezisüket tekintve roppant változatosak és molekuláris mechanizmusaik egymással számos ponton kapcsolódnak.¹⁷ Ahhoz, hogy a metabolikus szindróma klinikai kifejlődésének különböző stádiumaihoz (kompenzatórikus hiperinzulinémia, inzulinrezisztencia) potenciálisan társuló kardiovaszkuláris szövődmények (jelen esetben szívritmuszavarok) keletkezését mélyebben tanulmányozzuk, a kóregyüttes komponenseinek és patogenezisének molekuláris szintű ismerete alapvetően szükséges.

3.1.1. Az inzulinrezisztencia

Az inzulinrezisztencia a T2DM, valamint a metabolikus szindróma hátterében álló legalapvetőbb patológiás folyamat.¹⁸ Bizonyítja ezt az a tény is, hogy a metabolikus szindrómás betegek 80%-ában manifeszt inzulinrezisztenciás állapot van jelen. A kórállapotnak olyan nagy jelentőséget tulajdonítanak a metabolikus szindróma kifejlődésében, hogy bizonyos szakmai szervezetek a metabolikus szindrómát jelenleg is *inzulinrezisztencia szindrómaként* definiálják.¹⁹

A folyamat progressziója során a szénhidrát-metabolizmus kulcsszervei (vázizom, máj, zsírszövet) érzéketlenné válnak az inzulin hatásai iránt, ami elsősorban ezen sejtek lecsökkent

glükózfelvételében nyilvánul meg.²⁰ Az inzulinrezisztencia kezdeti szakaszában az emelkedett vércukorszint hatására az endokrin hasnyálmirigy kompenzációs működése aktiválódik és a szerv intenzív inzulintermelésbe kezd, ami a vérben keringő hormon mennyiségének jelentős növekedéséhez, azaz hiperinzulinémiás állapothoz vezet.²¹ A kompenzatórikus hiperinzulinémia képes normalizálni a magas vércukorszintet, azonban a folyamatos, nagymennyiségű inzulintermelés több éven, akár évtizeden keresztül a hasnyálmirigy β -sejtjeinek fokozatos kimerülésén keresztül elégtelen inzulinfelszabadulást eredményez. Ennek eredményeként a vércukorszint tartósan kóros tartományba emelkedik, ami terápiás beavatkozás nélkül csökkent glükóztolerancia (*impaired glucose tolerance, /IGT/*), majd manifest diabétesz (*T2DM*) kialakulásához vezet.²²

Az inzulinrezisztencia molekuláris hátterében az inzulinreceptor jelátviteli mechanizmusainak károsodása áll, amit elsősorban az abnormális metabolikus folyamatok eredményeként keletkező anyagcseretermékek: szabadzsírsavak (*free fatty acids /FFA/*), gyulladásos mediátorok (citokinek) és hormonok idéznek elő.^{23,24} A folyamatban kiemelt szerepe van az emelkedett *FFA* szintnek, ami az inzulinrezisztencia korai jelének tekinthető és az inzulin károsodott antilipolitikus hatására utal.²⁵ A jelentős *FFA* mennyiség a zsírsejtekben, valamint a lipoproteinekben tárolt nagymennyiségű triglicerid (*TG*) szöveti lebontásából származik. Az előbbi folyamat a *cAMP-dependens hormonszenzitív lipáz (HL)*, az utóbbi a *lipoprotein lipáz (LpL)* működésének eredménye.²⁶ A nagymennyiségű *FFA* vázizomban és májban történő mitokondriális oxidációja (*Randle-ciklus*) az *acetil-koenzim A (AcCoA A)* emelkedett intracelluláris szintjén keresztül a citrát megnövekedett mennyiségéhez vezet. A citrát közvetlenül képes gátolni a *foszfofruktokináz* enzimet (*PFK*) és ezáltal megakadályozza a glükóz-6-foszfát (*G-6-P*) piruváttá történő átalakulását. Az emelkedett *G-6-P* szint a *hexokináz II* enzim (*HK*) gátlásán keresztül a sejtek glükózfelvételét és -metabolizmusát jelentős mértékben csökkenti.²⁷ Az *FFA* intracelluláris lebontása számos olyan anyagcsereterméket (*ceramidok, diacil-glicerol*) is eredményez, amelyek emelkedett koncentrációjapathológián képesek aktiválni az inzulin intracelluláris jelátviteli folyamatában fontos szereppel bíró *serin/threonin (Ser/Thr)* útvonalat.²⁸ Az *inzulinreceptor-szubsztrát-1* molekula (*IRS-1*) kóros foszforilálása az inzulin metabolikus hatásaiért felelős *foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K)* jelátviteli útvonal „*down-regulációját*” eredményezi, ami indirekt módon számos enzim (pl.: *Protein Kináz B /Akt/*, *Protein Kináz C /PKC/*) és transzkripciósfaktor (*FoxO1 /Forkhead box protein 1/*) működészavarához vezet.^{29,30} Ezen folyamat eredményeként az inzulinérzékeny szövetekben (elsősorban máj) megnövekedett

glükoneogenezis, glikogenolízis és lecsökkent glükózfelvétel jön létre, ami a szénhidrát-metabolizmus fiziológiai egyensúlyának további megbomlásához vezet. (1. ábra)

3.1.2. Az obezitás

A metabolikus szindróma fontos komponense az obezitás, amit a test zsírszövetének kórosan megnövekedett mennyiségét jelenti. A zsírszövetet alkotó sejtek (adipociták), valamint az ide vándorló makrofágok számos olyan biológiailag aktív molekulát termelnek, amelyek szerkezetüket tekintve a citokinek családjába tartoznak és gyulladást elősegítő (proinflammatorikus) hatásuk van.³¹ Az adipokinek (*adipocitokinek*) legismertebb képviselői: a *rezisztin*, a *tumor nekrosis faktor-alfa* (*TNF- α*), az *interleukin-1* (*IL-1*), az *interleukin-6* (*IL-6*) és a *C-reaktív ptein* (*CRP*). Kórosan megnövekedett mennyiségük számos mechanizmuson keresztül promotálja az inzulinrezisztencia állapotának kialakulását.³²

Az adipociták, a hepatociták illetve a makrofágok által termelt *rezisztin* koncentrációja egyenesen arányos a test zsírszövetének mennyiségével, továbbá az anyagcserére, a kardiovaszkuláris rendszerre, valamint az immunkompetens sejtekre kifejtett pleiotróp hatása a *TL4 receptor* (*TL4R*) aktivációján keresztül érvényesül.³³ Az emelkedett *rezisztin* koncentráció az *NF- κ B* transzkripció faktor sejtmagba történő transzlokációján keresztül fokozza a proinflammatorikus citokinek szintézisét, továbbá a *MAP kináz* (*MAPK*) útvonal kóros aktivációjával szorosan hozzájárul a reaktív szabadgyök molekulák (*reactive oxygen species* /*ROS*/) fokozott képződéséhez és az inzulinrezisztencia létrejöttéhez.³⁴

A metabolikus szindrómában emelkedett *TNF- α* szint számos proinflammatorikus kinázt (*IKK β* , *c-Jun*) aktivál, ami az *IRS-1* kóros foszforilálációján keresztül az inzulin metabolikus hatásaiért felelős *PI3K* jelátviteli útvonal károsodását eredményezi.³⁵ Az *IL-1* megnövekedett koncentrációja gátolja a *GLUT-2* plazmamembránba történő transzlokációját, ezáltal az inzulinérzékeny szövetek lecsökkent glükózfelvételéhez szintén hozzájárul. Ezen molekulák a metabolikus hatásokon túl, immunkompetens tulajdonságuk révén nemcsak lokális, hanem szisztémás gyulladásos folyamatokat is elindítanak.³⁶ Az inflammációs mechanizmus elsősorban a makrofágok patológiás mértékű aktiválódásában nyilvánul meg, amelyek további citokin termelése a gyulladásos folyamat progrediálását és az inzulinrezisztencia súlyosbodását eredményezi.

A metabolikus szindrómához kapcsolódó trombotikus események megnövekedett előfordulási gyakorisága nemcsak a progresszív vaszkuláris atheroszklerotikus folyamatokra, hanem a prokoaguláns faktorok emelkedett szintjére is visszavezethető. A *plazminogén aktivátor inhibitor-I* (*PAI-I*) zsírszövetben való túlzott expresszióját valamint emelkedett

szérumkoncentrációját mutatták ki olyan obez egyéneknél, akiknél elsősorban az abdominális típusú elhízás dominált.³⁷

Hangsúlyoznunk kell, hogy a zsírszövetek olyan bioaktív molekulákat is termelnek, amelyek a szénhidrát- és lipidmetabolizmust kedvezően befolyásolják. Ide sorolható az *adiponektin*, amely a vázizomban az *AMP-kináz (AMPK)* aktivációján keresztül elősegíti a glükóz sejtekbe történő felvételét, valamint a zsírsav oxidációt.³⁸ A májban az *adiponektin* közvetett módon gátolja a glükoneogenezis és glikogenolízis enzimeit, ezáltal csökkenti az endogén glükóztermelést, továbbá antitrombotikus és gyulladáscsökkentő hatással is bír.³⁹ (1. ábra)

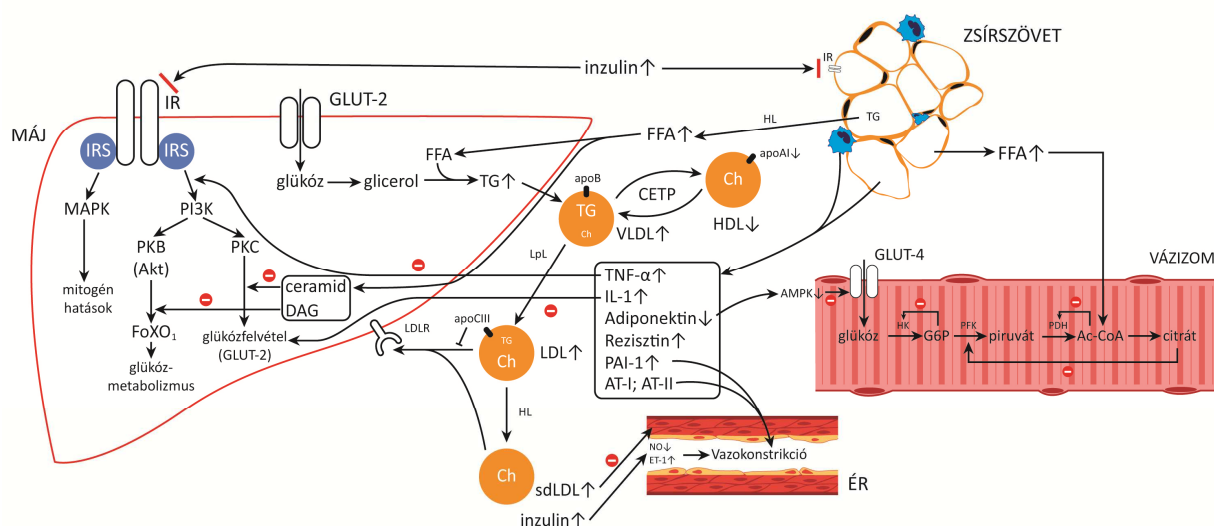
3.1.3. A diszlipidémia

Az inzulinrezisztencia állapotában az inzulin antilipolitikus hatása kevésbé érvényesül, ennek eredményeként a zsírszövetben a *TG*-ek katabolizmusa fokozódik, ami jelentős mennyiségű *FFA* felszabaduláshoz és kiáramláshoz vezet.⁴⁰ A limitált hepatikus zsírsavoxidációs kapacitás következtében a májban fokozott „*de novo*” trigliceridszintézis figyelhető meg.⁴¹ Az emelkedett vércukorszintnek köszönhetően a glükóz metabolizmusa során jelentős mennyiségű *glicerol* keletkezik, ami az intenzív hepatikus trigliceridszintézishez szintén hozzájárul, mint premetabolit.

A *TG* transzportja a szisztémás keringésben lipoprotein struktúrákban –*VLDL* partikulákban (*very-low-density lipoprotein*)– történik. Ennek eredményeként a keringésbe nagymennyiségű *TG* és *apolipoprotein B (apoB)* kerül. A *koleszterol-észter transzfer protein (CETP)* hatására az *apoB*-t tartalmazó *VLDL* partikulák *TG*-tartalma kicserélődik az *LDL (low-density lipoprotein)* és *HDL (high-density lipoprotein)* struktúrák koleszterol tartalmával és a nagymennyiségű koleszterolt tartalmazó *VLDL* maradványok visszakerülnek a májba. A *VLDL* partikulák *TG*-tartalmának lebontásban és a lipoprotein struktúra *LDL*-vé történő átalakításában a *LpL*-nak jelentős szerepe van. A *LpL* működésének fontos kofaktora az *apolipoprotein C-II (apoC-II)*, ezzel ellentétben az *apolipoprotein C-III (apoC-III)* gátolni képes a *LpL* aktivitását. Az inzulinrezisztencia állapotában a perifériás szövetekben (elsősorban zsírszövet) a *LpL* lecsökkent működését figyelték meg, amiért főként a lipoprotein struktúrák emelkedett *apoC-III* tartalma felelős.⁴² Az *apoC-III* szintézise ugyanis inzulin-mediált folyamat és az inzulinrezisztenciában emelkedett szintje a *FoxO1* transzkripció faktor működészavarára vezethető vissza.⁴³ Amint a *HDL* és *LDL* partikulák „megtelnek” *TG*-vel átalakításukat a továbbiakban a *HL* végzi. A *HL* fokozott aktivitását figyelték meg inzulinrezisztenciában. A *TG*-ben gazdag *LDL* partikulákból a lipolitikus

folyamatot követően kis, sűrű *LDL* (*small, dense LDL /sdLDL/*) struktúra keletkezik, amely rendkívül jelentős atherogén hatással bír.⁴⁴

Az inzulinrezisztencia állapotában a reverz koleszterol transzport (*reverse cholesterol transport /RCT/*) folyamata is károsodik. A *RCT* kardioprotektív, antiatherogén és anti-inflammatorikus mechanizmusában kiemelkedően fontos szerepe van az *apoA-I* tartalmú *HDL* partikuláknak. A *HDL* keringésből történő fokozott eliminációját, illetve lecsökkent *apoA-I* szintézist figyeltek meg az inzulinrezisztencia állapotában.⁴⁵ Ez utóbbi jelenség az emelkedett proinflammatorikus citokin szint (*TNF- α* , *IL-1*) következtében indirekt módon létrejött lecsökkent *apoA-I* gén expresszióinak tulajdonítható. (1. ábra)



1. ábra A metabolikus szindróma alapvető patogénikus folyamatai

AcCoA: acetil-koenzim A; AMPK: AMP kináz; apoAI: apolipoprotein AI; apoB: apolipoprotein B; apoCII: apolipoprotein CII; AT-I: angiotenzin-I; AT-II: angiotenzin II; DAG: diacil-glicerol; CETP: koleszterol-észter transzfer protein; Ch: koleszterol; ET-1: endothelin-1; FFA: szabadzsírsav; FoxO₁: Forkhead box protein 1; G6P: glükóz-6-foszfát; GLUT: glükóz transzporter; HDL: high-density lipoprotein; HK: hexokináz II; HL: cAMP-dependens hormonszenzitív lipáz; IL-1: interleukin-1; IR: inzulin receptor; IRS: inzulin-receptor szubsztrát; LDL: low-density lipoprotein; LDLR: LDL receptor; LpL: lipoprotein lipáz; MAPK: MAP kináz; NO: nitrogén-monoxid; PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1; PDH: piruvát dehidrogenáz; PFK: foszfofrukto-kináz; PI3K: foszfatidil-inozitol 3 kináz; PKB: Protein Kináz B; PKC: Protein Kináz C; sdLDL: small dense LDL; TG: triglicerid; *TNF- α* : tumor nekrosis faktor- α ; VLDL: very-low density lipoprotein

3.1.4. A hipertónia

A magasvérnyomás-betegség kifejlődése és a kóregyüttes más komponenseivel való kapcsolata felettébb komplex. Az emelkedett vércukor, lipoprotein és FFA szint bizonyítottan

a makro- és mikrovaszkulátúra progresszív károsodását okozza, amely az erek rigiditásán és lecsökkent bazális adaptációs képességén keresztül hipertóniás állapot kialakulásához vezet.⁴⁶ Az inzulin fiziológias szérumszint mellett indirekt módon képes fokozni az endotheliális *nitrogén-monoxid (NO)* és *endothelin-1 (ET-1)* szintézist. Az inzulinrezisztencia állapotában ezen egyensúly felborul és eltolódik az *ET-1* képződésének irányába, ami jelentős perifériás vazokonstrikciót eredményez.⁴⁷ Ezentúl az inzulin fokozza a veséből történő Na^+ reabszorpciót, amely hatás az inzulinrezisztenciás állapot esetén is megtartott.⁴⁸ A hiperinzulinémiás állapot hatására a szimpatikus idegrendszer fokozott aktivációját figyelték meg.⁴⁹ Közismert, hogy az adrenerg rendszer működése közvetlen vazokonstrikciót okoz, valamint stimulálja a *renin-angiotenzin-aldoszteron (RAS)* rendszert is. A zsírszövetet alkotó adipociták nagymennyiségben képesek *angiotenzinogén* molekulát termelni, ami az *angiotenzin-konvertáló (ACE)* és *katepszin* enzimek hatására potens vazokonstriktor metabolitok (*angiotenzin I, angiotenzin II*) keletkezéséhez vezet.⁵⁰ (1. ábra)

3.2. A szívritmuszavarok patogenezise

Mivel tanulmányunk egyik fő profilját a hiperinzulinémiához és a metabolikus szindrómához társuló ritmuszavar-kiválthatóság preklinikai vizsgálata képezi, ezért alapvetően szükségesnek tartjuk az aritmogenezis potenciális mechanizmusainak és molekuláris hátterének részletes bemutatását.

3.2.1. Az aritmogenezis mechanizmusai

A szív normál elektrofiziológiai működésében részt vevő ioncsatornák és pumpamechanizmusok egymással összehangolt, precíz működésének zavara az akciós potenciált kialakító ionáramok egyensúlyának kóros megváltozásához vezet. Ezen elektrofiziológiai instabilitás az akciós potenciál morfológiai átalakulásán keresztül a szív sejteinek abnormális ingerképzését és/vagy ingervezetését eredményezi, ami a szív működés szabályos és ritmikus jellegének megszűnéséhez, azaz szívritmuszavarok kialakulásához (aritmogenezis) vezet.⁵¹ Az elektrofiziológiai instabilitás a szívizomsejtek elektromechanikus csatoláson alapuló kontrakciós-relaxációs folyamatait is károsítja, ami számos esetben a szív pumpafunkciójának romlásán keresztül súlyos szöveti hipoperfúziót eredményez.

A szívritmuszavarok hátterében álló patofiziológiai folyamatoktól függően az aritmogenezis két fő mechanizmuson alapul: ingerképzési és ingervezetési zavarokon.

Az ingerképzési zavarok eredhetnek egyrészt a szív spontán automáciával rendelkező sejteiből (pl.: *sinus-csomó*), azonban kiindulhatnak olyan területekről is, amelyek fiziológias

körülmények között nem vesznek részt az ingerképzésben (pl.: pitvari, kamrai szívizomsejtek). Az előbbi esetben az adott *pacemaker* régió fokozott vagy csökkent ingerképzése áll a ritmuszavarok hátterében. Az utóbbi esetben attól függően, hogy a szívizomsejt akciós potenciáljának melyik fázisában keletkezik a kóros ingerület *korai* (2., 3. fázis), illetve *késői* (4. fázis) *utódepolarizációról* (*early, delayed afterdepolarizations /EAD, LAD/*) beszélünk.⁵² Az *utódepolarizáció* jelensége a miokardium membránpotenciáljának kóros oszcillációján alapul, amely –a feszültségfüggő Na^+ csatornák nyugalmi állapota esetén– egy kritikus feszültségértéket elérve a szívizomsejten egy újabb, a fiziológiásnál korábbi akciós potenciál kialakulásához vezet.⁵³ Ezen korai akciós potenciál az elektromechanikai kapcsolat révén egy korai kontrakciót eredményez, amit szám feletti ütésnek, extraszisztolénak nevezünk. Mivel az extraszisztolé fő kiváltó ingerének (*trigger*) a membránpotenciál kóros ingadozása tekinthető, ezért a *korai* és *késői utódepolarizáció* jelenségét triggerelt aktivitásnak is definiálják.

Fontos megjegyeznünk, hogy az *EAD* esetén a membránpotenciál értékének emelkedése elsősorban az L-típusú Ca^{2+} csatornák kóros aktivációjára vezethető vissza. Ez akkor fordul elő, amikor az akciós potenciál repolarizációs fázisa olyan hosszúvá nyúlt, hogy ezen csatornák már visszatértek inaktivációs állapotukból és újra vezetőképeseek.⁵⁴ Tehát azon állapotok, amelyek az akciós potenciál időtartamát –elsősorban a repolarizációs fázisét– túlzott mértékben megnövelik, hajlamosító tényezőként szerepelnek az *EAD* létrejöttében. Hangsúlyoznunk kell, hogy az *EAD* jelensége erőteljes frekvenciafüggést mutat. Kísérletesen indukált bradikard állapotokban (alacsony frekvenciával történő ingerlés, mechanikus AV-csomó destrukció) sokkal gyakrabban alakul ki az *EAD* jelenségen alapuló ritmuszavar, mint normál vagy magas szívfrekvencia esetén.^{55,56}

A *DAD* jelensége a miokardium kalcium-homeosztázisának zavarára vezethető vissza és ellentétben az *EAD*-val elsősorban magas szívfrekvencia értékek mellett figyelhető meg.⁵⁷ A mechanizmus létrejöttében kiemelt jelentősége van azon állapotoknak, amelyek potenciózzák a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő Ca^{2+} kiáramlást, illetve a kalcium-indukált kalcium felszabadulást (*CICR*). A fentiek alapján nem meglepő, hogy a *DAD* talaján kialakuló ritmuszavarok elsősorban katecholamin, valamint szívglikozid (*digitális*) kezelés hatására jelentkeznek.^{58,59} Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy *Katecholaminerg Polimorf Ventrikuláris Tachikardiában* (*KPVT*) a stressz vagy fizikai megterhelés hatására jelentkező gyakran fatális kimenetelű szívritmuszavar a *DAD* jelenségen alapul és hátterében a SR egyik *ryanodin receptor* típusát (*RyR 2*) kódoló gén veleszületett defektusa áll.⁶⁰

Ingerevezetési zavar a leggyakrabban akkor keletkezik, amikor a szíven az akciós potenciál formájában végigfutó ingerület propagációja zavart szenved, a szívizomsejtek aktivációját követően nem „oltódik ki” teljesen és egy miokardiális területre „újra-belép”. Ez alapján definiálják a folyamatot *re-entry* mechanizmusnak.⁶¹ A kóros ingerület az adott szívizomsejt-populációt –annak refrakter állapotától függően– ismét aktiválhatja, aminek eredményeként a normál ingerületi hullámtól teljesen független, abnormális miokardium aktiváció jön létre. A legtöbb esetben a kóros ingerület a miokardium régióin belül folyamatosan cirkulál és permanens aktivációban tartja az adott területet (körkörös /*circus-type*/ *re-entry*). A *re-entry* kör létrejöttéhez több feltételnek kell egyidejűleg teljesülnie. Szükséges egy olyan anatómiai vagy funkcionális akadály, ami körül az ingerületi hullám cirkulálni tud. A strukturális ok lehet fiziológiásan jelenlévő barrier, esetleg restitúciós folyamat eredményeként keletkező hegyszövet is. Bizonyos gyógyszerek, kórállapotok (aritmiák), elektromos ingerlési protokollok egy adott miokardium régió refrakteritásának fokozásán keresztül jelentenek funkcionális akadályt a miokardiális akciós potenciál normál terjedésében. Számos tanulmány igazolta, hogy a funkcionális eltérések sokkal gyakrabban játszanak szerepet a körkörös *re-entry* kialakításában, mint a strukturálisak.⁶²

Alapvető feltétel még, hogy az ingerületi hullám *re-entry* körben való terjedése legalább annyi ideig tartson, ameddig a parallel régióban lévő miokardiumsejtek visszatérnek refrakter állapotukból és újra aktiválhatóak lesznek. A körkörös *re-entry*-nek a fennálló akadály típusa, valamint a *re-entry* kör anatómiája alapján több fajtája ismert.

A *re-entry* mechanizmus további unikális típusa a *fázis 2 re-entry* (*phase 2 re-entry*), ami a miokardiális akciós potenciál retrogád propagációját jelenti a depolarizált területek irányából, azon szívizomsejt-populációk felé, amelyek már átestek refrakter periódusukon és újra aktiválhatóak.⁶³ A *fázis 2 re-entry* kialakulásának legfontosabb feltétele, hogy jelentős mértékű különbség legyen a szomszédos miokardiumrégiók sejtjeinek akciós potenciál időtartama között. Mivel az akciós potenciál időtartamának megnyúlása hátterében a leggyakrabban a repolarizáció prolongációja áll, ezért nevezik a folyamatot *fázis 2 re-entry*-nek. (2. ábra)

3.2.2. A miokardium repolarizációs diszperzitása

A miokardium különböző régióiból elvezetett akciós potenciálok morfológiai szempontból egymáshoz képest eltérést mutatnak.⁶⁴ Az akciós potenciál alaki heterogenitásának hátterében a különböző területeken lévő szívizomsejtek eltérő ioncsatorna denzitása áll.⁶⁵ Elektrofiziológiai szempontból unikális populációját képviselik a

miokardiumnak az ún. M-sejtek, melyeket a szakirodalom *Masonic*-, midmiokardiális-, illetve *Moe*-sejteknek is definiál.⁶⁶ Topográfiaiilag a bal kamra elülső falának szubendokardiális és midmiokardiális, a *laterális* kamrafal szubepikardiális és midmiokardiális, valamint a jobb kamra kiáramlási pályájának transzmurális régióiban helyezkednek el, továbbá jelentős mennyiségben találhatók még a papilláris izmok, trabekulák és az interventrikuláris szeptum mélyebb rétegeiben is.⁶⁷ Az M-sejtek jelenlétét már számos állatfaj szívében, illetve a humán miokardiumban is igazolták.⁶⁸ Funkcionális szempontból az M-sejtekre az jellemző, hogy bizonyos állapotokban, valamint számos gyógyszer hatására akciós potenciál időtartamuk a többi kamrai szívizomsejthez képest aránytalanul megnyúlik, ami elsősorban a sejttípus rendhagyó elektrofiziológiai tulajdonságaira vezethető vissza.⁶⁹ Számos *in vitro* kutatás igazolta a sejttípusban az I_{Ks} létrehozásáért felelős ioncsatorna lecsökkent, valamint a késői I_{Na} , az I_{Ca} és az I_{NCX} kialakításában résztvevő ioncsatornák emelkedett denzitását az epikardiális, illetve az endokardiális szívizomsejtekhez képest.⁷⁰⁻⁷²

A miokardium különböző régióinak eltérő ioncsatorna denzitáson alapuló elektrofiziológiai inhomogenitása a miokardiális repolarizáció folyamatának eltérő időtartamában manifesztálódhat, amit szakirodalom repolarizációs diszperzitásnak (*dispersion of repolarization /DR/*) nevez.⁷³ Attól függően, hogy a repolarizációs diszperzitás során keletkező elektromos gradiens milyen irányú és melyik régióját érinti a szívnek megkülönböztethetünk apikobazális, interventrikuláris és transzmurális formát.⁷⁴ Az apikobazális forma esetén a szív vertikális tengelye mentén lévő, az interventrikuláris *DR* esetén a jobb és bal kamra miokardiumát, a transzmurális variáns esetén pedig egy adott kamrafal rétegeit alkotó szívizomsejtek repolarizációs időtartama között alakul ki jelentős különbség. Ezutóbbi transzmurális repolarizációs diszperzitásnak (*transmural dispersion of repolarization /TDR/*) nevezik és a jelenségnek különösen nagy szerepet tulajdonítanak számos veleszületett és szerzett proaritmias állapothoz (pl.: *Long QT* szindróma /*LQTS*/, *Short QT* szindróma /*SQTS*/, *Brugada* szindróma, *KPVT*) társuló ventrikuláris eredetű ritmuszavar kialakulásában.⁷⁵ Ezen kórállapotok pontos patofiziológiájának és lehetséges provokáló tényezőinek feltérképezése a kardiovaszkuláris farmakológia egyik legfontosabb feladata volt az utóbbi két évtizedben.

3.2.3. A TDR és az aritmogenezis mechanizmusainak kapcsolata

Az utóbbi években számos mesterségesen létrehozott *LQTS* és *SQTS* állatmodellen végzett tanulmány igazolta, hogy a szindrómákhoz társuló fokozott aritmogenitás hátterében a ventrikuláris miokardium jelentősen megnövekedett transzmurális repolarizációs diszperzitása

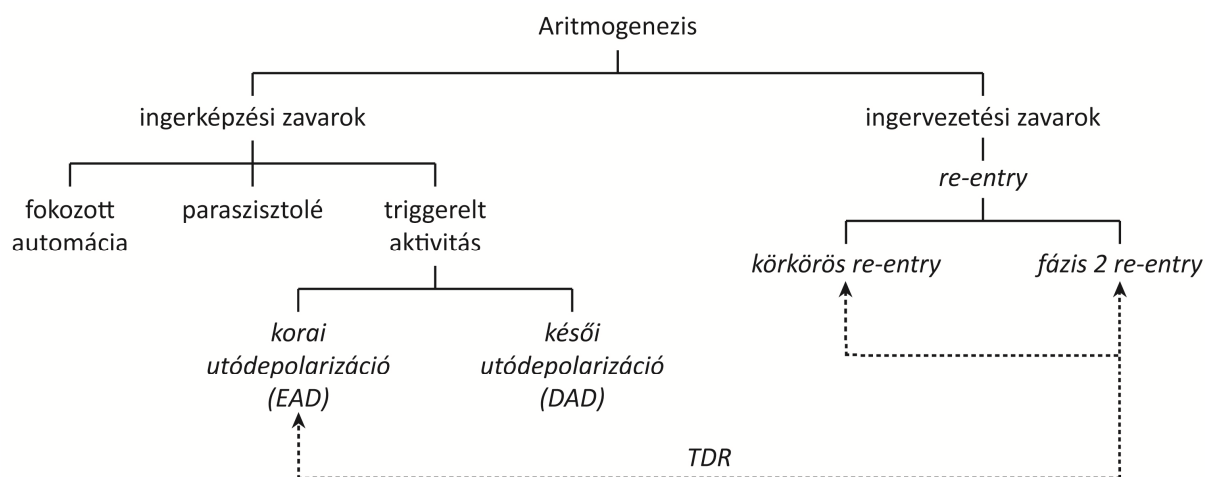
áll.^{76,77} A fenti tanulmányok alapján a *LQTS* és *SQTS* veleszületett, valamint szerzett formáiban a kamrafal rétegei között inhomogén és aránytalan akciós potenciál időtartam változás jön létre, ami a kiváltó októl függően többnyire a miokardiális akciós potenciál 2., illetve 3. fázisát érinti. Hangsúlyoznunk kell újra azt a tényt, hogy a midmiokardiális régióban elhelyezkedő M-sejtek jellegzetes elektrofiziológiai kompozíciójuk révén bizonyos állapotokban (kórállapot, gyógyszerhatás) jelentős és aránytalan mértékű akciós potenciál időtartam változással reagálnak, aminek eredményeként a kamrafal rétegeiközött (transzmurálisan) számottevő különbség alakul ki a repolarizáció időtartamának tekintetében. *Antzelevitch és munkatársai* szerint ez a jelenség képezi az alapját a *LQTS*-hoz és *SQTS*-hoz kapcsolódó ritmuszavaroknak, ugyanis a miokardium valamely rétegének jelentősen megváltozott akciós potenciál időtartama az aritmogenezis fentebb ismertetett mechanizmusain (ingerképzési és ingervezetési zavarok) keresztül képes facilitálni a szívritmuszavarok létrejöttét és fennmaradását.⁷⁸

Az ingerképzési zavar következtében kialakuló ritmuszavarok mechanizmusa a *LQTS* eseteiben elsősorban a triggerelt aktivitáson alapul. Bizonyos tényezők hatására ugyanis egy miokardiumsejt-populáció repolarizációs idejének megnyúlása olyan jelentős mértékű lehet, hogy a szívizomsejtek L-típusú Ca^{2+} csatornáinak visszatérnek inaktivációs állapotukból és újra aktiválhatóak lesznek. Mindezen folyamat megfelelő táptalajt nyújt a szívritmuszavarok keletkezésének.

Az ingervezetési zavarok következtében kialakuló aritmiák patofiziológiai alapját a *LQTS*-ban és *SQTS*-ban egyaránt a *re-entry* mechanizmus képezi. A szívizomsejtek heterogén repolarizációja következtében kialakuló inhomogén miokardium-refrakteritás hátterében egy miokardiumsejt-csoport akciós potenciál időtartamának abszolút vagy relatív megnyúlása áll. Az egymástól aránytalanul eltérő repolarizációs időtartamok következtében kialakuló heterogén miokardiális refrakteritás egyrészt funkcionális akadályt jelenthet az ingerület normál terjedésében –megteremtve a *re-entry* kör létrejöttéhez szükséges feltételeket–, másrészt az ingerület depolarizált területek irányából való retrogád propagációján keresztül a *fázis 2 re-entry* kialakításában is jelentős szereppel bír.⁷⁹ Ennek eredményeként az *EAD* talaján kialakuló egyszerű extraszisztolék tartóssá válhatnak és gyakran súlyosfokú, malignus kamrai tachikardiává (*torsade de pointes /TdP/*) is kulminálódhatnak.⁵³

Az aritmogenezisért felelős mechanizmusok (ingerképzési és ingervezetési zavarok) a *LQTS*-ban és *SQTS*-ban ezen a ponton kapcsolódnak össze egymással, hiszen a *QT* intervallum túlzott mértékű prolongációja, illetve rövidülése a miokardiális repolarizáció időtartamának és ezáltal a refrakteritásnak inhomogén, transzmurális változását tükrözi. A megnövekedett *TDR*

pedig kiváló alapot szolgáltat a fenti mechanizmusokon keresztül az aritmiák létrejöttében és fenntartásában. Egy roppant találó megfogalmazás szerint a *TDR* fokozódás az *EAD* mechanizmuson keresztül a szívritmuszavarok kialakulásának triggere, illetve a *re-enty* mechanizmuson keresztül az aritmák tartóssá válásának szubsztrátja.⁸⁰ (2.ábra)



2. ábra Az aritmiák kialakulásának lehetséges mechanizmusai és egymással való kapcsolatuk
EAD: early afterdepolarization; *DAD*: delayed afterdepolarization; *TDR*: transzmurális repolarizációs diszperzitás

3.2.4. A *TDR* preklinikai és klinikai markere

A *QT* intervallum hangsúlyos indikátora a fenyegető ritmuszavaroknak és meghatározása alapvetően fontos az egyén proaritmiás kockázatának felmérésében. Az utóbbi időben azonban számos tanulmány igazolta, hogy bizonyos gyógyszerek (pl.: *amiodaron*, nagy-dózisú *cisaprid*) annak ellenére, hogy jelentős mértékben képesek prolongálni a *QT* intervallumot, alkalmazásuk során nem alakul ki fokozott aritmogenitás.⁸¹ Mindebből arra következtethetünk, hogy a *QT* intervallum nem minden esetben jelzi megbízhatóan *TDR* amplifikációját.

A bal-kamrai wedge preparátumon (*Left Ventricular Wedge Preparation /LVWP/*) végzett kísérletek igazolták, hogy a miokardium transzmurális elektromos inhomogenitása az *EKG*-n detektálható T-hullám változásával szorosan korrelál. A modellen végzett vizsgálatok lehetővé tették a T-hullám képződésének hátterében álló celluláris elektrofiziológiai folyamatok pontos megismerését.⁸² Ennek során kimutatták, hogy az epikardiumban, midmiokardiumban és endokardiumban lévő szívizomsejtek eltérő repolarizációs időtartamai következtében, a transzmurálisan kialakuló feszültség-gradiensek dinamikus változásai

felelősek a T-hullám fel- és leszálló szárának, bizonyos esetekben pedig rendhagyó alakjának (hasadt, bifázisos T-hullám) létrehozásáért. Fiziológias esetben az epikardiális régióban elhelyezkedő szívizomsejtek mennek keresztül a leghamarabb a repolarizáció folyamatán, az M-sejtek pedig legutoljára.⁸³ Az LVWP modellen igazolták először azt, hogy az epikardiális szívizomsejtek repolarizációjának vége az EKG-n detektálható T-hullám csúcsával ($T_{peak}/T_p/$) esik egybe, továbbá az M-sejtek repolarizációjának terminális része a T-hullám végével ($T_{end}/T_e/$) korrelál.⁸⁴ Ezen összefüggésekből egyenesen következik, hogy egy adott miokardiális régió rétegeinek repolarizációs ideje közötti különbség, azaz a TDR, a T-hullám csúcsa és vége között mért időtartammal ($T_{peak}-T_{end}/T_p-T_e/$) arányos, nem pedig a QT intervallummal. Hangsúlyoznunk kell, hogy a T_p-T_e meghatározását és ezáltal a TDR megbecslését a prekordiális (transzverzális) pozíciójú elvezetések (V₂, V₃, V₄) nyert EKG regisztrátumokon célszerű elvégezni, hiszen ezek azok az elektródok, amelyek a szívre a koronális síkból tekintenek, tehát mintegy „keresztüllátnak” a kamrafalon (transzmurálisan).⁸⁵ A végtagi elvezetések (I, II, III) történő T_p-T_e meghatározás az elektródák pozíciója miatt (frontális sík) a repolarizációs diszperzitás egyéb térbeli formáiról (apikobazális, interventrikuláris) ad tájékoztatást. A T_p-T_e , mint a TDR amplifikációját megbízhatóan jelző proaritmias biomarker preklinikai és klinikai validitását számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálat igazolta.⁸⁶

3.3. Farmakológiai terápiás opciók metabolikus szindrómában

A metabolikus szindróma jelenkori gyógyszeres terápiája a polifarmácia jegyében zajlik. A farmakológiai lehetőségek sokszínűsége a metabolikus szindrómát alkotó kórállapotok patofiziológiai változatosságából ered. A gyógyszeres beavatkozás elsődleges célja a kardiovaszkuláris és metabolikus rizikó csökkentése.

Mivel a metabolikus szindróma legfontosabb komponensének az inzulinrezisztencia tekinthető, ezért a kórállapot gyógyszeres kezelése a terápiás irányvonalakban prioritást élvez. Az orális antidiabetikumok közül az inzulinrezisztencia csökkentésére a *biguanid* származékok (pl.: *metformin*), illetve a *thiazolidéndionok* (pl.: *roziglitazon*) sikeresen alkalmazhatók, azonban ezutóbbit az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency /EMA/) 2010 szeptemberében kardiovaszkuláris biztonságfarmakológiai okokra hivatkozva kivonta az európai gyógyszerpiacról.⁸⁷ A β -sejt protektív, étvágycsökkentő és miokardiális funkcióra gyakorolt kedvező hatásoknak köszönhetően fokozatosan előtérbe kerül az inkretin-alapú gyógyszeres terapia.⁸⁸

Az angiotenzin konvertáz enzim gátló vegyületek (*ACE inhibitorok*) a szisztémás vérnyomás csökkentésén túl az inzulinrezisztencia állapotát is előnyösen befolyásolják.⁸⁹ Antihipertenzív céllal szintén gyakori a *dihidropiridin (DHP)* típusú Ca^{2+} csatorna blokkolók (pl.: *amlodipin*) alkalmazása.

A kóros lipidprofil farmakológiai terápiájában a legnépszerűbb szerek a *PPAR α* receptor agonista hatásmechanizmussal bíró *fibrát* készítmények, amelyeket gyakran egészítenek ki *sztatin (HMG-CoA reductáz gátló)* vegyületekkel. A hatékony lipidcsökkentés céljából a *sztatin* és *niacin* terápia korábban szintén gyakran alkalmazott kombináció volt, azonban az EMA a *HPS2-THRIVE* tanulmány eredményei alapján a *niacin* készítmények felírását és alkalmazását nem javasolja, továbbá a gyógyszer forgalmazási engedélyét is átmenetileg felfüggesztette.⁹⁰

A fokozott prokoaguláns állapot gyógyszeres kezelésére számos tanulmány szerint kis-dózisú *aszpirin*-kezelés javasolt.⁹¹

A fentiekből tisztán látszik, hogy a metabolikus szindróma farmakoterápiájának jelenkori ajánlása nem tartalmaz olyan farmakont, amely antiaritmiás hatásspektrummal rendelkezik. Ez a hiányosság feltehetően abból ered, hogy erősen limitált azon tanulmányok száma, amelyek a hiperinzulinémia, illetve a metabolikus szindróma közvetlen szerepét vizsgálták volna a szívritmuszavarok kialakulásában.

Preklinikai tanulmányunk „*Hiperinzulinémia protokoll*” részében terápiás opcióként *metoprololt* alkalmaztunk. A *metoprolol* a humán klinikai gyakorlatban több évtizede használt farmakon. Legfontosabb klinikai indikációja közé tartozik: az akut koronária szindróma (ACS), a magasvérnyomás-betegség, valamint a tireotoxikus állapotok.⁹²⁻⁹⁴ A *metoprolol* ACS-ban való alkalmazása kettős célt szolgál, ugyanis a farmakon negatív kronotróp hatásának köszönhetően növeli a diasztolés időt és ezáltal a koronária-telődést, továbbá a β_1 *adrenerg receptorok* (β_1R) szelektív gátlásával a miokardiális iszkémia következtében kialakuló szimpatikus túlsúly kedvezőtlen hatásait is jelentősen képes csökkenteni. A *metoprolol* II: osztályú antiaritmiás tulajdonságainak köszönhetően számos szupraventrikuláris eredetű ritmuszavar (pl.: *pitvarfibrilláció, paroxizmális szupraventrikuláris tachikardia (PSVT)*) kezelésére is alkalmas.⁹⁵ Ezen indikációs terület célja elsősorban a fent említett szupraventrikuláris aritmiákból eredő magas szívfrekvencia farmakológiai kontrollja, nem pedig a gyógyszeres kardioverzió. Ventrikuláris eredetű szívritmuszavarok esetén a *metoprolol* alkalmazása jelenleg erősen limitált, azonban hangsúlyoznunk kell, hogy a *LQTS* familiáris formáiban a βR -blokkoló kezelés első-vonalas terápiának minősül.⁹⁶

A tanulmányunk “*Metabolikus szindróma protokoll*” részében terápiás lehetőségként *cikletanint* alkalmaztunk. A *cikletanin* egy antihipertenzív szerként törzskönyvezett, furopiridin szerkezetű, generikus gyógyszermolekula.⁹⁷ A gyógyszer és a metabolizmusa során keletkező vegyületek szerkezeti sokszínűsége miatt a *cikletanin* farmakodinámiai spektruma roppant széles, vérnyomáscsökkentő hatását is számos mechanizmuson keresztül fejti ki.⁹⁸ Az utóbbi két évtizedben számos vizsgálat célja a *cikletanin* teljes hatáspaletájának feltérképezése volt, aminek eredményeként fény derült a farmakon inzulinérzékenyítő és kardioprotektív hatásaira.^{99,100} A *cikletanin* anti-iszkémiás és antiaritmiás hatékonyságát főleg preklinikai iszkémia-reperfúzió modelleken vizsgálták. A farmakon kardioprotektív hatásaiért elsősorban a prosztaglandin szintézis fokozódását, az iszkémia során fellépő miokardiális ionzavar megelőzését, valamint az ATP-dependens K⁺ csatornák fokozott megnyílását tették felelőssé.¹⁰¹⁻¹⁰³

Hangsúlyoznunk kell újra azt, hogy a *metoprolol* és a *cikletanin* –változatos és kedvező farmakodinámiai spektrumuk ellenére– jelenleg nem részei az inzulinrezisztencián alapuló kórállapotok gyógyszeres terápiás stratégiájának.

4. METODIKÁK (ANYAG ÉS MÓDSZER)

4.1. Általános szempontok

Tanulmányunk vizsgálatait az inzulinrezisztencia, mint kórállapot preklinikai és klinikai progressziója alapján két alapvető részre osztottuk („*Hiperinzulinémia protokoll*” és „*Metabolikus szindróma protokoll*”). Az experimentális modellek különbözősége ellenére a kísérleti protokollok az alábbi pontokban egymással teljes mértékben megegyeztek.

4.1.1. Etikai engedélyek

Állatkísérleteink technikai és szakmai kivitelezése során figyelembe vettük az *Európai Parlament 2010/63/EU sz. direktívájában*, valamint az *US National Institutes of Health* szakmai szervezet *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* c. kiadványában megfogalmazott követelményeket. Az alkalmazott kísérleti eljárások végrehajtása a *Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérletes Bizottság (DE MÁB)* engedélyével történt (6/2007 DE MÁB, 13/2007 DE MÁB).

4.1.2. A kísérleti állatok

Kísérletsorozatainkban 3-3,5 kilogramm (kg) súlyú *New Zealand White (NZW)* fajtájú nyulakat (*Charles-Rivers Laboratories*, Isaszeg, Magyarország) alkalmaztunk. Az állatokat megfelelő környezeti körülmények mellett (22-25 °C fok, 50-70%-os páratartalom, 12 óránként változó világos/sötét periódusok) egymástól elszeparáltan (*Multifloor Pen System, Techniplast, Varese, Olaszország*) az erre a célra kialakított Intézeti Állatházban tartottuk. Az állatok táplálása *ad libitum* standard laboratóriumi táppal (*Charles-Rivers Laboratories*, Isaszeg, Magyarország) történt. A „*Metabolikus szindróma protokoll*”-ban részt vevő állatoknál a szindróma indukciójához speciális étrendet (*Bioplan Kft., Isaszeg, Magyarország*) alkalmaztunk.

4.1.3. A sebészi beavatkozás (Pacemaker-implantáció)

A kísérletsorozatainkban végrehajtott elektrofiziológiai mérések valamint a programozott elektromos ingerlés (*PEI*) megvalósításának előfeltétele volt az állatokba történő *pacemaker* elektród-katéter (*Eledyn 2/F4 S[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország*) beültetése, amely sebészi úton, aszeptikus körülmények között történt. A kísérleti állatok

műteti előkészítése során a nyak bőrét leborotváltuk, valamint az állat jobb oldali fülvénájába (*vena auricularis*) perkután kanült (*Vasofix Braunüle®G22*, B. Braun Melsungen AG, Németország) helyeztünk további gyógyszeradagolás céljából. A kísérleti állatok általános érzéstelenítéséhez intravénásan 10mg/ttkg *diazepam-* (*Seduxen®*, Richter Gedeon Zrt., Budapest, Magyarország) és 5mg/ttkg *ketamin* injekciót (*Calypsol®*, EGIS Nyrt., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk, amely még a továbbiakban kiegészült a juguláris régió 5-10 ml 2%-os *lidokain* injekcióval (*Lidocain 2%®*, EGIS Nyrt., Budapest, Magyarország) történő szubkután infiltrálásával. A műteti terület dezinficiáltuk (*Betadine®* oldat, EGIS Nyrt., Budapest, Magyarország) és izoláltuk. A jobb oldali juguláris régióban ejtett metszést és a *vena jugularis interna* kipreparálását és punkcióját követően, a *pacemaker* elektródát az ér ágrendszerén keresztül a jobb kamra csúcsi részéig vezettük. A katéter behelyezése során nem volt lehetőségünk a helyes pozíció ellenőrzése céljából radiológiai módszert alkalmazni, ezért a nagyerek és a szív üregeiben való tájékozódás és a katéter pontos helyzetének tisztázása az intrakavitális EKG-jel alapján történt. A vizsgálat sorozat végén a katéter pozíciójának *post mortem* ellenőrzését minden esetben elvégeztük. Sebészi antikoagulálás céljából intravénásan 100 NE/ttkg *heparin* injekciót (*Heparibene Na 250000 NE®*, Ratiopharm Hungária Kft., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk. Az elektród-katéter elhelyezése és rögzítése az állat nyakának bőre alá preparált zsebben történt. A kísérleti állatok a műteti terület zárása után azonnal, majd 3 napon keresztül posztoperatív parenterális antibiotikus terápiában (*Retardillin®*, TEVA Zrt., Debrecen, Magyarország) részesültek. A műtétet követően 1 hét rehabilitációs periódus állt az állatok rendelkezésére a teljes felépüléshez. (3. ábra)

4.1.4. Elektrofiziológiai és hemodinamikai mérések

4.1.4.1. Detektálás, rekordálás, kiértékelés

A preklinikai modellek elektrofiziológiai paramétereinek, valamint az indukált szívritmuszavarok detektálásához 12-elvezetéses EKG készüléket (*EXP-ECG-P*, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) használtunk. A mellkasi (prekordiális) és a végtagi (standard) EKG elvezetések pozícionálása és rögzítése a humán klinikai gyakorlatban alkalmazott módon történt. A kísérletek során az experimentális modellek elektrofiziológiai és hemodinamikai változóinak folyamatos detektálása, rekordálása és későbbi analízise *Haemosys* szoftver (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) segítségével történt. Az elektrofiziológiai paraméterek pontos meghatározásához legalább harminc, ritmuszavarmentes szív ciklus jelátlagolt EKG regisztrátumát használtunk fel. A TDR patomechanizmusát és az *in vivo* preklinikai modellünk elektrofiziológiai instrumentációját szem előtt tartva a

kiértékelés folyamatánál abszolút prioritást kaptak a prekordiális V_2 és V_3 elvezetésekben nyert regisztrátumok. Az EKG regisztrátumok analízise a fent említett szoftver segítségével digitálisan két, egymástól elszeparált vizsgálószemély által történt.

4.1.4.2. A vizsgált elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterek

A QT szakasz meghatározásánál a Q-hullám kezdetétől a T-hullám végéig tartó időtartamot vettük alapul. A T-hullám végpontját a tangenciális módszer szerint határoztuk meg.¹⁰⁴ Mivel a QT szakasz jelentős frekvenciafüggést mutat, így annak szívfrekvenciára korrigált értékét (QT_c) is meghatároztuk. A számítást a *Bazett-formula* alapján végeztük.

A $T_{peak}-T_{end}$ (T_p-T_e) meghatározásánál a T-hullám csúcsa és vége közötti időtartamot vettük alapul. Ezen esetben a kiértékelés kizárólag a prekordiális (V_2 , V_3) elvezetésekben nyert regisztrátumokból történt. A T-hullám csúcsának (T_{peak} / T_p) meghatározásánál annak legmagasabb pontját vettük figyelembe. Bifázisos T-hullám esetén a hullám első komponensének legmagasabb (negatív irányultság esetén legmélyebb) pontját tekintettük a T_p -nak.¹⁰⁵ A T-hullám végpontját (T_{end} / T_e) szintén a tangenciális módszer alkalmazásával határoztuk meg.

QT_{peak} intervallumnak (QT_p) a Q-hullám kezdőpontjától a T-hullám csúcsáig terjedő szakaszt tekintettük.

A *Ventrikuláris Effektív Refrakter Periódus (VERP)* meghatározásánál programozott elektromos ingerlést (PEI) alkalmaztunk. Programozható elektromos stimulátor (ST-02, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) segítségével 12 darab (db), 1,5 milliszekundum (ms) időtartamú, 200 ms ciklushosszú, az ingerküszöb kétszeresének megfelelő amplitúdójú négyszögimpulzussal (S_1) ingereltük a jobb kamrát az implantált *pacemaker* elektródán keresztül. Az ingerlési sorozatok végén 1db programozott stimulust (S_2) alkalmaztunk, amely kapcsolási idejét ingerlési sorozatonként fokozatosan 2 ms-val csökkentettük. Azon programozott stimulus kapcsolási idejét, amelyhez már nem tartozott az EKG-n detektálható kamrai aktivációs jel, VERP-nek tekintettük.

Az *RR távolság* meghatározásánál két, egymást követő R-hullám közötti időtartamot használtuk fel. Az *RR távolságokból* ismert formula alapján határoztuk meg a kísérleti állatok aktuális szívfrekvencia (HR) értékét.

Az *artériás középnyomás (Mean Arterial Blood Pressure /MABP/)* folyamatos monitorizálásához a kísérleti állat fülartériájába (*arteria auricularis*) perkután kanült (*Vasofix Braunüle® G22*, B. Braun Melsungen AG, Németország) helyeztünk. A kanült fiziológias sóoldattal légmentesen feltöltött polietilén infúziós vezetéken (*Original Perfusor®*, B. Braun

Melsungen AG, Melsungen, Németország) keresztül transzducer (Statham P23DB[®], Statham-Gould Ltd., Valley View, OH, Amerikai Egyesült Államok) közbeiktatásával elektromanométer egységhez (EXP-D2, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) csatlakoztattuk.

4.1.4.3. Aritmia indukció

Preklinikai experimentális állatmodellünkben a szívritmuszavarok kiváltásához PEI-t alkalmaztunk. Számos korábbi tanulmány igazolta, hogy egy adott miokardiális régióban rövid kapcsolási idővel leadott elektromos stimulusok azon túl, hogy az ingerlés helyén lévő szívizomsejtek akciós potenciál időtartamait (és ezáltal refrakteritásukat) csökkentik, a régió repolarizációs gradiensének megváltoztatásával annak térbeli diszperzitását is fokozzák (a “modulált-diszperzitás” elmélete).¹⁰⁶ Az utóbbi folyamat nagymértékben elősegíti a ritmuszavarok keletkezését, különösen akkor, ha alapjelenséggént (pl.: gyógyszer vagy kórállapot következményeként) a miokardiális repolarizáció időtartamának transzmurális inhomogenitása (TDR) is fennáll.¹⁰⁷

A PEI során alkalmazott ingerlési sorozatok paraméterei megegyeztek a VERP meghatározásánál alkalmazott beállításokkal, azzal a különbséggel, hogy a 12 db impulzust (S₁) tartalmazó ingerlési sorozat végén nem 1, hanem 2 db programozott stimulust (S₂& S₃) alkalmaztunk. Az első programozott stimulus kapcsolási ideje (S₁–S₂ távolság) a korábban meghatározott VERP időtartamának 110-120%-a volt. A második programozott stimulus kapcsolási idejét (S₂–S₃ távolság) további 10%-val növeltük.

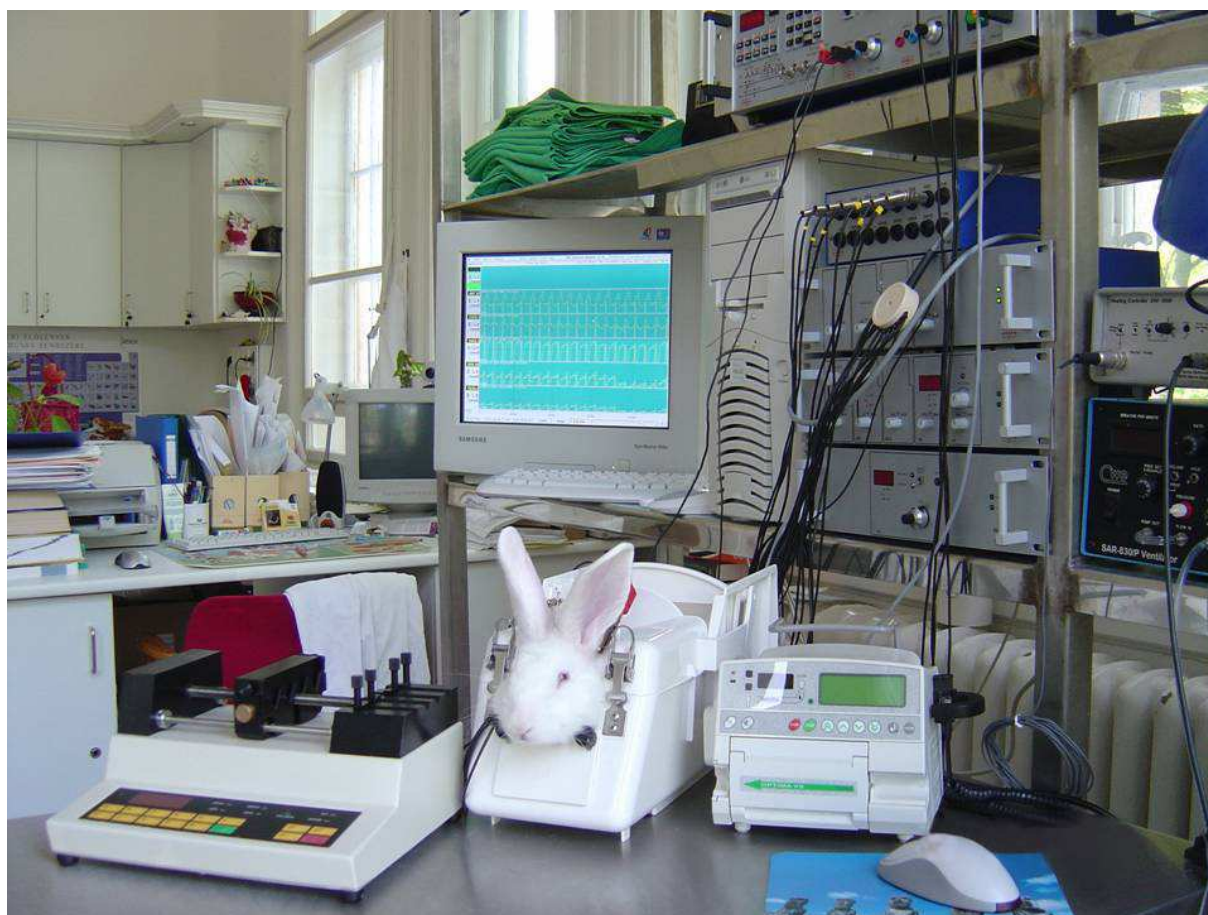
Minden kísérleti állatban adott vizsgálatonként 10 ingerlési sorozatot (12xS₁+S₂+S₃) alkalmaztunk, sorozatonként 40 másodperc (mp) szünetet tartva, amikor a kiváltott aritmiák detektálása történt (obszervációs periódus).

A kísérletsorozat során nyert EKG regisztrátumok kiértékelése során a kiváltott szívritmuszavarokat mennyiségileg és minőségileg is elemeztük, amiből következtettünk az adott állapotok és kezelések pro-, illetve antiaritmiás hatásaira.

Az aritmiák kvantitatív meghatározása során azt vettük alapul, hogy az alkalmazott ingerlési sorozatok (12xS₁+S₂+S₃) 10 epizódjából hány alkalommal sikerült szívritmuszavart kiváltani az adott kísérleti állatban. A két érték hányadosát (kiváltott aritmiák száma/10 epizód ingerlési sorozat) százalékos arányban adtuk meg és „Aritmia incidencia”-ként definiáltuk.

Az aritmiák kvalitatív értékeléséhez a Lambeth-féle konvenciókat alkalmaztuk, tehát a kiváltott szívritmuszavarok típusainak pontos definiálása és osztályozása időtartamuk és EKG morfológiájuk szerint történt.¹⁰⁸ Mindezek alapján megkülönböztettünk kamrai extraszisztolét

(*ventricular premature beat /VPB/*), nem-tartós kamrai tachikardiát (*non-sustained ventricular tachycardia /NSVT/*) és tartós kamrai tachikardiát (*sustained ventricular tachycardia /SVT/*). A *VPB* csoportba azon ritmuszavarokat soroltuk, amelyek kevesebb, mint 4 egymást követő kamrai eredetű extraszisztoléból álltak. *NSVT*-nek tekintettük azon kamrai eredetű tachikardiákat, amelyek 4 vagy annál több ventrikuláris eredetű komponensből tevődtek össze, azonban 15 mp-en belül spontán megszűntek. Az *SVT* csoportba soroltuk azon kamrai tachikardiákat, amelyek időtartama 15 mp-nél hosszabbnak bizonyult. A kamrafibrillációt (*VF*) is *SVT*-nek tekintettük.



3. ábra A tanulmányunkban alkalmazott, pacemaker-elektróddal krónikusan instrumentált, preklinikai állatmodell

4.2. A „Hiperinzulinémia protokoll”

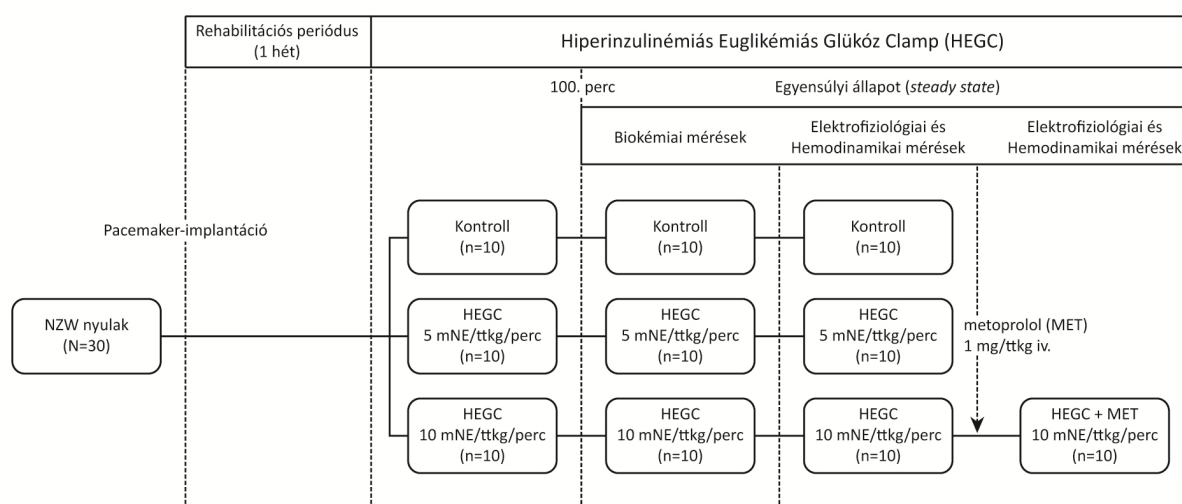
4.2.1. A protokoll sémája

A protokoll kivitelezése során 30 db kísérleti állatot (N=30) használtunk fel. A *pacemaker*-elektród implantáció utáni 1 hetes rehabilitációs periódust követően a kísérleti állatokban mesterségesen hiperinzulinémiás állapotot indukáltunk a *Hiperinzulinémiás*

Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) módszer alkalmazásával. A folyamatos inzulininfúzió koncentrációja alapján az állatokat két kísérleti csoportra osztottuk (n=10), valamint létrehoztunk egy kontrollcsoportot (n=10) is, amely a *HEGC* során kizárólag fiziológiás sóoldatban részesült. Az euglikémiás hiperinzulinémia létrejöttét a kísérlet során nyert vérminták glükóz- és inzulinkoncentrációinak meghatározásával igazoltuk.

Az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterek hiperinzulinémiás állapothoz köthető változását, valamint a szívritmuszavarok kiválthatóságát a *HEGC* egyensúlyi állapotában (*steady state*) vizsgáltuk. A hiperinzulinémiához társuló aritmiák kialakulásáért felelős folyamatok feltérképezése céljából a kísérleti állatokból nyert vérmintákból katecholamin- és káliumkoncentrációt határoztunk meg.

A magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoport állatainál a *HEGC steady state* periódusa során szelektív βR -blokkoló szert (*metoprolol*) alkalmaztunk. A gyógyszeradás fő célja olyan terápiás befolyásolási lehetőség preklinikai tesztelése volt, amely alkalmas a kísérleti modellünkben kiváltott szívritmuszavarok előfordulási gyakoriságának csökkentésére. A szer hatásosságát az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterek, valamint az aritmiák kiválthatóságának változásán keresztül vizsgáltuk és értékeltük. (4. ábra)



4. ábra A „Hiperinzulinémia protokoll” sematikus folyamatábrája

NZW: New Zealand White; HEGC: Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp; *steady state*: a HEGC egyensúlyi állapota; MET: metoprolol

4.2.2. A protokoll részletes ismertetése

4.2.2.1. A hiperinzulinémia indukciója

A vizsgálathoz szükséges emelkedett plazma-inzulinszintet a *HEGC* módszerével biztosítottuk. A módszer egy régóta használt „gold standard” eljárás az inzulinérzékenység preklinikai és klinikai szinten történő megbecslésére, azonban a módszer alkalmazása kísérletsorozatunk ezen szakaszában nem diagnosztikus, hanem kizárólag indukciós célokat szolgált.¹⁰⁹ A módszer lényege, hogy adott koncentrációjú inzulininfúzió folyamatos adagolása következtében fellépő hipoglikémiás állapotot glükóz infundálásával ellensúlyozzuk, a plazma-vércukorszint euglikémiás szinten tartásával. A módszer kivitelezése során az előzőleg 12 órán keresztül éheztetett kísérleti állatok jobb oldali fülvénájába és bal oldali fülartériájába perkután kanült vezetünk. A glükózinfúziót (*GLUKÓZ 20%*[®], TEVA Zrt., Debrecen, Magyarország) és a humán reguláris inzulint (*Humulin R*[®] 100NE/ml, Lilly PLC, Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó oldatot polietilén infúziós vezetéken és 3 kimenetű zárócsapon (*Tro-venoflow 3*[®], Troge Medical, Hamburg, Németország) keresztül csatlakoztattuk a vénás bemenethez. A koncentrált inzulin oldása és hígítása fiziológiás sóoldattal (*Natrium chloratum Teva 0,9%*[®], Teva Zrt., Debrecen, Magyarország) történt. Az inzulin-oldatot folyamatosan, állandó sebességgel, perfúzor (*11 Plus*[®]; Harvard Apparatus, Holliston, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével adagoltuk. Az artériába helyezett perkután kanülon keresztül 10 percnként kb. 0,2 milliliter (ml) vért vettünk vércukorszint-meghatározás céljából. A glükózinfúzió adagolása az aktuális vércukorszint függvényében, dinamikusan, az euglikémiás célértéket (5.5 ± 0.5 mmol/L) szem előtt tartva infúziós pumpa (*Fresenius Vial*[®], Brezins, Franciaország) segítségével történt. Egyensúlyi állapotnak (*steady state*) tekintettük a vércukor-szint több mint 20 percn keresztül euglikémiás szinten való stabilizálódását változatlan glükóz infúziós sebesség mellett. Korábbi tapasztalataink, valamint irodalmi adatok alapján az egyensúlyi állapot az inzulin adagolásának megkezdését követő 100 percn belül alakult ki.^{99,110} Fontos megjegyeznünk, hogy a *HEGC* diagnosztikus céllal való alkalmazásakor a glükózinfúzió egyensúlyi állapotban mért sebességét (*M-érték*, *GINF-érték*) használják az inzulinérzékenység preklinikai és klinikai megbecslésére. Jelen kísérletsorozatban az elektrofiziológiai és hemodinamikai méréseket kizárólag a *HEGC* egyensúlyi állapotban végeztük. Az alkalmazott inzulininfúzió sebességének függvényében két kezelési csoportot alakítottunk ki. Az első csoportba tartozó kísérleti állatok alacsony (5 mNE/ttkg/perc), a második csoportba tartozók magas koncentrációjú (10 mNE/ttkg/perc) folyamatos intravénás

inzulin-adagolásban részesültek. A kontrollcsoport vizsgálata során az inzulin- és glükózinfúzió helyett fiziológiás sóoldatot infundáltunk az alkalmazott infúziókkal megegyező pumpasebességgel.

4.2.2.2. A hiperinzulinémiás állapot igazolása

Az euglikémiás hiperinzulinémia létrejöttét a *HEGC steady state* szakaszában a kísérleti állatok vércukor-, valamint inzulinszintjeinek sorozatos meghatározásával támasztottuk alá.

4.2.2.2.1. Vércukorszint-meghatározás

Az artériás kanülből vett vérmintából *in loco* a klinikai gyakorlatban is alkalmazott vércukormérő-készülék (*Accu-Check Active*[®], *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*, Németország) segítségével állapítottuk meg a kísérleti állatok aktuális vércukorszintjeit. A készülék a vérminta glükózkonzentrációját a *glükóz-dehidrogenázt (GDH)* tartalmazó reagens enzimátikus működése során keletkező elektronok áramlásának detektálásával határozza meg.

4.2.2.2.2. Plazma-inzulinszint meghatározás

Az artériás kanülből a *HEGC steady state* periódusa során három különböző időpontban 2 ml össztérfogatú mintát vettünk az antikoaguláns (40 µl *K₃-EDTA*) tartalmazó vérvételi csövekbe (*Eppendorf*[®], *Eppendorf AG, Hamburg*, Németország). A minták centrifugálása után a vérplazmát az alakos elemektől mikropipetta segítségével elválasztottuk, majd további felhasználás céljából mélyhűtve (-18 °C) tároltuk. A minták inzulintartalmának meghatározásához a *szilárdfázisú immunoradiometrikus assay (IRMA)* módszerét alkalmaztuk. Az *IRMA* módszer során felhasznált készlet (*INZULIN [¹²⁵I] IRMA kit*) az inzulinkonzentráció meghatározáshoz két olyan monoklonális antitestet tartalmaz, amelyek az inzulinmolekula két különböző epitópját ismerik fel. Az egyik antitest jelöletlen (*capture antitest*), a másik radiojóddal (¹²⁵I) jelzett (*signal antitest*). A bevont csöves rendszerek jelen változatában az antigénnek (inzulin) a két antitesttel kialakult immunkomplexe („szendvics”) a reaktív kémcső felületén, mint szilárd fázison kötődik meg. A mintákat a reagensekkel való összemérés és homogenizálás után 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A 2-órás reakcióidőt követően a reakcióelegyet a kémcsövekből kiöntöttük, majd pufferes mosás (0,1 %-os *NaN₃*) után gamma-számlálóval mértük a radioaktivitást. A kémcsövekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő inzulin koncentrációjával. Ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbére extrapoláltuk a mintáink kötési értékeit, majd az adott értékhez tartozó inzulinkonzentrációt (µIU/ml)

leolvastuk. A méréshez alkalmazott készlet 0-500 $\mu\text{IU/ml}$ mérési tartományban képes meghatározni a minták inzulinkoncentrációját. Egy adott kísérleti állat plazma-inzulinszintjét a *HEGC steady state* periódusa során vett három minta inzulintartalmának átlagából számítottuk ki.

4.2.2.3. Elektrofiziológiai és hemodinamikai mérések

Kísérleti protokollunk e szakaszában a hiperinzulinémiás állapot elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterekre, valamint a ritmuszavar-indukálhatóságára gyakorolt hatását vizsgáltuk a 4.1.4 fejezetben leírtak szerint. A kísérleti csoportokban az elektrofiziológiai és hemodinamikai méréseket a *HEGC* egyensúlyi állapotában végeztük. A kontrollcsoport méréseit az inzulininfúziót helyettesítő fiziológiás sóoldat indítását követő 100. percben hajtottuk végre. Az alacsony, illetőleg a magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoportok eredményeit egymással illetve a kontrollcsoportban mért értékekkel hasonlítottuk össze.

A magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10 mNE/ttkg/min) részesülő kísérleti csoport állatainál a *HEGC steady state* periódusának további részében intravénásan 1 mg/ttkg dózisban *metoprolol* injekciót (*Betaloc[®]*, AstraZeneca AB, Sodertalje, Svédország) alkalmaztunk. A szer beadását követően 10 perc múlva végeztük az elektrofiziológiai és hemodinamikai méréseket a 4.1.4 fejezetben leírt módon. A *metoprolol* kezelésben részesülő kísérleti állatok elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereit, valamint aritmia-indukálhatóságát a kontrollcsoportban és a magas koncentrációjú inzulininfúziót kapó kísérleti csoportban mért értékekkel hasonlítottuk össze.

4.2.2.4. Biokémiai mérések

4.2.2.4.1. Katecholamin-szint meghatározás

A hiperinzulinémiás állapothoz társuló szívritmuszavarok hátterében álló lehetséges tényezők feltérképezése céljából meghatároztuk a kísérleti állatok plazma katecholaminszintjét (*adrenalin*, *noradrenalin*). Az artériás kanülből a *HEGC* egyensúlyi állapotában egy alkalommal 5 ml össztérfogatú vérmintát vettünk a speciálisan antikoagulált, hűtött, boroszilikát anyagú vérvételi-csővekbe. A vérminták centrifugálása, valamint a plazma alakos elemektől való elszeparálása után a katecholamin-szintet *HPLC* technikával (*Abl&E-Jasco HPLC[®]*, JASCO Corporation, Tokió, Japán), speciális készlet alkalmazásával (*p-Catecholamines kit*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Németország) határoztuk meg.

4.2.2.4.2. *Kálium-szint meghatározás*

Az artériás kanülből a *HEGC steady state* periódusában egy alkalommal 5 ml össztérfogatú mintát vettünk natív vérvételi csövekbebe (*BD-Vacutainer®*, *Plymouth*, Egyesült Királyság). A vérminták centrifugálását, valamint a plazma alakos elemektől való elválasztását követően a minták káliumtartalmát a humán klinikumban is használt *direkt ionszelektív elektród (ISE)* módszer alkalmazásával határoztuk meg.

4.3. A „*Metabolikus szindróma protokoll*”

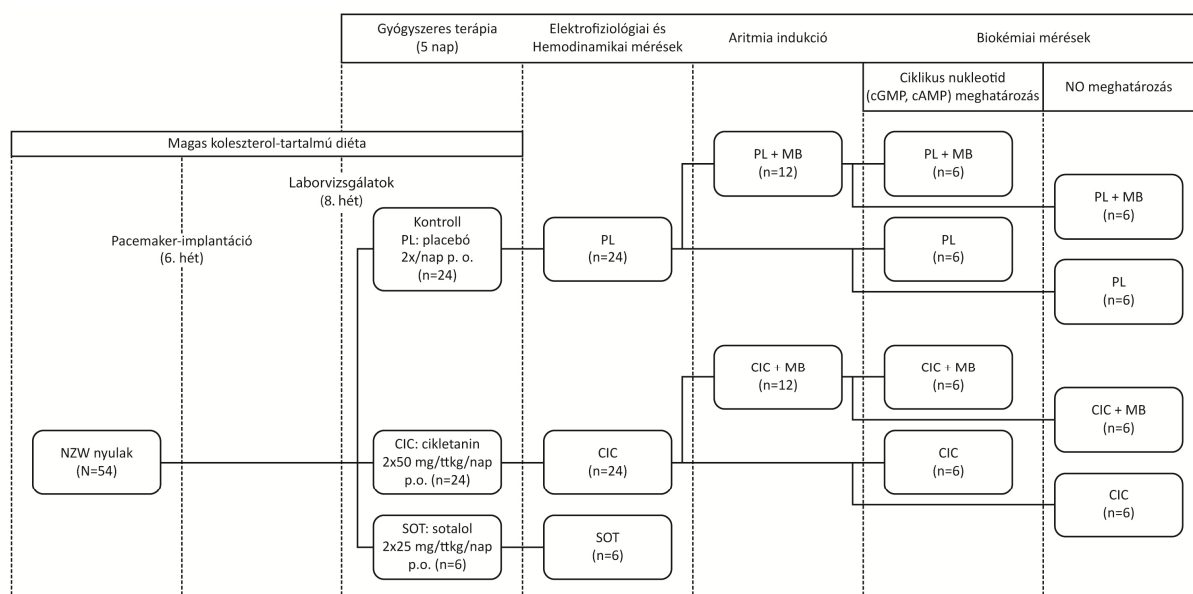
4.3.1. *A protokoll sémája*

A protokoll megvalósítása során 54 db kísérleti állatot (N=54) használtunk fel. A kísérleti állatokban 8 hét alatt mesterségesen metabolikus szindrómát indukáltunk 1,5% koleszterintartalmú táp etetésével. A metabolikus szindróma létrejöttét a kísérleti állatok labor, metabolikus és hemodinamikai paramétereinek változása alapján igazoltuk.

Ezt követően az állatokat az alkalmazott gyógyszeres terápia alapján 3 kísérleti csoportra osztottuk. Az első csoportba tartozó állatok (n=24) placebót (üres zselatin kapszula) kaptak, azokat kontrollnak tekintettük. Az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterek valamint a szívritmuszavarok kiválthatóságának metabolikus szindrómához köthető változását a kontrollcsoporton teszteltük és a „*Hiperinzulinémia protokoll*” kontrollcsoportjába tartozó kísérleti állatok (egészséges állatok) hasonló paramétereivel hasonlítottuk össze. A kontrollcsoport vizsgálata során kapott eredmények további viszonyítási alapként szolgáltak a jelen protokollban alkalmazott gyógyszeres terápiák hatékonyságának megítélésében. A gyógyszeradás fő célja olyan terápiás lehetőség preklinikai tesztelése volt, amely alkalmas a metabolikus szindrómás kísérleti modellünkben kiváltott szívritmuszavarok előfordulási gyakoriságának csökkentésére, így a második kísérleti csoportba tartozó állatok (n=24) *cikletanint* (*cicletanine*, *Tenstaten®*, *Beafour Ipsen Pharma*, Franciaország) kaptak. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai már rávilágítottak a *cikletanin*, mint generikus antihipertenzív szer számos kedvező farmakodinámiás tulajdonságára (inzulinérzékenyítő, anti-iszkémiás hatás).^{99,111} A *cikletanin* dózisát a humán klinikumban alkalmazott vérnyomáscsökkentő és inzulinérzékenyítő adagja alapján határoztuk meg, tehát a kísérleti állatok azt napi 2 alkalommal 50 mg/ttkg dózisban kapták.¹¹² A harmadik kísérleti csoportba tartozó állatokat (n=12) egy ismert antiaritmiás szerrel (*sotalol*, *Sotalex Mite®*, *Brystol-Myers Squibb Ltd.*, Egyesült Királyság) kezeltük napi 2 alkalommal 25 mg/ttkg dózisban és kísérleti protokollunkban referenciaként szerepeltek. A *sotalol* dózisát a humán klinikumban

alkalmazott antiaritmiás adagja alapján számítottuk ki.¹¹³ A gyógyszeres kezelés minden kísérleti csoportnál szájon keresztül, gyomorszonda segítségével történt és 5 napig tartott. A szerek hatékonyságát az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterek, valamint a szívritmuszavarok kiválthatóságának változásán keresztül vizsgáltuk és értékeltük.

A metabolikus szindróma-hoz társuló aritmiák kialakulásában feltehetőleg szereppel bíró mechanizmusok identifikálása valamint az alkalmazott gyógyszeres terápia (*cikletanin*) pontos hatásmechanizmusának feltérképezése céljából a placebo és a *cikletanin* terápiában részesülő kísérleti állatok egy-egy alcsoportjának (n=12) közvetlenül az elektrofiziológiai és hemodinamikai mérések előtt 10 mg/ttkg metilénkék (*methylene-blue /MB/*) adtunk intravénásan. Továbbá a kontroll, valamint a *cikletanin* kezelésben részesülő kísérleti állatokból nyert miokardium mintákból *ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát (cGMP)*, *ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát (cAMP)*, és *nitrogén-monoxid (NO)* szintet határoztunk meg. (5. ábra)



5. ábra A „Metabolikus szindróma protokoll” sematikus folyamatábrája

NZW: New Zealand White; PL: placebo; CIC: cikletanin; SOT: sotalol; PL+MB: placebo + metilénkék (10mg/ttkg, i.v.); CIC + MB: cikletanin + metilénkék (10mg/ttkg, i.v.); cGMP: ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát; cAMP: ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát; NO: nitrogén-monoxid

4.3.2. A protokoll részletes ismertetése

4.3.2.1. A metabolikus szindróma indukciója

Az experimentális modellünkben a metabolikus szindróma létrehozásához alimentáris módszert alkalmaztuk. A kísérleti állatok 8 hétig *ad libitum* magas koleszterol-tartalmú diétában (Bioplan Kft., Isaszeg, Magyarország) részesültek, ami az összetevők tömegszázalékos aránya alapján a következő komponensekből állt: 2,6 % nyers zsír; 1,5 % koleszterol; 16,0 % nyers fehérje; 48,0 % nitrogénmentes kivonat; 7,0 % nyers hamu; 11,0 % növényi rost; 12 % víz; 1,91 % hozzáadott ásványi anyag; vitaminok és nyomelemek.

4.3.2.2. A metabolikus szindróma igazolása

Az alimentáris módszerünk hatékonyságának vizsgálata a kísérleti állatok diéta előtti és utáni laborértékeinek, metabolikus és hemodinamikai paramétereinek összehasonlítása alapján történt.

4.3.2.3. Elektrofiziológiai és hemodinamikai mérések

Kísérleti protokollunk e szakaszában a metabolikus szindróma lehetséges szerepét vizsgáltuk a szívritmuszavarok kialakulásában, továbbá olyan terápiás befolyásolási lehetőséget teszteltünk preklinikailag, amely alkalmas lehet a kísérleti modellünkben kiváltott szívritmuszavarok előfordulási gyakoriságának csökkentésére. Az elektrofiziológiai és hemodinamikai méréseket mindhárom kezelési csoportban az utolsó gyógyszerdózis adását követően 2 óra múlva a 4.1.4 fejezetben leírt módon végeztük. A metabolikus szindróma tüneteit manifesztáló kontrollcsoport elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereit, valamint az aritmia-indukálhatóságot a „*Hiperinzulinémia protokoll*” kontrollcsoportjában (egészséges állatok) mért értékekkel hasonlítottuk össze a metabolikus szindrómás állapot kardiális aritmogenezisre gyakorolt hatásainak megállapítása céljából.

Az alkalmazott gyógyszeres terápia (*cikletanin*) hatékonyságának megítéléséhez a *cikletanin* terápiában részesülő csoportban mért elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereit, valamint a ritmuszavar-indukálhatóságot a kontrollcsoport, illetve a referenciaszert (*sotalol*) kapó csoport értékeivel hasonlítottuk össze.

A *cikletanin* jelen kórállapotra gyakorolt terápiás hatásának pontosabb megismerése céljából a kontroll és *cikletanin* kezelést kapó kísérleti állatok egy-egy frakcióját (n=12) a ritmuszavar-indukálhatóság mérése előtt közvetlenül egyszeri 10 mg/ttkg intravénás *MB* kezelésben részesítettük. A *MB szolubilis guanilát ciklázra* (sGC), valamint a konstitutív és indukálható *nitrogén-monoxid szintázra* (NOS) gyakorolt gátló hatása régóta ismert.^{114,115} A ritmuszavarok kiválthatóságát ezutóbbi csoportokban is a 4.1.4 fejezetben ismertetett módon végeztük. A

mérés során kapott eredményeket (*Aritmia incidencia*) a kontrollcsoport, valamint a referenciaszert (*sotalol*) kapó csoport értékeivel hasonlítottuk össze.

4.3.2.4. Biokémiai mérések

A metabolikus szindrómához társuló szívritmuszavarok hátterében álló lehetséges folyamatok feltérképezése, valamint az alkalmazott gyógyszeres terápia hatásmechanizmusának pontosabb megismerése céljából a kontroll és *cikletanin* kezelésben részesülő kísérleti állatokból valamint az intravénásan *MB*-t kapó alcsoportjaikból vett miokardium mintákból ciklikus nukleotid (*cGMP*, *cAMP*) és *NO* koncentrációt határoztunk meg. A mintavétel az elektrofiziológiai és hemodinamikai mérések befejezése után történt. A mintavételhez a kísérleti állatok jobb oldali fülvénájába vezetett perkután kanülön keresztül, intravénásan 10mg/ttkg *diazepam*-val (*Seduxen*[®], Richter Gedeon Zrt., Budapest, Magyarország) és 5mg/ttkg *ketamin*-val (*Calypsol*[®], EGIS Nyrt., Budapest, Magyarország) teljes anesztetikus állapotot indukáltunk. Az altatás fenntartását az állatok légcsövébe helyezett endotracheális tubuson (*Ruschelit*[®] PVC, Rüschi PLC, GA, Duluth) keresztül kisállat respirátor és vaporizátor (*TSE Systems GmbH, Bad Homburg*, Németország) segítségével alkalmazott *izofluránnal* (*Forane*, Abbott Laboratories, Berkshire, Egyesült Királyság) biztosítottuk a megfelelő lélegeztetési beállításokkal (AK: 1,5%, LT: 20 ml, LF: 50/min).

4.3.2.4.1. Ciklikus nukleotid (*cGMP*, *cAMP*) meghatározás

A teljes anesztéziában részesülő kísérleti állatok mellkasát a középvonal mentén megnyitottuk, majd a perikardium átmetszése után a bal kamra csúcsi miokardiális részét eltávolítottuk. A kimetszett mintát 5 másodpercen belül cseppfolyós halmazállapotú nitrogénbe helyeztük, majd további felhasználás céljából mélyhűtve (-80 °C) tároltuk.¹¹⁶ A minták ciklikus nukleotid (*cGMP*, *cAMP*) tartalmának meghatározásához a *radioimmunoassay* (*RIA*) módszerét alkalmaztuk. A minták előkészítése (homogenizálás, centrifugálás, átmosás, liofilizálás) után azokat a reagensekkel összemértük és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A *RIA* módszer elve a minta jelöletlen *cGMP* és *cAMP* tartalma valamint az alkalmazott készletben (*cGMP* [¹²⁵I]-*RIA* kit és *cAMP* [¹²⁵I]-*RIA* kit, Izotópintézet, Budapest, Magyarország) fix mennyiségben lévő ¹²⁵I-*cGMP* és ¹²⁵I-*cAMP* (radioaktív ligand) közötti az ugyancsak a készletben, szintén fix mennyiségben lévő *cGMP*-t és *cAMP*-t specifikusan megkötni képes antitest kötőhelyeiért való kompetíción alapszik. A radioaktív ligand és a *cGMP*-t és *cAMP*-t specifikus kötő antitest által alkotott komplex mennyisége fordítottan

arányos tehát a minta *cGMP* és *cAMP* tartalmával. A radioaktív ligand és a *cGMP*-t és *cAMP*-t specifikusan kötő antitest komplex mennyiségének kimutatásához egy második, a komplexhez specifikusan kötődő, mágneses polimer részecskéket is tartalmazó antitestet alkalmaztunk. Mindezek után a radioaktív ligand-antitest komplexet centrifugálással elszeparáltuk majd pufferes mosás (0,05 M acetát-puffer, pH: 5,8) után gamma-számlálóval mértük a radioaktivitást. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbére extrapoláltuk az adott minták kötési értékeit, majd az adott értékhez tartozó *cGMP* és *cAMP* koncentrációt (pmol/mg x ww) leolvastuk.

4.3.2.4.2. NO meghatározás

A miokardiális NO tartalmat az *elektronspin-rezonancia spektroszkópia* (ESR) módszerével határoztuk meg. A módszer lényege, hogy párosítatlan elektronokat tartalmazó biológiai molekulák (pl.: NO) elektronspinje külső mágneses tér hatására a mágneses tér irányához képest diszkrét (kvantált) orientációt vesz fel. A spinorientáció megváltozásához szükséges energiaelnyelés (vagy kibocsátás) detektálásával következtethetünk a mintában lévő biológiai molekula koncentrációjára. A módszer kivitelezésének első lépéseként a teljes anesztéziában részesülő kísérleti állatoknak 200 mg/ttkg *dietil-dithio-karbamátot* (DETC), 50 mg/ttkg *vas-szulfátot* (FeSO_4) és 200 mg/ttkg *nátrium citrátot* adtunk intravénásan. A képződő Fe^{2+} -(DETC)₃ komplex nagy affinitást mutat a NO iránt, mintegy csapdába ejti azt, aminek eredményeként NO- Fe^{2+} -(DETC)₂ komplex képződik. A komplex erős mágneses térben mutatott abszorpciós spektruma arányos a minta NO tartalmával.

A szerek beadását követően 5 perc múlva a kísérleti állatok mellkasát a középvonal mentén megnyitottuk, majd a perikardium átmetszése után a szívet a nagyerek proximális részével együtt eltávolítottuk. A *Langendorff* módszer szerinti retrográd perfúziós technikával a szívet fiziológiás sóoldattal átmostuk, majd 100 mg tömegű szövetdarabot vágunk ki a bal kamra csúcsi részéből, amit 5 másodpercen belül folyékony halmazállapotú nitrogént tartalmazó boroszilikát csőbe helyeztünk, majd további felhasználás céljából mélyhűtve (-80 °C) tároltunk. A mérés során a minták előkészítettük (homogenizálás, centrifugálás, átmosás, liofilizálás), majd ESR abszorpciós spektrumukat 34 GHz frekvenciájú sugárforrást alkalmazó, 160 K-en működő *Bruker ECS106* spektrométer (*Rheinstetten*, Németország) segítségével határoztuk meg. Az ESR-val detektáltjel intenzitásából adott matematikai formula alapján számítottuk ki a minták NO tartalmát. Az alkalmazott ESR apparátus NO-kimutatási alsó határa 0,05 nmol/g x ww.

4.4. Statisztikai analízis

A kísérletsorozatok során nyert eredményeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. Az eredmények statisztikai értékelését *SPSS* szoftver segítségével végeztük. A metabolikus-, hemodinamikai-, elektrofiziológiai- és laborparaméterek statisztikai értékeléséhez egyszempontos varianciaanalízist (*One-Way ANOVA*) alkalmaztunk, amit *Bonferroni*-féle *post hoc* módosítással egészítettünk ki. Az aritmiák előfordulási gyakoriságának (*Aritmia incidencia*) statisztikai analízisét *Fisher*-féle egzakt próbával (*Fisher's exact test*) végeztük. A ciklikus nukleotid (*cGMP*, *cAMP*), valamint a *NO* szintek statisztikai értékeléséhez *Kruskal-Wallis* tesztet alkalmaztunk, amit *Dunn*-féle *post hoc* módosítással egészítettünk ki. Az átlagértékek különbségeit $p < 0,05$ -nél tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A „Hiperinzulinémia protokoll” eredményei

5.1.1. A hiperinzulinémiás állapot igazolása

A HEGC egyensúlyi állapotában mindhárom kezelési csoport vércukorértékei tartósan euglikémiás szinten maradtak. A plazma-inzulinszint mind az alacsony (5 mNE/ttkg/perc) mind a magas koncentrációjú (10 mNE/ttkg/perc) inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoportban szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoport értékeihez képest. További szignifikáns növekedés igazolódott a magas koncentrációjú inzulininfúziót kapó kísérleti állatok plazma-inzulinszintjeinek az alacsony koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő csoport értékeivel való összehasonlítása során. (1. táblázat)

	Kontroll	HEGC (5 mNE/ttkg/perc)	HEGC (10 mNE/ttkg/perc)
Vércukor (mmol/l)	6,1 ± 0,4	5,9 ± 0,3	6,0 ± 0,3
Plazma inzulin (μU/ml)	18,1 ± 4,4	35 ± 4,3*	103 ± 7,5* [#]

1. táblázat A Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) hatása a kísérleti csoportok vércukor- és plazma-inzulinszintjeire a steady state periódus alatt

Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

n=10 állat/kísérleti csoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollcsoportban mért értékekhez képest.

A kettős kereszt (#) szignifikáns különbséget jelöl az alacsony koncentrációjú inzulininfúzióban (5mNE/ttkg/perc) részesülő csoportban mért értékekhez képest.

p<0,05

5.1.2. A hiperinzulinémiás állapot hatása az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterekre, valamint a szívritmuszavarok kiválthatóságára

A QT idő, a QT_c és a T_p-T_e szignifikáns növekedést mutatott a HEGC steady state periódusa során az alacsony és a magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő csoportok állatainál egyaránt, a kontrollcsoport értékeihez viszonyítva. Jelentős mértékű csökkenés volt megfigyelhető a QT_p és a VERP tekintetében mind az alacsony, mind a magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoport állatainál a kontrollcsoportban mért értékekhez képest.

A HR szignifikánsan emelkedett a magas koncentrációjú inzulininfúziót kapó kísérleti csoport állatainál a HEGC egyensúlyi állapota alatt. A MABP értékeinél nem tapasztaltunk jelentős változást egyik kísérleti csoportban sem. (2. táblázat)

A kísérleti csoportokban PEI-vel VPB-t és NSVT-t sikerült kiváltanunk. SVT-t egyik experimentális csoport állatában sem sikerült indukálnunk a PEI során alkalmazott ingerlési beállításokkal. A VPB és NSVT előfordulási gyakorisága jelentősen megemelkedett az alacsony és magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoportok állataiban a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. További szignifikáns növekedés igazolódott a magas koncentrációjú inzulininfúziót kapó kísérleti állatok VPB és NSVT incidenciáinak tekintetében az alacsony koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő csoport értékeivel való összehasonlítás során. (6.a. ábra)

A VPB kategórián belül szoliter, valamint kapcsolt monomorf kamrai extraszisztolét figyeltünk meg. Az NSVT kategóriába sorolt szívritmuszavarok közül kamrai tachikardiát és *torsade de pointes* (TdP) típusú kamrai tachikardiát (mindkettő 15 mp-en belül spontán megszűnt) sikerült kiváltanunk. (6.b. ábra)

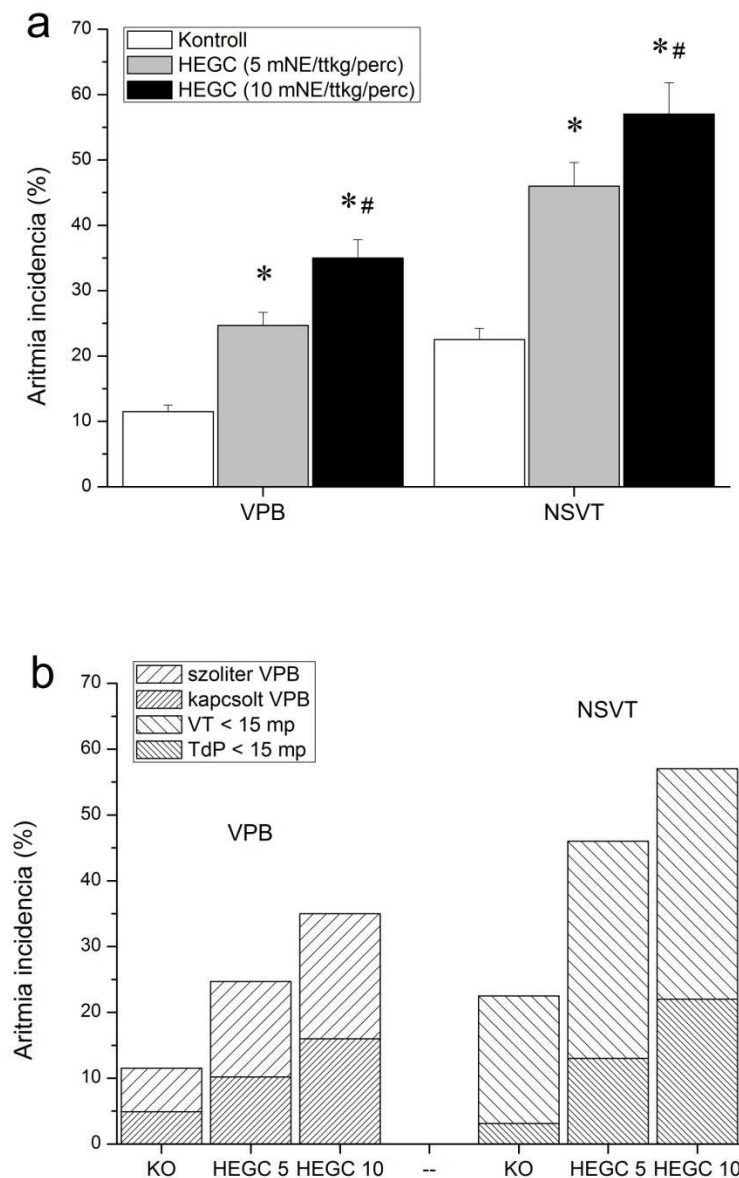
A szívritmuszavarok előfordulási gyakorisága a kísérleti állatok plazma-inzulinszintjével koncentráció-függő módon változott. (6. ábra, 1. táblázat)

	Kontroll	HEGC (5 mNE/ttkg/perc)	HEGC (10 mNE/ttkg/perc)
QT (ms)	174 ± 7	187 ± 5*	195 ± 6,1*
QT _c	308 ± 13	349 ± 14*	377 ± 15*
T _p -T _e (ms)	49 ± 9	69 ± 12*	81 ± 11*
QT _p (ms)	125,5 ± 4	118 ± 4,3*	114 ± 2,3*
VERP (ms)	110 ± 3,7	104,8 ± 2,9*	101,4 ± 1,7*
HR (1/min)	227,5 ± 37,5	237 ± 53	247 ± 33*
MABP (Hgmm)	76,9 ± 10,8	73,1 ± 10,2	72 ± 9

2. táblázat A Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) hatása a kísérleti csoportok elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereire a steady state periódus alatt
Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

n=10 állat/kísérleti csoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollcsoportban mért értékekhez képest.
p<0,05



6. ábra A Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) hatása a kísérleti csoportok programozott elektromos ingerléssel (PEI) kiváltott szívritmuszavarainak előfordulási gyakoriságára (Aritmia incidencia) (**6.a.**), valamint a szívritmuszavarok Lambeth-konvenciók alapján osztályozott típusainak megoszlására (**6.b.**)

Az adatok százalékos arányban átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

$n=10$ állat/kísérleti csoport

A csillag (*) szignifikáns különbséget jelöl a kontrollcsoportban mért értékekhez képest.

A kettős kereszt (#) szignifikáns különbséget jelöl az alacsony koncentrációjú inzulininfúzióban (5mNE/ttkg/perc) részesülő csoportban mért értékekhez képest.

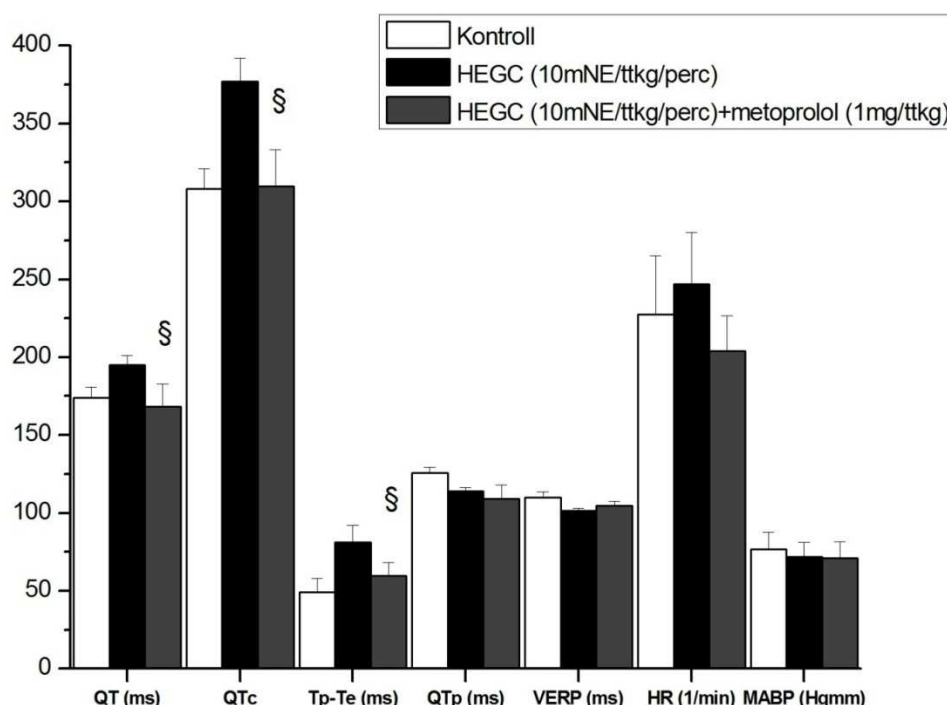
$p<0,05$

VPB: kamrai extraszisztolé, NSVT: nem-tartós kamrai tachikardia; szoliter VPB: szoliter kamrai extraszisztolé; kapcsolt VPB: kapcsolt kamrai extraszisztolé; VT<15 mp: 15 másodpercen belül belül spontán megszűnő kamrai tachikardia; TdP<15 mp: 15 másodpercen belül belül spontán megszűnő torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP)

5.1.3. A metoprolol, mint terápiás opció hatása hiperinzulinémiában

A magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoport állatainál a HEGC egyensúlyi állapotában az 1 mg/ttkg dózisban, intravénásan alkalmazott metoprolol a QT időt, a QT_c -t és a T_p - T_e -t szignifikánsan csökkentette a hiperinzulinémia steady state periódusában mért értékekhez képest. (7. ábra, 8. ábra)

Jelentős csökkenés volt megfigyelhető metoprolol hatására a PEI-vel kiváltott aritmiák előfordulási gyakoriságának tekintetében, mind a VPB, mind az NSVT típusú szívritmuszavarok esetén. (9. ábra)



7. ábra A metoprolol (1mg/ttkg, iv.) hatása a magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10mNE/ttkg/perc) részesülő kísérleti csoport elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereire a Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) steady state periódusa alatt

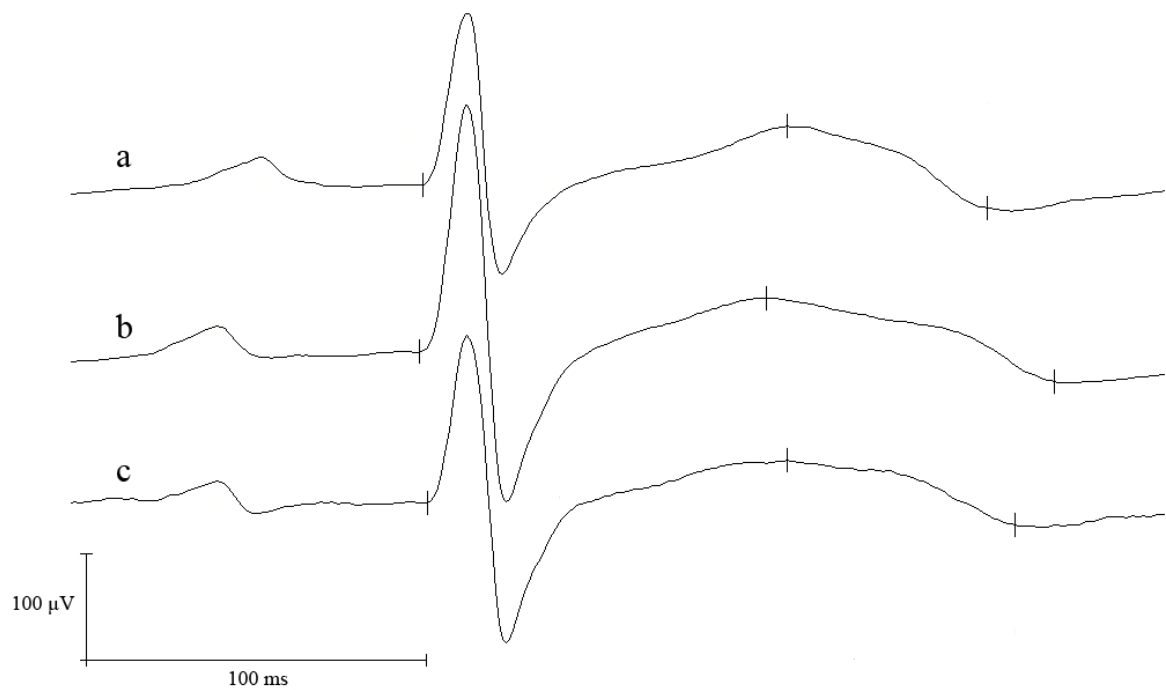
Szemléltetés céljából a kontrollcsoport elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereinek HEGC steady state periódusa során mért értékeit is megjelenítettük.

Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

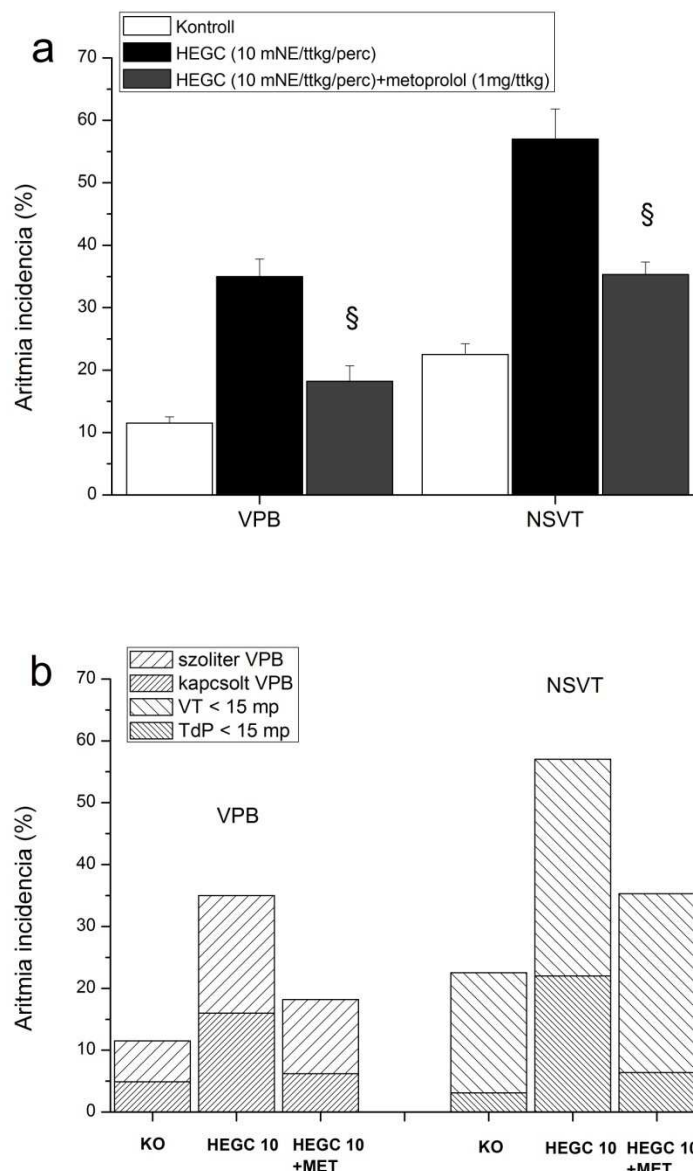
n=10 állat/kísérleti csoport

A paragrafus-jelek (§) szignifikáns különbséget jelölnek a magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10mNE/ttkg/perc) részesülő kísérleti csoportban mért értékekhez képest.

p<0,05



8.ábra A kontroll (8.a.), a HEGC (10mNE/ttkg/perc) (8.b.), illetve a HEGC (10mNE/ttkg/perc) és metoprolol (1mg/ttkg, iv.) (8.c.) hatása a preklinikai modell elektrofiziológiai paramétereire. A képen a kísérleti csoportok egy-egy állatának prekordiális elvezetésből (V_3) nyert, integrált EKG görbéi láthatók. A regisztráció a HEGC egyensúlyi állapota (steady state) során történt. A markerek Q-hullámot, a T-hullám csúcsát (T_p) és a T-hullám végét (T_e) jelzik.



9. ábra A metoprolol (1mg/ttkg, iv.) hatása a magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10mNE/ttkg/perc) részesülő kísérleti csoport programozott elektromos ingerléssel (PEI) kiváltott szívritmuszavarainak előfordulási gyakoriságára (Aritmia incidencia) (9.a.), valamint a szívritmuszavarok Lambeth-konvenciók alapján osztályozott típusainak megoszlására (9.b.) a Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) steady state periódusa alatt

Az adatok százalékos arányban átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

n=10 állat/kísérleti csoport

A paragrafus-jelek (§) szignifikáns különbséget jelölnek a magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10mNE/ttkg/perc) részesülő kísérleti csoportban mért értékekhez képest.

$p < 0,05$

Szemléltetés céljából a kontrollcsoportban mért értékeket is megjelenítettük.

VPB: kamrai extraszisztolé, NSVT: nem-tartós kamrai tachikardia; szoliter VPB: szoliter kamrai extraszisztolé; kapcsolt VPB: kapcsolt kamrai extraszisztolé; VT<15 mp: 15

másodpercen belül spontán megszűnő kamrai tachikardia; TdP<15 mp: 15 másodpercen belül spontán megszűnő torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP)

5.1.4. Biokémiai mérések

A plazma-katecholaminszintek tekintetében az *adrenalin* koncentrációja csökkenést, a *noradrenaliné* emelkedést mutatott az alacsony és magas koncentrációjú inzulininfúzióban részesülő kísérleti csoport állataiban a *HEGC steady state* periódusa során a kontroll csoportban mért értékekhez képest, azonban ezen változások egyike sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. (3. táblázat)

Kismértékű csökkenést tapasztaltunk a két különböző koncentrációjú inzulininfúziót kapó kísérleti csoport állatainak a *HEGC* egyensúlyi állapota során mért plazma káliumszintjeiben a kontrollcsoport értékeivel való összehasonlítás során, azonban ez a változás sem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. (3. táblázat)

	Kontroll	HEGC (5 mNE/ttkg/perc)	HEGC (10 mNE/kg/perc)
Adrenalin (nmol/l)	0,48 ± 0,05	0,46 ± 0,02	0,41 ± 0,05
Noradrenalin (nmol/l)	0,39 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,43 ± 0,04
Kálium (mmol/l)	4,07 ± 0,2	3,94 ± 0,3	3,89 ± 0,3

3. táblázat A Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC) hatása a kísérleti csoportok plazma-katecholamin (adrenalin, noradrenalin) és –kálium szintjeire a steady state periódus alatt

Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

n=10 állat/kísérleti csoport

p<0,05

5.2. A „Metabolikus szindróma protokoll” eredményei

5.2.1. A metabolikus szindróma hatása az elektrofiziológiai és hemodinamikai paraméterekre, valamint a ritmuszavar-kiválthatóságra

A QT idő, a QT_c , a QT_p és a VERP értékek tekintetében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a metabolikus szindrómás kontrollcsoportban a „Hiperinzulinémia protokoll” kontroll állatainak (egészséges állatok) hasonló paramétereivel való összehasonlítása során. A T_p - T_e is csökkent a metabolikus szindróma tüneteit manifesztáló kísérleti csoport állataiban, azonban ez a változás a statisztikailag szignifikáns szintet nem érte el.

A metabolikus szindrómás kísérleti állatok nyugalmi HR értékeiben emelkedést tapasztaltunk, ez a növekedés szintén nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A MABP értéke jelentősen növekedett a metabolikus szindrómás kísérleti csoportban a „Hiperinzulinémia protokoll” kontroll állatainak hasonló paraméteréhez képest. (4. táblázat)

A metabolikus szindróma kontrollcsoportjának állataiban VPB-t, NSVT-t és SVT-t sikerült kiváltanunk a PEI során alkalmazott ingerlési beállításokkal. A VPB és NSVT előfordulási gyakorisága jelentősen megemelkedett a metabolikus szindrómás kísérleti csoport állataiban a „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoportjának hasonló értékeivel való összehasonlítása során. (10.a. ábra)

A VPB kategórián belül a metabolikus szindrómás állatokban szoliter és kapcsolt monomorf kamrai extraszisztolét figyeltünk meg. A NSVT kategóriába sorolt szívritmuszavarok közül kamrai tachikardiát és *torsade de pointes* típusú kamrai tachikardiát (mindkettő 15 mp-en belül spontán megszűnt) sikerült kiváltanunk. A SVT osztályba sorolt aritmiák közül kamrai tachikardiát (VT) és *torsade de pointes* (TdP) típusú kamrai tachikardiát (mindkettő 15 mp-nél hosszabb ideig tartott), valamint kamrafibrillációt (VF) tudtunk indukálni a metabolikus szindrómás állatokban a PEI során használt ingerlési beállításokkal. (10.b. ábra, 11. ábra)

	HI-KO	MS-KO
QT (ms)	174 ± 7	140,4 ± 10,1*
QT _c	308 ± 13	288,4 ± 23,22*
T _p -T _e (ms)	49 ± 9	39,6 ± 5,14
QT _p (ms)	125,5 ± 4	100,8 ± 7*
VERP (ms)	110 ± 3,7	100,2 ± 1,24*
HR (1/min)	227,5 ± 37,5	253 ± 17,1
MABP (Hgmm)	76,9 ± 10,8	105,1 ± 3,6*

4. táblázat A metabolikus szindrómás állapot hatása a kísérleti állatok elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereire

Összehasonlítási alapként a „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoportjában (egészséges állatok) mért értékeket használtuk fel.

Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

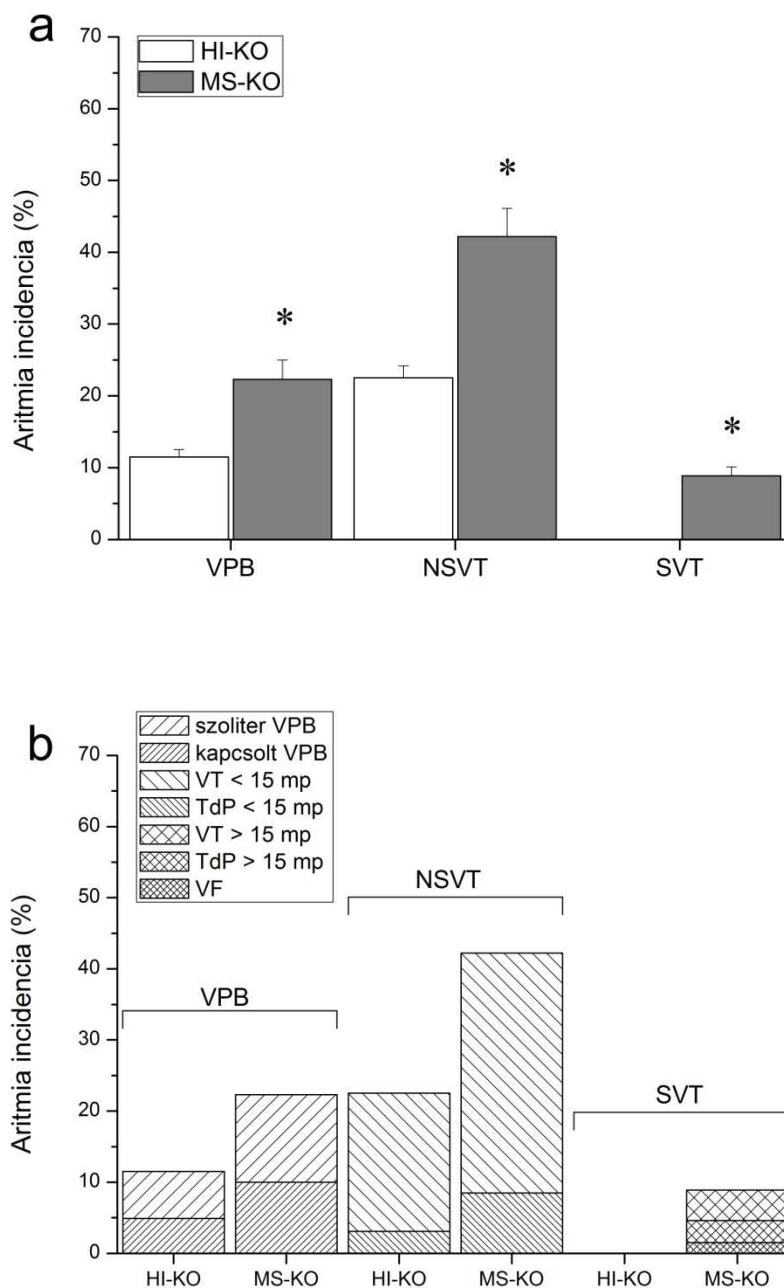
n=10 állat/„Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoport

n=24 állat/„Metabolikus szindróma protokoll” kontrollcsoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoportjában mért értékekhez képest.

p<0,05

HI-KO: „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoport; MS-KO: „Metabolikus szindróma protokoll” kontrollcsoport



10. ábra A metabolikus szindrómás állapot hatása a kísérleti állatok programozott elektromos ingerléssel (PEI) kiváltott szívritmuszavarainak előfordulási gyakoriságára (Aritmia incidencia) (10.a.), valamint a szívritmuszavarok Lambeth-konvenciók alapján osztályozott típusainak megoszlására (10.b.)

Összehasonlítási alapként a „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoportjában (egészséges állatok) mért értékeket használtuk fel.

Az adatok százalékos arányban átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

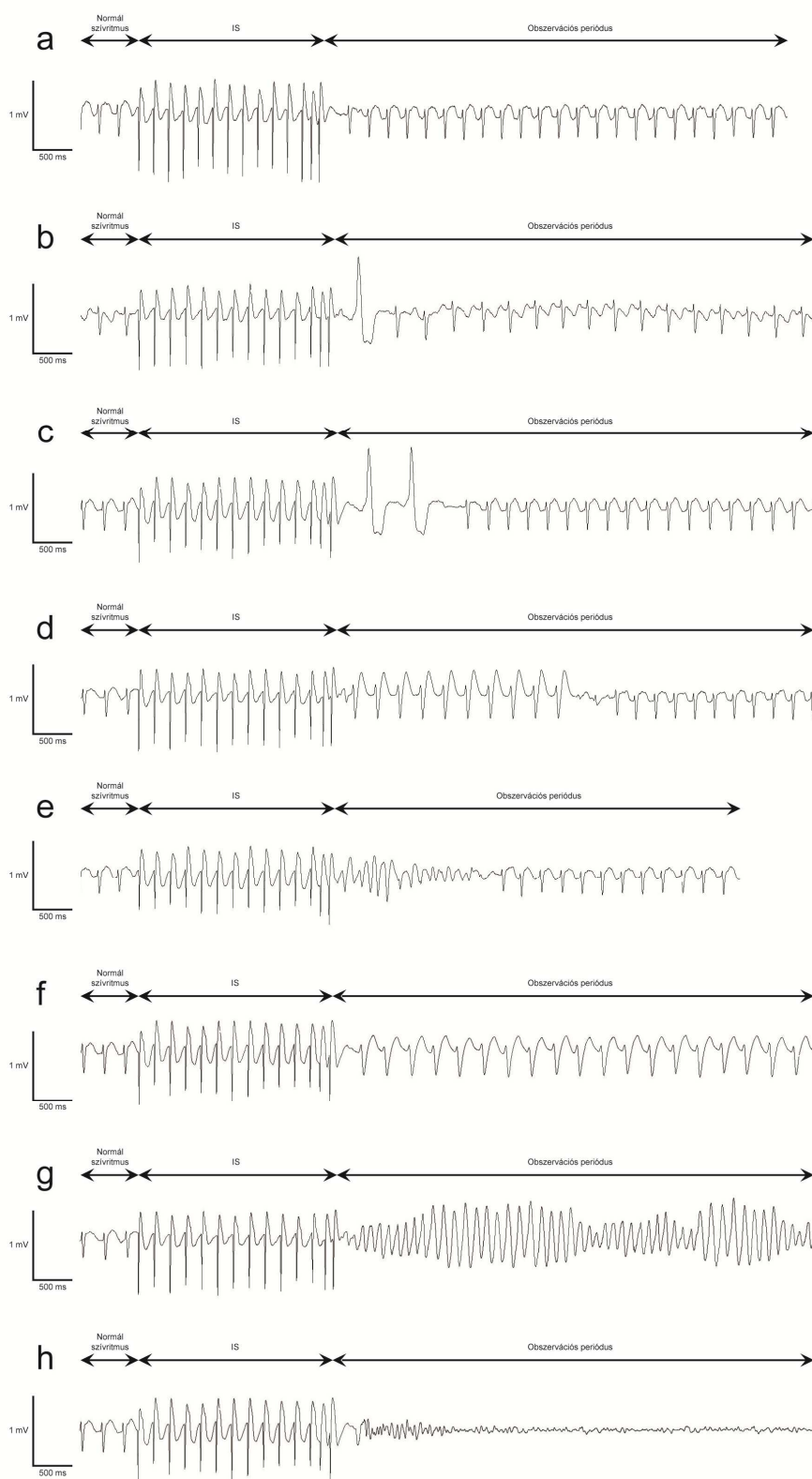
n=10 állat/„Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoport

n=24 állat/„Metabolikus szindróma protokoll” kontrollcsoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoportjában mért értékekhez képest.

$p < 0,05$

HI-KO: „Hiperinzulinémia protokoll” kontrollcsoport; MS-KO: „Metabolikus szindróma protokoll” kontrollcsoport; VPB: kamrai extraszisztolé, NSVT: nem-tartós kamrai tachikardia; SVT: tartós kamrai tachikardia; szoliter VPB: szoliter kamrai extraszisztolé; kapcsolt VPB: kapcsolt kamrai extraszisztolé; VT<15 mp: 15 másodpercen belül spontán megszűnő kamrai tachikardia; TdP<15 mp: 15 másodpercen belül spontán megszűnő torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP); VT>15 mp: 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó kamrai tachikardia; TdP>15 mp: 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP)



11. ábra A programozott elektromos ingerlés (PEI) lehetséges kimenetelei a „Hiperinzulinémia protokoll”-ban (11.a-11.e.) és a „Metabolikus szindróma protokoll”-ban (11.a.-11.h.)

Normál szinusz ritmus (11.a.); szoliter kamrai extraszisztolé (11.b.); kapcsolt monomorf kamrai extraszisztolé (11.c.); 15 másodpercen belül spontán megszűnő kamrai tachikardia (11.d.); 15 másodpercen belül spontán megszűnő torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP) (11.e.); 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó kamrai tachikardia (11.f.); 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP) (11.g.); kamrafibrilláció (11.h.)

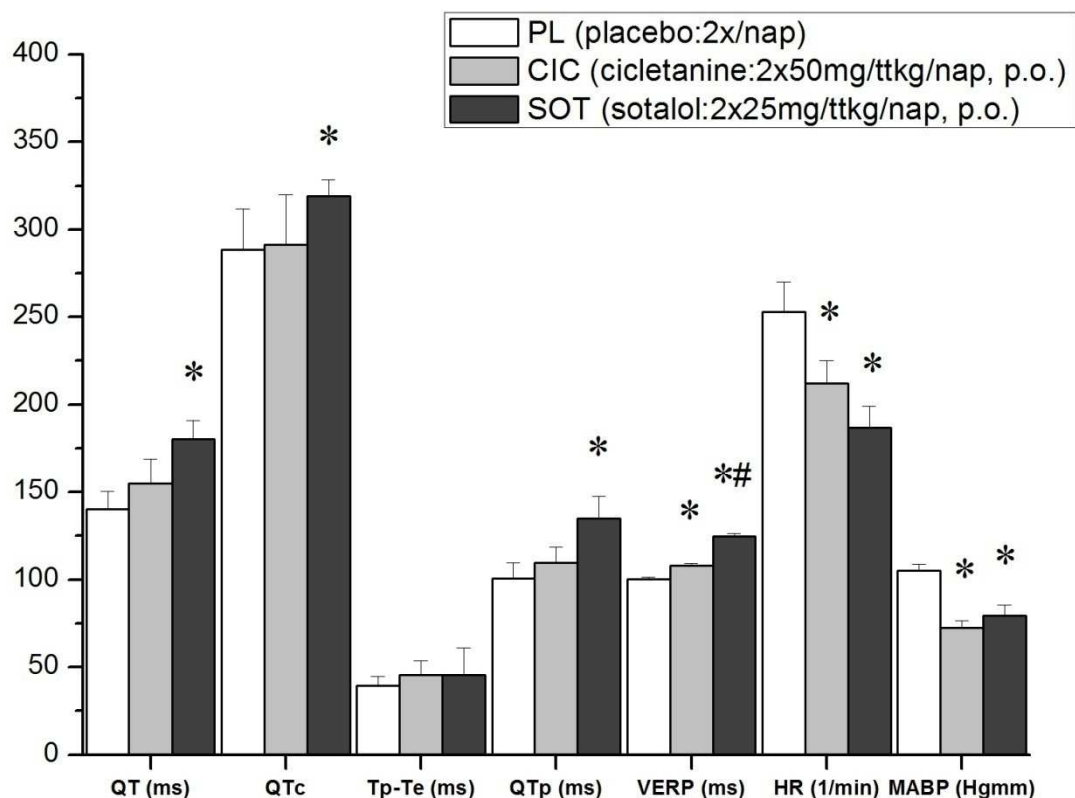
IS: ingerlési sorozat ($12 \times S_1 + S_2 + S_3$) (részletes leírását lásd: 4.1.4.3. fejezet)

5.2.2. A cikletanin, mint terápiás opció hatása a metabolikus szindrómában

A cikletanin terápiában részesülő kísérleti csoport állatainál a VERP értékei szignifikánsan emelkedtek a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. A cikletanin kezelést kapó kísérleti állatok QT idő, QT_c , $T_p - T_e$ és QT_p értékeiben növekedés volt megfigyelhető a kontrollcsoportban mért értékekkel való összehasonlítás során, azonban ez az emelkedés a statisztikailag szignifikáns szintet nem érte el. A cikletanin kezelés hatására szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a HR és a MABP értékeiben a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. (12. ábra)

A referenciaszerként alkalmazott sotalol a QT intervallum, a QT_c és a VERP értékeit szignifikánsan megnövelte a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. A VERP prolongáció a cikletaninnal kezelt csoportban mért értékkel összehasonlítva is szignifikánsnak bizonyult. A HR és a MABP értékeinek tekintetében a cikletanin kezeléshez hasonló, jelentős mértékű csökkenés volt megfigyelhető sotalol hatására a kontrollcsoportban mért értékekkel való összehasonlítás során. (12. ábra)

A „Metabolikus szindróma protokoll” kísérleti csoportjainak állataiban PEI-vel VPB-t, NSVT-t és SVT-t sikerült indukálnunk. A ritmuszavarok előfordulási gyakorisága szignifikánsan csökkent a cikletanin és a sotalol kezelésben részesülő kísérleti csoport állataiban a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. A cikletanin terápiában részesülő kísérleti csoport állataiban SVT-t nem sikerült indukálnunk a PEI során alkalmazott ingerlési beállításokkal. A cikletaninnal kezelt csoportban tapasztalt aritmia-redukció a VPB és a NSVT típusú aritmiák tekintetében szignifikánsan jelentősebb volt a sotalol terápiában részesülő csoportban mért értékekhez képest. MB kezelés hatására a kontrollcsoportban tapasztalt aritmia-kiválthatóság kismértékben emelkedett. A cikletanin terápiában részesülő kezelési csoportban alkalmazott MB az aritmia incidenciát szignifikánsan megnövelte a cikletanin kezelést kapó csoportban mért értékekhez képest. (13. ábra)



12. ábra Az 5 napon keresztül alkalmazott cikletanin (2x50mg/ttkg/nap, p.o.), illetve sotalol terápia (2x25mg/ttkg/nap, p.o.) hatása a metabolikus szindrómás kísérleti állatok elektrofiziológiai és hemodinamikai paramétereire

Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

n=24 állat/ PL kísérleti csoport

n=24 állat/ CIC kísérleti csoport

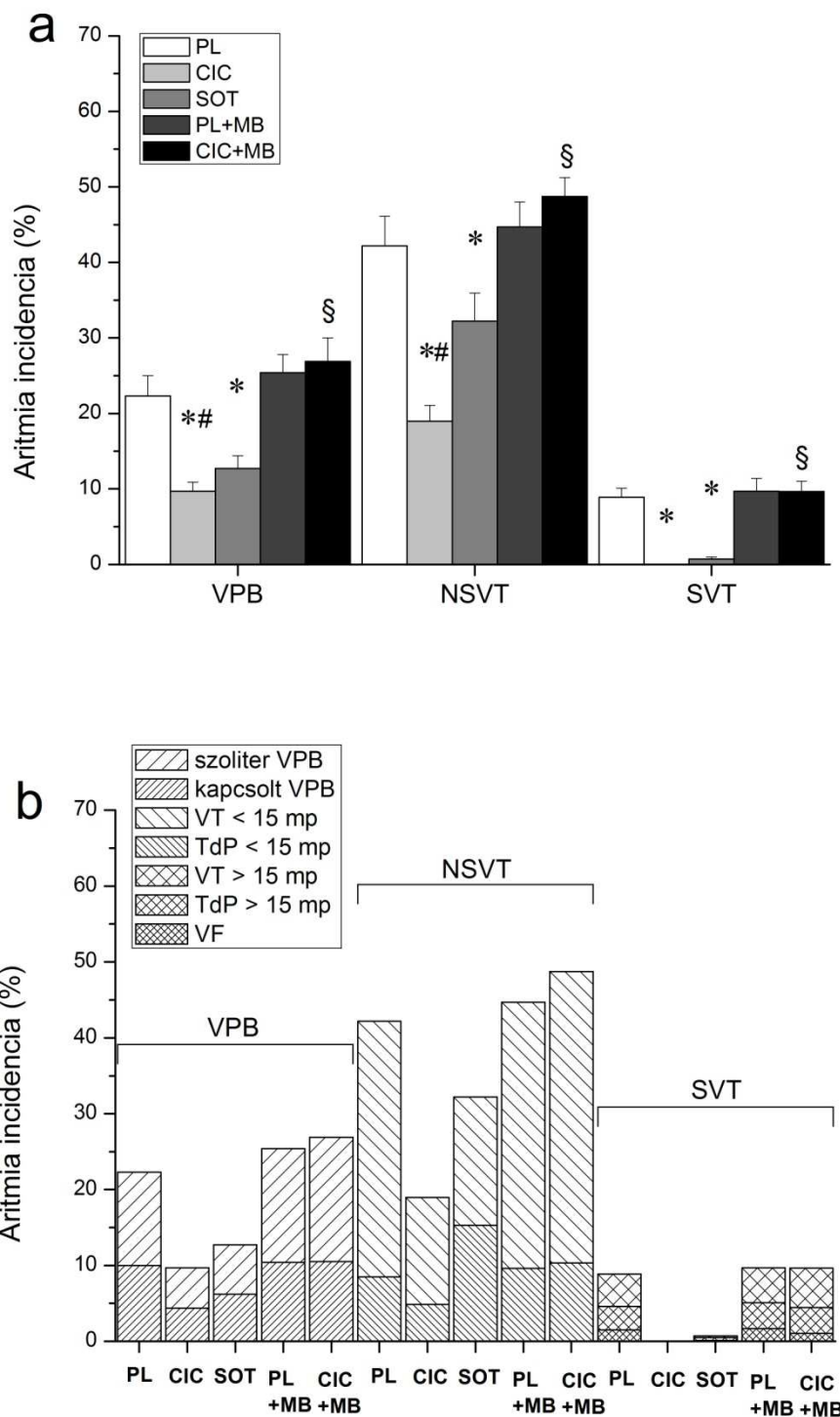
n=6 állat/ SOT kísérleti csoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a PL csoportban mért értékekhez képest.

A kettős kereszt (#) szignifikáns különbséget jelöl a CIC csoportban mért értékekhez képest.

$p < 0,05$

PL: kontrollcsoport; CIC: cikletanin terápiában részesülő kísérleti csoport; SOT: sotalol terápiában részesülő kísérleti csoport



13. ábra A cikletanin (2x50mg/ttkg/nap, p.o.), a sotalol (2x25mg/ttkg/nap, p.o.), valamint a MB (10mg/ttkg, i.v.) hatása a metabolikus szindrómás kísérleti állatok programozott elektromos ingerléssel (PEI) kiváltott szívritmuszavarainak előfordulási gyakoriságára (Aritmia incidencia) (13.a.), valamint a szívritmuszavarok Lambeth-konvenciók alapján osztályozott típusainak megoszlására (13.b.)

Az adatok százalékos arányban átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

n=24 állat/ PL kísérleti csoport

n=24 állat/ CIC kísérleti csoport

n=6 állat/ SOT kísérleti csoport

n=12 állat/ PL + MB kísérleti csoport

n=12 állat/ CIC + MB kísérleti csoport

A csillagok () szignifikáns különbséget jelölnek a PL csoportban mért értékekhez képest.*

A kettős keresztek (#) szignifikáns különbséget jelölnek a SOT csoportban mért értékekhez képest.

A paragrafus-jelek (§) szignifikáns különbséget jelölnek a CIC csoportban mért értékekhez képest.

p<0,05

PL: kontrollcsoport; CIC: cikletanin terápiában részesülő kísérleti csoport; SOT: sotalol terápiában részesülő kísérleti csoport; PL + MB: metilénkék terápiában részesülő kontrollcsoport; CIC + MB: cikletanin és metilénkék terápiában részesülő kísérleti csoport

VPB: kamrai extraszisztolé, NSVT: nem-tartós kamrai tachikardia; SVT: tartós kamrai tachikardia; szoliter VPB: szoliter kamrai extraszisztolé; kapcsolt VPB: kapcsolt kamrai extraszisztolé; VT<15 mp: 15 másodpercen belül spontán megszűnő kamrai tachikardia; TdP<15 mp: 15 másodpercen belül spontán megszűnő torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP); VT>15 mp: 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó kamrai tachikardia; TdP>15 mp: 15 másodpercnél hosszabb ideig tartó torsade de pointes kamrai tachikardia (TdP)

5.2.3. Biokémiai mérések

A cikletanin kezelésben részesülő kísérleti állatokban a miokardiális cGMP koncentráció szignifikáns emelkedést mutatott a kontrollcsoport értékeivel való összehasonlítás során. A cikletaninnal kezelt kísérleti állatok miokardiális cGMP szintjei MB hatására jelentős mértékben csökkentek nemcsak a cikletanin, hanem a kontrollcsoportban mért értékekhez képest is. A MB kezelés a kontrollcsoportban mért miokardiális cGMP szintet is szignifikánsan csökkentette.

Cikletanin kezelés hatására szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a miokardiális cAMP szintekben a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. MB hatására a cikletanin terápiában részesülő kísérleti állatok miokardiális cAMP szintjei jelentős mértékben emelkedtek nemcsak a cikletanin, hanem a kontrollcsoportban mért értékekhez képest is. A MB kezelés a kontrollcsoportban mért miokardiális cAMP koncentrációt is szignifikánsan megnövelte.

A miokardiális NO tartalom a cikletanin terápiában részesülő kísérleti állatokban szignifikáns növekedést mutatott a kontrollcsoportban mért értékekhez képest. A MB kezelés a miokardiális NO koncentrációt a kimutatási határ alá csökkentette a kontroll és a cikletanin kezelésben részesülő kísérleti csoport állataiban egyaránt, így annak pontos értékét nem tudtuk meghatározni. (5. táblázat)

	cGMP (pmol/mg x ww)	cAMP (pmol/mg x ww)	NO (nmol/g x ww)
PL	0,09 ± 0,013	1,88 ± 0,099	0,22 ± 0,03
CIC	0,16 ± 0,029*	1,46 ± 0,116*	0,51 ± 0,124*
PL+MB	0,04 ± 0,012*	2,34 ± 0,196*	MHSZ alatt
CIC+MB	0,03 ± 0,011* [#]	2,27 ± 0,233* [#]	MHSZ alatt

5. táblázat Az 5 napon keresztül alkalmazott cikletanin (2x50mg/ttkg/nap, p.o.), illetve a MB (10mg/ttkg, i.v.) hatása a metabolikus szindrómás kísérleti állatok miokardiális ciklikus nukleotid (cGMP, cAMP), valamint NO szintjeire

Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

n=6 állat/ PL kísérleti csoport

n=6 állat/ CIC kísérleti csoport

n=6 állat/ PL + MB kísérleti csoport

n=6 állat/ CIC + MB kísérleti csoport

A csillagok (*) szignifikáns különbséget jelölnek a PL csoportban mért értékekhez képest.

A kettős keresztek (#) szignifikáns különbséget jelölnek a CIC csoportban mért értékekhez képest.

p<0,05

PL: kontrollcsoport; CIC: cikletanin terápiában részesülő kísérleti csoport; PL + MB: metilénkék terápiában részesülő kontrollcsoport; CIC + MB: cikletanin és metilénkék terápiában részesülő kísérleti csoport

MHSZ alatt: meghatározási szint alatt

6. MEGBESZÉLÉS

Az inzulinrezisztencián alapuló kórállapotok (metabolikus szindróma, *T2DM*) komoly népegészségügyi problémát jelentenek világszerte. A fenti betegségekhez társuló emelkedett morbiditás és mortalitás az esetek jelentős részében szív- és érrendszeri eredetű, tehát az inzulinrezisztencia állapota jelentős mértékben megnöveli az egyén kardiovaszkuláris kockázatát.

Azon klinikai tanulmányok, amelyek az inzulinrezisztencia súlyossági foka és a KVB-ek fokozott előfordulási gyakorisága közötti lehetséges összefüggéseket vizsgálják, elsősorban az iszkémiás szívbetegség (*ISZB*) és a perifériás artériás betegség (*PAB*) eseteit veszik figyelembe, annak ellenére, hogy ezen betegségcsoportokon kívül még számos más szív- és érrendszert érintő morbiditás (pl.: szívritmuszavar) is alapvető komponense a KVB-nek.¹¹⁷ Mindezek alapján, a mai napig nem tisztázott teljesen az, hogy az inzulinrezisztencia kórállapotaiban a kardiális aritmogenezis milyen mértékben járul hozzá a jelentősen emelkedett kardiovaszkuláris rizikóhoz.

Tudományos kutatásaimban ezért célul tűztem ki, hogy preklinikai állatmodellek segítségével tanulmányozzam a hiperinzulinémiához és a metabolikus szindrómához társuló szívritmuszavarok kiválthatóságát, illetve azok lehetséges patomechanizmusait. További célom volt olyan törzskönyvezett gyógyszerek preklinikai vizsgálata, amelyek feltehetőleg hatékonyan képesek csökkenteni a hiperinzulinémiához és a metabolikus szindrómához társuló ritmuszavar-kiválthatóságot. A farmakonok vizsgálatánál különös figyelmet fordítottam lehetséges kardioprotektív hatásmechanizmusaik feltérképezésére.

6.1. A hiperinzulinémiás állapot preklinikai létrehozása

Az „*Hiperinzulinémia protokoll*”-ban alkalmazott kísérleti modell éhomi inzulin és vércukor eredményeiből tisztán látszik a hiperinzulinémiás, euglikémiás állapot sikeres megteremtése. A hiperinzulinémia mesterséges indukciója számos módszer segítségével (pl.: bólus inzulin injekció, *Rapid Insulin Sensitivity Test /RIST/*) is kivitelezhető, azonban a jelen kísérletsorozat fő irányvonalait tekintve a *HEGC* módszere tűnt erre a célra a legalkalmasabbnak.^{118,119} Kardiális elektrofiziológiai vizsgálatok esetén ugyanis az euglikémia fenntartása különösen fontos, hiszen számos korábbi tanulmány igazolta már a hipo- és hiperglikémiás állapotok proaritmiás hatásait.^{120,121} Továbbá, a *HEGC* egyensúlyi állapota (*steady state*) megfelelő hosszúságú időintervallumot biztosít az elektrofiziológiai és

hemodinamikai mérések, valamint a *PEI*-vel történő ritmuszavar-indukció kivitelezéséhez és a farmakológiai befolyásolási lehetőségek vizsgálatához. A *HEGC steady state* állapota során a vércukor- és plazma-inzulinértékek tartósan állandóak, nem fluktuálnak, ezáltal a preklinikai modellen kapott elektrofiziológiai és hemodinamikai eredmények jól standardizálhatók.

A preklinikai modellünk további előnye még az, hogy az elektrofiziológiai és hemodinamikai vizsgálatok, valamint a biokémiai mérésekhez szükséges mintavételek során a kísérleti állatok folyamatosan éber állapotban voltak, így a kísérletsorozatban kapott eredményeket az anesztézia indukcióra és fenntartása, illetve szedálásra alkalmazott szerek semmilyen mértékben sem befolyásolták. Ezen farmakonok kardiovaszkuláris funkcióra gyakorolt előnytelen hatásai jól ismertek.¹²²

6.2. A metabolikus szindróma preklinikai létrehozása

Számos tanulmány igazolta már, hogy a metabolikus szindróma mesterséges indukciója a nyúlban, mint állatfajban elsősorban alimentáris módon, tehát a kísérleti állat étrendjének tudatos megváltoztatásával lehetséges, azonban az alkalmazott experimentális diéták tápanyag-összetevői, illetve időtartamai egymástól jelentős eltérést mutathatnak. Jelen kísérletsorozatban az állatokat magas koleszterol-tartalmú (1,5%) étrendben részesítettük 8 héten keresztül. *Huang és munkatársai* tanulmányukban a kísérleti állatoknál 6 héten keresztül 1 %-os koleszterol-tartalmú experimentális étrendet alkalmaztak, amit a diéta 2. hetében kiegészítettek a hasnyálmirigy β -sejtjeinek *alloxan*-val (*AXN*) történő szelektív destrukciójával.¹²³ Egy másik tanulmányban nem magas koleszterol-, hanem magas zsír- (*high-fat /HF/*) tartalmú (10%) étrendben részesítették a kísérleti állatokat 12 héten keresztül, aminek eredményeként szintén manifest inzulínrezisztenciás állapot, valamint kóros lipid-profil fejlődött ki.¹²⁴ A magas zsír-tartalmú diétát manapság gyakran kiegészítik szénhidrátok nagymennyiségű adásával. A leggyakrabban alkalmazott szénhidrátok a szukróz (*high-sucrose /HS/*) és a fruktóz (*fructose /HFru/*). Az előbbi a diéta összkomponenseinek 40%-át, az utóbbi 10-60%-át teszi ki. A magas zsír és magas szukróz- vagy fruktóz-tartalmú diéta (*HF/HS diet*, vagy *HF/HFru diet*) az inzulínrezisztencia állapotának még korábbi és még markánsabb kifejlődését eredményezi.¹²⁵

A metabolikus szindróma mesterséges preklinikai indukciója, nemcsak alimentáris módszer alkalmazásával lehetséges, hanem genetikai úton is megvalósítható, azonban ezesetben a nyúl, mintállatmodell szerepe jelenleg erősen limitált. A preklinikai vizsgálatokban leggyakrabban alkalmazott genetikai modellek az egér, illetve a patkány állatfaj egyedei, amelyekben a

metabolikus szindróma monogénis mutációk eredményeként jön létre. A leptin 6. kromoszómán lévő génjének autoszomális recesszív módon öröklődő mutációja *ob/ob* (*C57BL/6J-ob/ob*) egerek, a leptin receptor (*LR*) 4. kromoszámán elhelyezkedő génjének hasonló mutációja pedig *db/db* egerek (*C57BL/KsJ-db/db*), illetve *fa/fa* patkányok (*Zucker Diabetic Fatty /ZDF/*) kifejlődéséhez vezet.¹²⁶⁻¹²⁸ Mindegyik állattípusban vezető állapotként jelentkezik az obezitás és az inzulinrezisztencia, valamint a következményes hiperinzulinémia és hiperglikémia. Ezen genetikai állatmodellek legfőbb hátránya a költséges létrehozásuk. Továbbá, a fent említett genetikai modellekben a metabolikus szindrómát alkotó kórállapotok indukálása az anyagcsere funkciókban alapvető szereppel bíró egyik gén funkcionális felfüggesztésének eredménye. A metabolikus szindróma azonban nem monogénis megbetegedés, hanem mind környezeti, mind pedig genetikai szempontból multifaktoriális kórállapotnak tekinthető. Mindezek alapján a metabolikus szindrómás genetikai állatmodelleken végzett preklinikai vizsgálatok eredményeit csak körültekintően szabad interpretálni a humán klinikai gyakorlathoz.¹²⁹ Ezzel szemben az alimentáris módon létrehozott preklinikai állatmodelleknek az inexpenzivitáson túl másik fő előnyük az, hogy a metabolikus szindróma indukciójához alkalmazott étrend fő komponenseit tekintve (zsír és szénhidrát) nagymértékben hasonlít XXI. századi, nyugati-típusú táplálkozáshoz (*cafeteria diet*), ami számos tanulmány szerint bizonyítottan felelős a kóregyüttes humán populáción belüli magas előfordulási gyakoriságáért.¹³⁰

A „*Metabolikus szindróma protokoll*” laborvizsgálatait, valamint elektrofiziológiai és hemodinamikai mérései során a kísérleti állatok teljesen éber állapotban voltak, így a méréseink eredményeit a közismerten előnytelen kardiális hatással bíró szedatívumok és anesztetikumok semmilyen mértékben sem befolyásolták.

6.3. A hiperinzulinémiás állapot hatása a kardiális aritmogenezisre

Preklinikai kísérletsorozatunkban igazoltuk, hogy a hiperinzulinémia állapota jelentős mértékben megnöveli a *PEI*-vel kiváltott kamrai eredetű aritmiák előfordulási gyakoriságát, továbbá a szívritmuszavarok indukálhatósága szorosan korrelál a plazma-inzulinszinttel.

Az elektrofiziológiai paraméterek magas plazma-inzulinszint hatására létrejövő jelentős növekedése alapján azt feltételezzük, hogy a hiperinzulinémia állapota a *LQTS*-ban is megfigyelt aritmogenikus mechanizmuson, azaz a miokardiális akciós potenciál időtartamának kamrafalon belüli inhomogén prolongációján (*TDR*) keresztül képes facilitálni a szívritmuszavarok kiválthatóságát. Amint korábban részleteztük, a kamrai miokardiumot funkcionális és elektrofiziológiai szempontból 3 különböző szívizomsejt-típus (epikardiális,

midmiokardiális /M-sejtek/ és endokardiális sejtek) alkotja. Ezen sejtek bizonyos gyógyszerek, kórállapotok hatására egymástól eltérő akciós potenciál időtartam változással reagálnak, ami elsősorban a miokardiális repolarizáció különböző hosszában nyilvánul meg. Bizonyított tény, hogy egy adott miokardium réteg jelentős mértékben prolongált akciós potenciál időtartama azon túl, hogy az ingerképzési zavarok egyik fő mechanizmusán keresztül (triggerelt aktivitás) facilitálja az aritmiák kialakulását, az inhomogén miokardium refrakteritás létrehozása által ideális feltételeket teremt az ingervezetési zavarokon (*re-entry*) alapuló ritmuszavarok létrejöttének is.

A prekordiális elvezetésekéből (V_2 , V_3) meghatározott QT szakasz az adott miokardium régió midmiokardiális, a QT_p pedig ugyanazon terület epikardiális akciós potenciál időtartamának felel meg.⁷⁸ Következésképpen, a T-hullám csúcsa és vége közötti intervallum (T_p-T_e) a fent említett miokardiumrétegek repolarizációs időtartamai közötti különbséget, azaz a TDR -t tükrözi.⁸² Mindezek alapján a T_p-T_e növekedése arányos a TDR jelenségének amplifikációjával és ezáltal megbízható prediktív indikátora a fenyegető rimuszavarok kialakulásának is.¹³¹ Mivel a jelen kísérletsorozatban a T_p-T_e jelentős növekedéséhez a QT idő prolongációja és a QT_p csökkenése járult hozzá, a fenti összefüggést alapul véve azt gondoljuk, hogy a hiperinzulinémiában megfigyelt emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságért a midmiokardiális sejtek akciós potenciál időtartamának prolongációja, illetve az epikardiális sejtek hasonló paraméterének csökkenése egyaránt felelős.

A vizsgált elektrofiziológiai paraméterek változásából, biokémiai méréseink eredményeiből, valamint az alkalmazott terápiás szer (*metoprolol*) kardiális hatásaiból arra következtetünk, hogy a hiperinzulinémia állapota jelen preklinikai modellben direkt és indirekt módon képes fokozni a miokardiális repolarizáció kamrafalon belüli inhomogenitását. Erősen limitált azon tanulmányok száma, amelyek az inzulin miokardiális ioncsatornákra kifejtett közvetlen hatásait vizsgálták. *Kirstein és munkatársai* kutatásaikban igazolták, hogy az inzulin az L-típusú Ca^{2+} csatornák közvetlen aktiválásán keresztül képes fokozni a miokardiális I_{Ca-t} .^{132,133} *Ballard és munkatársai* egy másik tanulmányban kimutatták, hogy inzulin hatására dózis-dependens módon növekszik a szarkolemmális I_{NCX} .¹³⁴ Közismert, hogy az M-sejtek rendhagyó elektrofiziológiai tulajdonságának hátterében az L-típusú Ca^{2+} csatornák, valamint a Na^+/Ca^{2+} *exchanger* pumpamechanizmus többi miokardiális sejthez képest jelentősen megnövekedett denzitása áll.⁶⁹ Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy a kísérletsorozatunkban megfigyelt szignifikáns QT intervallum és QT_c prolongáció az inzulin midmiokardiális sejtek I_{Ca} és I_{NCX} ionáramaira gyakorolt közvetlen stimuláló hatásának az eredménye.

A *HEGC* egyensúlyi állapota során egyik kísérleti csoportban sem figyeltünk meg jelentős változást a plazma-katecholaminszintekben (*adrenalin*, *noradrenalin*) a kontrollcsoport értékeihez képest. A kísérletsorozatunkban tapasztalt plazma-katecholaminszint változásokhoz hasonló tendenciát figyeltek meg *Laitinen* és *munkatársai*, akik tanulmányukban az euglikémiás hiperinzulinémia állapotának kardiovaszkuláris paraméterekre (pl.: verőtérfogat, szívfrekvencia, perctérfogat, perifériás vaszkuláris rezisztencia) gyakorolt hatásait vizsgálták.¹³⁵ Ennek ellenére úgy gondoljuk, hogy a szimpatikus idegrendszer aktivációja nagymértékben involvált az elektrofiziológiai markerek (*QT* intervallum, *QT_c*, *T_p-T_e*) euglikémiás hiperinzulinémia által létrehozott prolongációjában, valamint az emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságban. Feltételezésünket arra alapozzuk, hogy a *HEGC* során a magas koncentrációjú inzulininfúzióban (10 mNE/ttkg/perc) részesülő kísérleti csoport állatainak szignifikánsan megnövekedett elektrofiziológiai paraméterei, valamint jelentősen megemelkedett ritmuszavar-kiválthatósága a β_1R -ok *metoprolollal* történő szelektív blokádjának hatására jelentősen redukálódtak, csaknem a kontrollcsoportban tapasztalt érték szintjeire csökkentek. Ezutóbbi eredményünk azt bizonyítja, hogy az euglikémiás hiperinzulinémia indirekt módon, adrenerg aktivációval is hozzájárul a *TDR* kóros amplifikációjához és ezáltal az emelkedett ritmuszavar-kiválthatósághoz.

Az adrenerg aktiváció számos miokardiális ioncsatorna és pumpamechanizmus működését képes befolyásolni, amely közül az I_{K_r} -re kifejtett gátló hatás tűnik a legjelentősebbnek. A folyamatban az α - és β -adrenerg receptorok egyaránt érintettek. A miokardiumon jelentős denzitással bíró β adrenoceptorok stimulálása során keletkező *cAMP*, mint jelátvivő molekula közvetlenül képes aktiválni a *protein kináz A* (*PKA*) enzimet, amely a *hERG* specifikus kötőhelyeinek foszforilálásán keresztül a csatorna inhibíciójához vezet.¹³⁶ Az adrenerg túlsúly hatására a kardiális α_{1A} receptorok is aktiválódnak, ami a *foszfolipáz C- β* (*PLC- β*) enzim közvetlen stimulálásán keresztül fokozza a *PKC* működését. Ennek eredményeként a *hERG* bizonyos kötőhelyei foszforilálódnak, ami szintén a csatorna fiziológiás működésének gátlásához vezet.¹³⁷ Mivel az M-sejtek I_{K_s} denzitása erősen limitált és miokardiális repolarizációjukért főleg az I_{K_r} felelős, ezért azt gondoljuk, hogy a hiperinzulinémia állapota az M-sejtek ionáramaira (I_{Ca} és I_{NCX}) gyakorolt közvetlen stimuláló hatáson túl az adrenerg aktiváció fokozásával a fent említett I_{K_r} gátló mechanizmusokon keresztül, indirekt módon is elősegíti a midmiokardiális sejtek akciós potenciál időtartamának növekedését. A *hERG* csatornával kapcsolatosan azonban fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy egy korábbi *in vitro* tanulmány szerint az inzulin a *hERG*-re aktiváló hatást fejt ki, ugyanis izolált nyúl miokardium, valamint a *hERG* csatornával rendelkező *HEK-293* sejtkultúra inzulinnal történő

inkubációja során az I_{Kr} fokozódását, valamint a *hERG* csatornát kódoló fehérjék expressziójának növekedését figyelték meg.¹³⁸ Kísérletsorozatunk elektrofiziológiai eredményeit alapul véve azonban azt gondoljuk, hogy az inzulinnak ezen hatása preklinikai modellünkben, *in vivo* körülmények között kevésbé dominál.

Számos kutatás igazolta, hogy a szimpatikus túlsúly a β -adrenerg aktiváción keresztül fokozza az I_{Ks} -t.¹³⁹ A nyúl miokardium ioncsatorna-topográfiáját vizsgáló tanulmányok eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a kísérletsorozatunkban megfigyelt QT_p csökkenés hátterében az epikardiális miokardiumban jelentős denzitással jelen lévő I_{Ks} -t mediáló ioncsatorna magas plazma-inzulinszint hatására létrejövő, indirekt, adrenerg rendszeren alapuló aktiválása áll.^{140,141}

Hangsúlyoznunk kell, hogy kísérletsorozatunkban a *HEGC* egyensúlyi állapota során tapasztalt elektrofiziológiai és hemodinamikai változások, illetve a fokozott ritmuszavar-kiválthatóság elsősorban a hiperinzulinémia direkt és indirekt hatásainak, nem pedig a kóros vércukorszint-ingadozásnak (hipo-/hiperglikémia) eredménye. A hipo- és hiperglikémiás állapotok proaritmiás hatásai jól ismertek, azonban az általunk alkalmazott kísérleti protokollban ezen „zavaró” tényezők teljes mértékben kizárhatók, hiszen a *HEGC* módszer kivitelezésének alapkövetelménye a konstans euglikémiás állapot biztosítása.

Az inzulin fiziológiás hatása során a glükózon kívül jelentős mennyiségű kálium is beáramlik a sejtekbe. Közismert tény, hogy a hipokalémiás állapot nagymértékben elősegíti a szívritmuszavarok kialakulását.¹⁴² A jelen kísérleti beállítások mellett a *HEGC* egyensúlyi állapotában egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltunk jelentős csökkenést a plazma-káliumszintekben, ezért egyértelműen kijelenthetjük, hogy a hiperinzulinémia során tapasztalt emelkedett ritmuszavar kiválthatóságért nem a hipokalémia a felelős.

Ámbár a preklinikai modelleken kapott eredményeket mindig fokozott óvatossággal kell a humán gyakorlatra extrapolálni, a jelen kísérletsorozat fontos implikációt nyújt a klinikum számára is. Az euglikémiás hiperinzulinémia ugyanis rendkívül gyakori állapot, figyelembe véve azon betegek számát, akik az inzulinrezisztencián alapuló kórállapotok (metabolikus szindróma, *T2DM*) korai fázisában (kompenzatórikus hiperinzulinémia) szenvednek, illetve azokat, akik *I. típusú cukorbetegségük (T1DM)* miatt konvencionális inzulin-kezelésben részesülnek. Preklinikai kísérletsorozatunk eredményeiből arra következtethetünk, hogy ezek a betegek hiperinzulinémiás állapotuk következtében fokozott proaritmiás kockázattal bírnak.

6.4. A metabolikus szindróma hatása a kardiális aritmogenezisre

Preklinikai vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a metabolikus szindróma állapota jelentős mértékben fokozza a *PEI*-vel kiváltott kamrai eredetű szívritmuszavarok előfordulási gyakoriságát.

A kísérletsorozatban vizsgált elektrofiziológiai paraméterek változása alapján azt feltételezzük, hogy a preklinikailag indukált metabolikus szindrómához társuló kamrai eredetű szívritmuszavarok fokozott kiválthatóságáért a miokardiális akciós potenciál időtartamának kamrafalon belüli inhomogén rövidülése a felelős. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a SQTS-ban előforduló aritmiák patofiziológiai alapját is a miokardiális akciós potenciál időtartamának túlzott mértékű transzmurális inhomogenitása (*TDR*) képezi.⁷⁷ Meg kell jegyeznünk, hogy jelen vizsgálatorozatban a *TDR* legfontosabb elektrofiziológiai markere (T_p - T_e) csekély mértékű, nem-szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollcsoport hasonló paraméterével való összehasonlítás során. Ez az eredmény első ránézésre kétségbe vonja azon feltételezésünket, miszerint a miokardiális akciós potenciál kamrafalon belüli heterogén rövidülése következtében fellépő *TDR* amplifikáció, mint alapmechanizmus áll a metabolikus szindrómához társuló emelkedett ritmuszavar-kiválthatóság hátterében. Mivel azonban a T_p - T_e komponensei egy adott miokardium régió epikardiális és midmiokardiális sejteinek akciós potenciál időtartam végével esnek egybe (T_{peak} és T_{end}), az endokardiális sejtek akciós potenciál időtartamáról pedig nem adnak felvilágosítást, ezért –ámbar konkrét evidencia jelen kísérleti modell technikai limitációja miatt nem áll rendelkezésünkre– azt gondoljuk, hogy ezutóbbi sejtcsoport elektrofiziológiai tulajdonságainak metabolikus szindrómához köthető változása fontos szerepet játszik a miokardiális repolarizáció transzmurális inhomogenitásának amplifikációjában. Az endokardiális sejtek akciós potenciál időtartamának *in vivo* körülmények közötti pontos meghatározása további, a jelenlegi kísérleti beállításoknál szofisztikáltabb elektrofiziológiai eszközöket és módszereket igényel.

Feltételezésünket, miszerint a metabolikus szindrómában tapasztalt fokozott ritmuszavar-kiválthatóság a miokardiális repolarizáció transzmurális inhomogenitásán alapul, az is megerősíti, hogy a vizsgálatunkban az aritmia-indukcióhoz alkalmazott *PEI* jelentősen facilitálja a ritmuszavarok keletkezését, különösen akkor, ha alapjelenséggként (pl.: gyógyszer vagy kórállapot következményeként) bizonyos mértékű *TDR* is fennáll.¹⁰⁶

A kísérletsorozatunkban végzett biokémiai mérések eredményeit alapul véve azt gondoljuk, hogy a fenti elektrofiziológiai folyamatokért a miokardiális ciklikus nukleotid, valamint *NO* koncentráció metabolikus szindróma hatására létrejövő változásai nagymértékben

felelősek. A preklinikailag indukált metabolikus szindrómás állatmodellünkben ugyanis a miokardiális *cGMP* és *NO* szintekben jelentős mértékű csökkenés, a *cAMP* koncentrációban pedig számottevő növekedés figyelhető meg más tanulmányokban vizsgált egészséges állatok hasonló változóival való összehasonlítás során.^{99,111,143} Feltételezésünket az is megerősíti, hogy a *cikletanin* kezelésben részesülő kísérleti csoport állatainak alacsony ritmuszavar-kiválthatóságához emelkedett miokardiális *cGMP* és *NO*, valamint lecsökkent *cAMP* koncentráció társult. Továbbá, a *cikletaninnal* kezelt preklinikai modell miokardiális *cGMP* és *NO* szintjének *MB* hatására létrejövő redukciója, valamint *cAMP* koncentrációjának emelkedése a preklinikai modell ritmuszavar-kiválthatóságát jelentős mértékben fokozta.

Az *in vivo* kísérletsorozatunkban alkalmazott metodikák és beállítások nem voltak elégségesek ahhoz, hogy pontosan identifikáljuk azokat az ioncsatornákat, amelyek működésének megváltozása a metabolikus szindrómás állatmodell miokardiális akciós potenciál időtartamának jelentős mértékű rövidüléséhez, illetve emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságához vezet. A vizsgált elektrofiziológiai paraméterek változása alapján azonban azt feltételezzük, hogy a metabolikus szindróma állapota a miokardiális *cGMP* és *NO* deficittel, valamint *cAMP* többlettel valamely kifelé irányuló kationáram növelésén, illetve valamely befelé irányuló kationáram csökkentésén keresztül felelős a miokardiális akciós potenciál időtartamának redukciójáért, valamint az emelkedett ritmuszavar-incidenciáért.

A *cGMP* és *NO* közvetlen miokardiális hatásai, valamint az általuk indukált intracelluláris jelátviteli folyamatok roppant komplexek és diverzek.^{144,145} Mindkét molekula számos direkt és indirekt mechanizmuson keresztül, egymással szoros szekvenciában képes hatást gyakorolni a miokardiális ioncsatornák működésére.^{146,147} A *cGMP* elsősorban *cGMP-dependens protein kinázok* (pl.: *PKG*) aktiválásán keresztül gyakorol hatást a miokardiális funkcióra, továbbá *cGMP-dependens foszfodiészterázok* stimulálásával (*PDE 2*, *PDE 5*), illetve gátlásával (*PDE 3*) befolyásolja a sejten belüli ciklikus nukleotid koncentrációt.¹⁴⁸ Mindezek alapján erősen feltételezzük, hogy a kísérleti modellünkben tapasztalt *cAMP* koncentráció csökkenés hátterében *cGMP* általi *PDE* aktiváció áll. A *NO* azon túl, hogy a *sGC* aktiválásával fokozza a *cGMP* szintézist, *cGMP*-independens módon, az *S-nitroziláció* folyamatán keresztül közvetlen hatást képes gyakorolni a miokardiális ioncsatornákra.¹⁴⁹

Kumar és munkatársai nyúlból származó ventrikuláris eredetű miokardiális sejteken végzett tanulmányukban a miokardiális *cGMP* koncentráció mesterséges csökkentésének hatására jelentős mértékű I_{Ca} redukciót figyeltek meg.¹⁵⁰ Ezen *in vitro* tanulmány magyarázatot szolgáltat a metabolikus szindrómás preklinikai állatmodellünkben tapasztalt alacsony *cGMP* szint és az elektrofiziológiai markerek (*QT* intervallum, *QT_c*, *QT_p*, *VERP*) jelentős mértékű

redukciója közötti kapcsolatra. Számos tanulmány igazolta, hogy a fiziológiás és terápiás *NO* koncentráció a fent említett *cGMP*-dependens és –independens mechanizmusokon keresztül aktiváló hatást fejt ki a miokardiális I_{Ca} -ra és gátló effektust gyakorol az I_{Kr} -ra, ezáltal megakadályozván a miokardiális akciós potenciál időtartamának túlzott mértékű rövidülését.¹⁵¹⁻¹⁵³ Ezek a tanulmányok szintén alátámasztják vizsgálatsorozatunk azon eredményét, miszerint a metabolikus szindrómás preklinikai állatmodell elektrofiziológiai paramétereinek redukciójában, valamint az emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságban alapvető szerepe van a kórállapot eredményeként létrejött, a fiziológiásnál jelentősen alacsonyabb miokardiális *NO* és *cGMP* koncentrációnak.

Számos tanulmány igazolta, hogy a miokardiális *cAMP* szint növekedés hatására az I_{Ks} fokozódik.¹⁵⁴ Figyelembe véve azt a tényt, hogy az alkalmazott állatfaj miokardiális repolarizációjáért főleg az I_{Ks} felelős, könnyen belátható, hogy a metabolikus szindrómás preklinikai modellünkben a miokardium emelkedett *cAMP* koncentrációja szintén hozzájárul a miokardiális akciós potenciál időtartamának redukciójához.^{155,156}

Meg kell jegyeznünk azonban azt, hogy a metabolikus szindróma jóval komplexebb kórállapot-együttes annál, hogy a preklinikai modellünkben megfigyelt elektrofiziológiai jelenségekért kizárólag a lecsökkent miokardiális *cGMP* és *NO*, valamint a megnövekedett *cAMP* koncentrációt tegyük felelőssé. Amint azt korábban részleteztük a kóregyüttes patofiziológiai komponensei roppant változatosak és mindegyikük közvetlen vagy indirekt módon képes hatást gyakorolni a miokardiális funkcióra.

Tanulmányunk első részében igazoltuk, hogy a hiperinzulinémia állapota elsősorban adrenerg eredetű útvonalon képes befolyásolni a miokardiális akciós potenciál időtartamát. Az inzulinrezisztenciás állapot progressziója során a szénhidrátmetabolizmus-zavar eredményeként keletkező glikozilált fehérjék (*advanced glycation end products /AGE/*) és reaktív oxigén szabadgyökök (*reactive oxygen species /ROS/*) miokardiális repolarizációra gyakorolt közvetlen és közvetett hatásai szintén jól ismertek.^{157,158} A tartós hiperglikémia hatására a szívet innerváló autonóm rostok funkcionális egyensúlya is megbomlik (*kardiális autonóm neuropátia /CAN/*), eltolódik az adrenerg túlműködés irányába és ezáltal permanens kardiális szimpatikus aktivációt eredményez.¹⁵⁹ Az inzulinrezisztencia következtében a sejt energiatermelésében előtérbe kerülő zsírsav-oxidáció kevesebb mennyiségű *ATP*-t szolgáltat, aminek következményeként a Na^+/K^+ *ATP*-áz pumpamechanizmus zavart szenved, valamint az *ATP*-dependens K^+ -csatornák megnyílnak. Az emelkedett mennyiségű zsírszövetből felszabaduló szabadzsírsavak (*FFA*) tovább fokozzák a miokardium *ATP*-dependens K^+ -csatornáinak megnyílását.¹⁶⁰ Az *FFA* metabolizmus eredményeként keletkező

anyagcseretermékek (*acyl-karnitin*, *diacyl-glicerol*) a *PKC* aktiválásán keresztül előnytelenül befolyásolják az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázist, valamint fokozzák a *hERG* csatorna működését is.^{161,162}

Mindezekén túl, a metabolikus szindrómában a miokardiumnak nemcsak funkcionális, hanem strukturális változása is végbemegy. Számos tanulmányban igazolódott már a metabolikus szindróma hatására létrejövő fokozott miokardiális fibroblaszt működés, valamint a jelentős mértékű intersticiális kollagéndepozíció.¹⁶³ Az *AGE* emelkedett koncentrációja a kollagénfilamentumok közötti keresztkötések számának növelésével szintén jelentős mértékben hozzájárul a miokardiális fibrotikus folyamatokhoz.¹⁶⁴ A miokardium fiziológiai architektúrájának megváltozása megzavarja a normál ingerületi hullám szíven belüli terjedését és fokozatosan teret enged az ingervezetési zavarok kialakuláshoz szükséges feltételeknek.¹⁶⁵ Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy ezek a tényezők is hozzájárulnak a metabolikus szindrómás preklinikai modellünk jelentős mértékben megemelkedett ritmuszavar-kiválthatóságához, valamint az aritmiák súlyossági fokának növekedéséhez (*SVT* megjelenése).

Összeségében az a véleményünk, hogy a lecsökkent miokardiális *cGMP* és *NO*, valamint a megnövekedett *cAMP* koncentráció, illetve a fentiekben részletezett faktorok miokardiális funkcióra és struktúrára gyakorolt együttes, direkt és indirekt hatásainak nettó eredményeként jönnek létre a metabolikus szindrómás preklinikai modellünkben tapasztalt elektrofiziológiai jelenségek. Erősen respektálva azt a tényt, hogy a preklinikai vizsgálatok eredményeit csak kellő körültekintéssel szabad a humán klinikum nyelvére interpretálni, kísérletsorozatunkból arra a következtetésre jutottunk, hogy a metabolikus szindrómában szenvedő betegek emelkedett kardiovaszkuláris rizikójához a preklinikai modellünkben megfigyelt fokozott aritmogenitás is jelentős mértékben hozzájárulhat.

6.5. A metoprolol terápiás jelentősége hiperinzulinémiában

Preklinikai vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a *metoprolol* előnyös kardiális hatást fejt ki hiperinzulinémiában, ugyanis a farmakon 1mg/ttkg intravénás dózisa a kísérleti modellben a *PEI*-vel kiváltott ritmuszavarok előfordulási gyakoriságát jelentős mértékben csökkentette. Jelen tanulmányunkban azt is kimutattuk, hogy a hiperinzulinémia állapotában jelentkező szívritmuszavarok hasonló mechanizmussal jönnek létre, mint a *LQTS*-hoz kapcsolódó aritmiák, továbbá a hiperinzulinémiában tapasztalt emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságért az adrenerg rendszer aktivációja alapvetően felelős.

Számos korábbi tanulmány bizonyította, hogy a *LQTS*-ban szenvedő betegek szimpatikus idegrendszer aktiváció, illetve katecholamin alkalmazás hatására emelkedett ritmuszavar-incidenciával reagálnak.¹⁶⁶ Az adrenerg aktiváció, valamint a fokozott aritmogenitás közötti kapcsolatot a *LQTS* egyik familiáris formájának (*LQTS 2*) patomechanizmusa kiválóan demonstrálja. A szindróma e típusában az I_{Kr} -t mediáló csatornaa pórusformáló alegységet kódoló gén (*hERG*, *KCNH2*) veleszületett mutációja következtében fokozottan érzékeny a korábbi fejezetben részletezett jelátviteli mechanizmusokon keresztül az α - és β -adrenerg hatásokra.¹⁶⁷ Ezekben a betegekben minden olyan tényező (emocionális stressz, fizikai megterhelés, gyógyszerhasználat), amely jelentős szimpatikus túlsúlyt eredményez potenciális veszélyt jelent a malignus szívritmuszavarok kialakulására nézve. Mindezek alapján könnyen belátható, hogy miért tartozik a béta-blokkoló kezelés a kongenitális *LQTS* első-vonalas terápiás spektrumába.⁹⁶ Meg kell jegyeznünk azt, hogy a hiperinzulinémiás állapot során jelentkező emelkedett ritmuszavar-kiválthatóság csökkentésére alkalmas szer kiválasztásánál és preklinikai tesztelésénél a fenti összefüggést erősen számításba vettük.

A *LQTS* kongenitális eseteiben leggyakrabban alkalmazott antiadrenerg szer a *propranolol*, amely nem-szelektív módon hozza létre a βR -blokkadot.¹³⁹ Közismert tény, hogy a nem-szelektív béta-blokkolók számos mechanizmuson keresztül előnytelenül befolyásolják a szénhidrát-metabolizmust.¹⁶⁸ Mivel a kísérletsorozatban alkalmazott preklinikai modellünkben a szénhidrát-anyagcsere morbiditása (hiperinzulinémia) „*sui generis*” jelen van, ezért célszerűnek tartottuk egy olyan βR -blokkoló szer (*metoprolol*) alkalmazását, amelynek metabolikus hatásai $\beta_1 R$ szelektivitásából adódóan sokkal kedvezőbbek.¹⁶⁹

Az alapján, hogy a preklinikai állatmodellünk elektrofiziológiai paraméterei, valamint ritmuszavar-kiválthatósága *metoprolol* alkalmazása után csaknem a kontrollcsoportban tapasztalt értékek szintjére módosultak, azt feltételezzük, hogy a hiperinzulinémiában jelentkező adrenerg túlsúly hatása nem a miokardiális α_{1A} , hanem a β_1 receptorokhoz kapcsolt molekuláris útvonalakon keresztül valósul meg.

A *metoprolol* preklinikai modellünkben megfigyelt kardiális hatásainak humán klinikumra való óvatos interpretálásából arra a következtetésre jutottunk, hogy a szelektív $\beta_1 R$ -blokkoló kezelés az euglikémiás hiperinzulinémiás állapotokhoz (a *T2DM* és a *metabolikus szindróma* korai fázisában jelentkező kompenzatórikus hiperinzulinémia, *T1DM* konvencionális inzulin terápiája) társuló emelkedett proaritmiás kockázatot –a szénhidrát-anyagcsere további károsítása nélkül– előnyösen képes befolyásolni.

6.6. A cikletanin terápiás jelentősége metabolikus szindrómában

Preklinikai vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a *cikletanin* előnyös kardiális hatást fejt ki metabolikus szindrómában, ugyanis a farmakon napi 2 x 50 mg/ttkg orális dózisa a preklinikai modellünkben a *PEI*-vel kiváltott ritmuszavarok előfordulási gyakoriságát jelentős mértékben csökkentette.

Alapfeltételezésünket, miszerint a metabolikus szindrómához társuló szívritmuszavarok hasonló mechanizmussal jönnek létre, mint a *SQTS*-ban előforduló aritmiák, az alkalmazott gyógyszeres terápiák hatásai szintén megerősítik. Az elektrofiziológiai paraméterek *cikletanin*, valamint *sotalol* kezelés hatására létrejött változásaiból tisztán látszik, hogy mindkét farmakon a metabolikus szindrómában emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságot a miokardiális akciós potenciál időtartamának prolongációján keresztül képes csökkenteni.

A *cikletaninnal* kezelt kísérleti állatok biokémiai méréseinek eredményeit ritmuszavar-kiválthatóságukkal összevetve kitűnően látszik, hogy a *cikletanin* antiaritmiás potenciáljának hátterében a farmakon miokardiális *cGMP* és *NO* koncentrációt fokozó, valamint *cAMP* szintet csökkentő hatása áll. Ezen megállapításunkat alátámasztja az a tény is, hogy a direkt *sGC* és *NOS* inhibitor tulajdonságú *MB cikletaninnal* történő együttes alkalmazása során a miokardiális *cGMP* és *NO* koncentráció jelentős mértékű csökkenéséhez és a *cAMP* szint számottevő emelkedéséhez a *PEI*-vel történő ritmuszavar-kiválthatóság szignifikáns növekedése párosult.

Korábbi, a *cikletanin* kardioprotektív hatékonyságát vizsgáló tanulmányok szerint a farmakon antiaritmiás és anti-iszkémiás tulajdonságának hátterében a kardiális prosztaglandin (*6-keto-PGF_{1α}*) szintézis fokozása, a miokardiális ionegyensúly megőrzése, valamint az *ATP*-dependens K^+ csatornák nyitási frekvenciájának növelése áll.¹⁷⁰⁻¹⁷² Jelen kísérletsorozatban egyértelműen bizonyítottuk, hogy a *cikletanin* a miokardiális *cGMP* és *NO* szint emelésén, valamint a *cAMP* koncentráció csökkentésén keresztül járul hozzá a metabolikus szindrómához társuló emelkedett ritmuszavar-kiválthatóság redukációjához. A miokardiális *cGMP* és *NO* koncentráció *cikletanin* hatására létrejött növekedése, e molekulák fokozott szintézisén, esetleg csökkent lebontásán keresztül valósulhat meg. Korábbi kutatások már igazolták a *cikletanin* alacsony *K_m*-val rendelkező *cGMP PDE* enzimekre gyakorolt direkt gátló effektusát, azonban a *sGC*-ra, valamint a *NOS* enzimekre kifejtett stimuláló hatás igazolására, esetleg kizárására további tudományos vizsgálatok szükségesek.¹⁷³ Továbbá úgy gondoljuk, hogy a *cikletanin* kezelés eredményeként létrejött miokardiális *cAMP* szint csökkenés másodlagosan, a magas *cGMP* szint következményeként, *cGMP-dependens PDE*-enzimek aktiválásán keresztül jön létre.¹⁴⁸ A *cikletanin* antiaritmiás hatásának molekuláris

mechanizmusai feltehetőleg a korábbi fejezetben részletezett *cGMP*- és *NO*-dependens útvonalakon keresztül mennek végbe.

Ahogy korábban említettük, a referenciaszerként alkalmazott *sotalol* metabolikus szindrómás preklinikai modellünkben létrehozott antiaritmiás hatásának hátterében szintén a miokardiális akciós potenciál időtartamának prolongációja áll. Korábbi tanulmányok eredményei alapján azt gondoljuk, hogy a *sotalol* szelektív I_{Kr} gátló hatásán keresztül képes nyújtani az akciós potenciál időtartamát és ezáltal protektív hatást kifejteni a preklinikai modellünkben indukált aritmiák ellen.¹⁷⁴ Meg kell jegyeznünk, hogy az utóbbi jelenség tehető felelőssé a *sotalol* humán klinikumban gyakran tapasztalt, kedvezőtlen proaritmiás hatásáért, ami a farmakon terápiás alkalmazási körét az elmúlt években jelentős mértékben beszűkítette.¹⁷⁵

A *cikletanin* preklinikai modellünkben kifejtett kedvező kardiális hatásainak klinikai gyakorlatra való óvatos vonatkoztatásából azt feltételezzük, hogy a farmakon a humán metabolikus szindrómához társuló emelkedett proaritmiás kockázatot is számottevően képes csökkenteni. A farmakon jelen vizsgálatunkban megfigyelt antiaritmiás, valamint korábbi tanulmányokban igazolt antihipertenzív, anti-iszkémiás, és inzulinérzékenyítő hatásspektruma alapján jelentős esélyt látunk arra, hogy a *cikletanin* a jövőben a metabolikus szindróma gyógyszeres terápiás stratégiájának eszenciális részévé váljon.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az inzulinrezisztencián alapuló betegségekhez (*metabolikus szindróma, T2DM*) jelentősen emelkedett kardiovaszkuláris rizikó társul, azonban a kórállapotok kardiális aritmogenezisre gyakorolt hatásai jelenleg sem ismertek teljesen.

Kutatásainkban ezért célul tűztük ki, hogy preklinikai állatmodelleken megvizsgáljuk az inzulinrezisztencia legfontosabb klinikai stációinak (hiperinzulinémia, manifest inzulinrezisztencia) szerepét a kardiális aritmogenezisben, továbbá olyan farmakológiai lehetőségeket teszteljünk, amelyek előnyösen képesek befolyásolni a fenti állapotokhoz társuló ritmuszavar-kiválthatóságot.

Kísérletsorozataink vizsgálatait az adott kórállapot tüneteit stabilan expresszáló, *pacemaker* elektróddal krónikusan instrumentált, preklinikai állatmodelleken hajtottuk végre.

Elektrofiziológiai méréseinkkel igazoltuk, hogy a hiperinzulinémia és a metabolikus szindróma állapotai jelentős mértékben növelik a kamrai eredetű aritmiák kiválthatóságát és a folyamatban a *transzmurális repolarizációs diszperzitás* amplifikációjának alapvető szerepe van.

Biokémiai méréseink azt mutatják, hogy a hiperinzulinémához társuló fokozott ritmuszavar-kiválthatóság hátterében nem szisztémás szimpatikus túlsúly áll, azonban a *metoprolol* tanulmányunkban megfigyelt hatása alapján azt feltételezzük, hogy a hiperinzulinémiában tapasztalt emelkedett aritmia-indukálhatósághoz az adrenerg aktiváció jelentős mértékben hozzájárul. Ezentúl igazoltuk, hogy metabolikus szindrómában a miokardiális *cGMP* és *NO* szint csökkenés, valamint a *cAMP* koncentráció növekedés nagymértékben felelős a fokozott aritmogenitásért.

Eredményeinkből tisztán látszik, hogy a *metoprolol* kezelés a szelektív adrenerg gátláson keresztül előnyösen befolyásolja a hiperinzulinémiás állapothoz társuló emelkedett ritmuszavar-kiválthatóságot, továbbá az antihipertenzív, anti-iszkémiás és inzulinérzékenyítő hatással bíró *cikletanin* a miokardiális *cGMP* és *NO* szint emelésével, valamint a *cAMP* tartalom csökkentésével jelentősen képes redukálni a metabolikus szindrómához kapcsolódó megnövekedett aritmogenitást.

Preklinikai tanulmányunk elősegítheti az inzulinrezisztencián alapuló betegségekhez társuló kardiális aritmogenezis pontosabb megismerését, kórélettani hátterének részletes feltárását, továbbá a *metoprolol* és a *cikletanin* fenti kórállapotokra gyakorolt jótékony kardiális hatásainak igazolásával hozzájárulhat a jelenleg alkalmazott gyógyszeres terápiás stratégiák hatékonyabbá tételéhez.

SUMMARY

Insulin resistance as the most relevant cause of several metabolic diseases (*T2DM*, *metabolic syndrome*) is associated with increased cardiovascular risk; however its pivotal role in cardiac arrhythmogenesis has not been entirely clarified yet.

The principal purpose of the present study was to investigate the main preclinical and clinical phases of insulin resistance (hyperinsulinemia, manifest insulin resistance) in terms of cardiac arrhythmogenesis and to test potential pharmacological approaches, which can exert beneficial effects on arrhythmia-inducibility related to the abovementioned disorders.

The current set of experiments was carried out on chronically-instrumented animal models exhibiting reliably the cardinal signs and symptoms of the disorders.

According to the electrophysiological measurements, the conditions of hyperinsulinemia and metabolic syndrome increase significantly the inducibility of ventricular arrhythmias, moreover *transmural dispersion of repolarisation* plays essential role in the mechanisms.

The biochemical measurements prove that systemic sympathetic overactivity is not involved in the increased arrhythmogenicity in hyperinsulinemia, nevertheless adrenergic activation cannot be excluded in the phenomenon as shown by the significantly-reduced arrhythmia incidence in response to *metoprolol* administration. Furthermore, the deficit in myocardial *cGMP*, *NO* levels and increase on *cAMP* concentration is substantially responsible for the elevated incidence of ventricular arrhythmias induced by *programmed electrical stimulation* (*PES*) in metabolic syndrome.

It can be clearly seen from the results that *metoprolol* can influence beneficially the increased arrhythmogenicity associated with hyperinsulinemia via the selective blockade of the beta-adrenergic system, moreover *cicletanine* possessing antihypertensive, anti-ischemic and insulin-sensitizing effects, reduces significantly the elevated incidence of ventricular arrhythmias in metabolic syndrome through increasing the myocardial *cGMP*, *NO* levels and decreasing *cAMP* concentration.

Our preclinical study may promote the current knowledge regarding cardiac arrhythmogenesis in preclinical and clinical stages of insulin resistance by revealing the possible pathomechanisms of that. Furthermore, it may contribute to the widening of the pharmacological options in treatment of insulin resistance and comorbidities by demonstrating the beneficial cardiac effects of *metoprolol* and *cicletanine*.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Kolovou, G.D., Anagnostopoulou, K.K., Salpea, K.D. & Mikhailidis, D.P. The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *The American journal of the medical sciences* 333, 362-371 (2007).
2. Lann, D. & LeRoith, D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *The Medical clinics of North America* 91, 1063-1077, viii (2007).
3. Guariguata, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes research and clinical practice* 98, 524-525 (2012).
4. King, H. & Rewers, M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes care* 16, 157-177 (1993).
5. Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C. & Shaw, J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 94, 311-321 (2011).
6. Zimmet, P., Alberti, K.G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787 (2001).
7. Arredondo, A. Diabetes: a global challenge with high economic burden for public health systems and society. *American journal of public health* 103, e1-2 (2013).
8. Bloomgarden, Z.T. 2nd International Symposium on triglycerides and HDL: metabolic syndrome. *Diabetes care* 28, 2577-2584 (2005).
9. King, H., Aubert, R.E. & Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care* 21, 1414-1431 (1998).
10. Isomaa, B., *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes care* 24, 683-689 (2001).
11. Group, I.D.F.D.A. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2011. *Diabetes research and clinical practice* (2013).
12. Malik, S., *et al.* Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 110, 1245-1250 (2004).
13. Lahoz, C., *et al.* Metabolic syndrome and asymptomatic peripheral artery disease in subjects over 60 years of age. *Diabetes care* 29, 148-150 (2006).
14. Adabag, A.S., *et al.* Etiology of sudden death in the community: results of anatomical, metabolic, and genetic evaluation. *American heart journal* 159, 33-39 (2010).
15. Eckel, R.H., Grundy, S.M. & Zimmet, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415-1428 (2005).
16. Leroith, D. Pathophysiology of the metabolic syndrome: implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes. *The American journal of the medical sciences* 343, 13-16 (2012).
17. Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. & Guyton, J.R. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal* 149, 33-45 (2005).
18. Gallagher, E.J., Leroith, D. & Karnieli, E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 77, 511-523 (2010).
19. Einhorn, D., *et al.* American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 9, 237-252 (2003).

20. Li, J., Houseknecht, K.L., Stenbit, A.E., Katz, E.B. & Charron, M.J. Reduced glucose uptake precedes insulin signaling defects in adipocytes from heterozygous GLUT4 knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14, 1117-1125 (2000).
21. Reaven, G.M. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *American heart journal* 121, 1283-1288 (1991).
22. Nathan, D.M., *et al.* Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes care* 30, 753-759 (2007).
23. Svedberg, J., Bjorntorp, P., Smith, U. & Lonnroth, P. Effect of free fatty acids on insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in hepatocytes isolated from lean and obese rats. *Diabetes* 41, 294-298 (1992).
24. Marette, A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 5, 377-383 (2002).
25. Boden, G. Free fatty acids (FFA), a link between obesity and insulin resistance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 3, d169-175 (1998).
26. Bezaire, V., *et al.* Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 18282-18291 (2009).
27. Wasserman, D.H., Kang, L., Ayala, J.E., Fueger, P.T. & Lee-Young, R.S. The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *The Journal of experimental biology* 214, 254-262 (2011).
28. Chavez, J.A., *et al.* A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 10297-10303 (2003).
29. Taniguchi, C.M., *et al.* Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ /zeta. *Cell metabolism* 3, 343-353 (2006).
30. Puigserver, P., *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 423, 550-555 (2003).
31. Bergman, R.N., *et al.* Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 49, 119-126 (2001).
32. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S. & Bastard, J.P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & metabolism* 34, 2-11 (2008).
33. Tarkowski, A., Bjersing, J., Shestakov, A. & Bokarewa, M.I. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 1419-1431 (2010).
34. Sheng, C.H., *et al.* Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine* 33, 135-143 (2008).
35. Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L. & Spiegelman, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 95, 2409-2415 (1995).
36. Weisberg, S.P., *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112, 1796-1808 (2003).
37. Devaraj, S., Rosenson, R.S. & Jialal, I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 33, 431-453, table of contents (2004).

38. Matsuzawa, Y., Funahashi, T., Kihara, S. & Shimomura, I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 29-33 (2004).
39. Yamauchi, T., *et al.* Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 3, 243-254 (2003).
40. Chahil, T.J. & Ginsberg, H.N. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 35, 491-510, vii-viii (2006).
41. Schwarz, J.M., Linfoot, P., Dare, D. & Aghajanian, K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American journal of clinical nutrition* 77, 43-50 (2003).
42. Merkel, M., Eckel, R.H. & Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of lipid research* 43, 1997-2006 (2002).
43. Altomonte, J., *et al.* Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *The Journal of clinical investigation* 114, 1493-1503 (2004).
44. Packard, C.J. LDL subfractions and atherogenicity: an hypothesis from the University of Glasgow. *Current medical research and opinion* 13, 379-390 (1996).
45. Horowitz, B.S., *et al.* Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *The Journal of clinical investigation* 91, 1743-1752 (1993).
46. de Jongh, R.T., Serne, E.H., Ijzerman, R.G., de Vries, G. & Stehouwer, C.D. Free fatty acid levels modulate microvascular function: relevance for obesity-associated insulin resistance, hypertension, and microangiopathy. *Diabetes* 53, 2873-2882 (2004).
47. Kim, J.A., Montagnani, M., Koh, K.K. & Quon, M.J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113, 1888-1904 (2006).
48. Kuroda, S., *et al.* Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *Journal of human hypertension* 13, 257-262 (1999).
49. Egan, B.M. Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Current hypertension reports* 5, 247-254 (2003).
50. Kohlstedt, K., Trouvain, C., Namgaladze, D. & Fleming, I. Adipocyte-derived lipids increase angiotensin-converting enzyme (ACE) expression and modulate macrophage phenotype. *Basic research in cardiology* 106, 205-215 (2011).
51. Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104, 569-580 (2001).
52. Patterson, E., Szabo, B., Scherlag, B.J. & Lazzara, R. Early and delayed afterdepolarizations associated with cesium chloride-induced arrhythmias in the dog. *Journal of cardiovascular pharmacology* 15, 323-331 (1990).
53. Volders, P.G., *et al.* Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovascular research* 46, 376-392 (2000).
54. January, C.T. & Riddle, J.M. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circulation research* 64, 977-990 (1989).
55. Shimizu, W., Tanaka, K., Suenaga, K. & Wakamoto, A. Bradycardia-dependent early afterdepolarizations in a patient with QTU prolongation and torsade de pointes in association with marked bradycardia and hypokalemia. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 14, 1105-1111 (1991).
56. Vos, M.A., *et al.* Enhanced susceptibility for acquired torsade de pointes arrhythmias in the dog with chronic, complete AV block is related to cardiac hypertrophy and electrical remodeling. *Circulation* 98, 1125-1135 (1998).

57. Joung, B., *et al.* Delayed afterdepolarization in intact canine sinoatrial node as a novel mechanism for atrial arrhythmia. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 22, 448-454 (2011).
58. Priori, S.G. & Corr, P.B. Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *The American journal of physiology* 258, H1796-1805 (1990).
59. Xie, J.T., Cunningham, P.M. & January, C.T. Digoxin-induced delayed afterdepolarizations: biphasic effects of digoxin on action potential duration and the Q-T interval in cardiac Purkinje fibers. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 17, 113-120 (1995).
60. Jiang, D., *et al.* RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca^{2+} release (SOICR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13062-13067 (2004).
61. Antzelevitch, C. Basic mechanisms of reentrant arrhythmias. *Current opinion in cardiology* 16, 1-7 (2001).
62. Mahmud, R., Tchou, P.J., Denker, S.T., Lehmann, M.H. & Akhtar, M. Functional characteristics of human macro-reentry: a study of "pre-excited" circuits by extrastimulus method. *Journal of the American College of Cardiology* 8, 1073-1081 (1986).
63. Wit, A.L. & Cranefield, P.F. Reentrant excitation as a cause of cardiac arrhythmias. *The American journal of physiology* 235, H1-17 (1978).
64. Main, M.C., Bryant, S.M. & Hart, G. Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Experimental physiology* 83, 747-761 (1998).
65. Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P. & Nattel, S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circulation research* 90, 939-950 (2002).
66. Anyukhovskiy, E.P., Sosunov, E.A., Gainullin, R.Z. & Rosen, M.R. The controversial M cell. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 10, 244-260 (1999).
67. Sicouri, S. & Antzelevitch, C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circulation research* 68, 1729-1741 (1991).
68. Antzelevitch, C. M cells in the human heart. *Circulation research* 106, 815-817 (2010).
69. Sicouri, S. & Antzelevitch, C. Electrophysiologic characteristics of M cells in the canine left ventricular free wall. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 6, 591-603 (1995).
70. Liu, D.W. & Antzelevitch, C. Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circulation research* 76, 351-365 (1995).
71. Zygmunt, A.C., Eddlestone, G.T., Thomas, G.P., Nesterenko, V.V. & Antzelevitch, C. Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 281, H689-697 (2001).
72. Zygmunt, A.C., Goodrow, R.J. & Antzelevitch, C. $\text{I}(\text{NaCa})$ contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278, H1671-1678 (2000).

73. Antzelevitch, C. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, H2024-2038 (2007).
74. Xue, J., Chen, Y., Han, X. & Gao, W. Electrocardiographic morphology changes with different type of repolarization dispersions. *Journal of electrocardiology* 43, 553-559 (2010).
75. Antzelevitch, C. & Oliva, A. Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes. *Journal of internal medicine* 259, 48-58 (2006).
76. Ueda, N., Zipes, D.P. & Wu, J. Functional and transmural modulation of M cell behavior in canine ventricular wall. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H2569-2575 (2004).
77. Extramiana, F. & Antzelevitch, C. Amplified transmural dispersion of repolarization as the basis for arrhythmogenesis in a canine ventricular-wedge model of short-QT syndrome. *Circulation* 110, 3661-3666 (2004).
78. Antzelevitch, C. Heterogeneity and cardiac arrhythmias: an overview. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 4, 964-972 (2007).
79. Lukas, A. & Antzelevitch, C. Phase 2 reentry as a mechanism of initiation of circus movement reentry in canine epicardium exposed to simulated ischemia. *Cardiovascular research* 32, 593-603 (1996).
80. Killeen, M.J., Sabir, I.N., Grace, A.A. & Huang, C.L. Dispersions of repolarization and ventricular arrhythmogenesis: lessons from animal models. *Progress in biophysics and molecular biology* 98, 219-229 (2008).
81. Wilhelms, M., Rombach, C., Scholz, E.P., Dossel, O. & Seemann, G. Impact of amiodarone and cisapride on simulated human ventricular electrophysiology and electrocardiograms. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 14 Suppl 5, v90-v96 (2012).
82. Yan, G.X. & Antzelevitch, C. Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation* 98, 1928-1936 (1998).
83. Antzelevitch, C., *et al.* The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 10, 1124-1152 (1999).
84. Emori, T. & Antzelevitch, C. Cellular basis for complex T waves and arrhythmic activity following combined I(Kr) and I(Ks) block. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 12, 1369-1378 (2001).
85. Yamaguchi, M., *et al.* T wave peak-to-end interval and QT dispersion in acquired long QT syndrome: a new index for arrhythmogenicity. *Clinical science* 105, 671-676 (2003).
86. Xia, Y., *et al.* In vivo validation of the coincidence of the peak and end of the T wave with full repolarization of the epicardium and endocardium in swine. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2, 162-169 (2005).
87. Mullard, A. The long Avandia endgame. *Lancet* 378, 113 (2011).
88. Sokos, G.G., Nikolaidis, L.A., Mankad, S., Elahi, D. & Shannon, R.P. Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure* 12, 694-699 (2006).

89. Shiuchi, T., *et al.* ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension* 40, 329-334 (2002).
90. Group, H.T.C. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *European heart journal* 34, 1279-1291 (2013).
91. Colwell, J.A. Antiplatelet agents for the prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 4, 87-106 (2004).
92. Antman, E.M., *et al.* 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration With the Canadian Cardiovascular Society endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing on Behalf of the 2004 Writing Committee. *Circulation* 117, 296-329 (2008).
93. Aronow, W.S., *et al.* ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents developed in collaboration with the American Academy of Neurology, American Geriatrics Society, American Society for Preventive Cardiology, American Society of Hypertension, American Society of Nephrology, Association of Black Cardiologists, and European Society of Hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* 5, 259-352 (2011).
94. Bahn Chair, R.S., *et al.* Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 21, 593-646 (2011).
95. Hazard, P.B. & Burnett, C.R. Treatment of multifocal atrial tachycardia with metoprolol. *Critical care medicine* 15, 20-25 (1987).
96. Shah, M. & Carter, C. Long QT syndrome: A therapeutic challenge. *Annals of pediatric cardiology* 1, 18-26 (2008).
97. Malherbe, E., *et al.* Antihypertensive profile of cicletanine, a furopyridine derivative: comparison with captopril, indapamide and prazosin. *Pharmacological research communications* 20 Suppl 3, 121-133 (1988).
98. Castro, A., Parra, L. & Fuentes, J.A. Studies on the mechanism of action of the antihypertensive agent cicletanine. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 82 Spec No 4, 51-54 (1989).
99. Peitl, B., Nemeth, J., Pankucsi, C. & Szilvassy, Z. Insulin sensitization induced by oral cicletanine in conscious rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 373, 429-439 (2006).
100. Criniti, A., *et al.* Cicletanine prevents the excitation-conduction blocks induced by terfenadine in ischemic myocardium. *European journal of pharmacology* 382, 197-205 (1999).
101. Jouve, R., *et al.* Cicletanide improves outcome after left circumflex coronary artery occlusion-reperfusion in the dog. *Journal of cardiovascular pharmacology* 8, 208-215 (1986).

102. Tosaki, A., Koltai, M., Willoughby, D.A. & Braquet, P. Effect of cicletanine on reperfusion-induced arrhythmias and ion shifts in isolated rat hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology* 15, 218-226 (1990).
103. Ferdinandy, P., Szilvassy, Z., Droy-Lefaix, M.T., Tarrade, T. & Koltai, M. KATP channel modulation in working rat hearts with coronary occlusion: effects of cromakalim, cicletanine, and glibenclamide. *Cardiovascular research* 30, 781-787 (1995).
104. Postema, P.G., De Jong, J.S., Van der Bilt, I.A. & Wilde, A.A. Accurate electrocardiographic assessment of the QT interval: teach the tangent. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 5, 1015-1018 (2008).
105. Antzelevitch, C. T peak-Tend interval as an index of transmural dispersion of repolarization. *European journal of clinical investigation* 31, 555-557 (2001).
106. Laurita, K.R., Girouard, S.D., Akar, F.G. & Rosenbaum, D.S. Modulated dispersion explains changes in arrhythmia vulnerability during premature stimulation of the heart. *Circulation* 98, 2774-2780 (1998).
107. Laurita, K.R. & Rosenbaum, D.S. Interdependence of modulated dispersion and tissue structure in the mechanism of unidirectional block. *Circulation research* 87, 922-928 (2000).
108. Walker, M.J., *et al.* The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovascular research* 22, 447-455 (1988).
109. DeFronzo, R.A., Tobin, J.D. & Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology* 237, E214-223 (1979).
110. Smith, D., *et al.* In vivo glucose metabolism in the awake rat: tracer and insulin clamp studies. *Metabolism: clinical and experimental* 36, 1167-1174 (1987).
111. Szilvassy, Z., *et al.* Cicletanine attenuates overdrive pacing-induced global myocardial ischemia in rabbits: possible role of cardiac cyclic nucleotides. *Coronary artery disease* 4, 443-452 (1993).
112. Guinot, P., Jewitt-Harris, J. & Tarrade, T. Determination of the optimal dose of the antihypertensive drug cicletanine hydrochloride in man. *Arzneimittel-Forschung* 39, 86-89 (1989).
113. Jordaens, L.J., Palmer, A. & Clement, D.L. Low-dose oral sotalol for monomorphic ventricular tachycardia: effects during programmed electrical stimulation and follow-up. *European heart journal* 10, 218-226 (1989).
114. Masaki, E. & Kondo, I. Methylene blue, a soluble guanylyl cyclase inhibitor, reduces the sevoflurane minimum alveolar anesthetic concentration and decreases the brain cyclic guanosine monophosphate content in rats. *Anesthesia and analgesia* 89, 484-489 (1999).
115. Mayer, B., Brunner, F. & Schmidt, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochemical pharmacology* 45, 367-374 (1993).
116. Hearse, D.J. Myocardial cyclic AMP determinations: the importance of rapidity of sample freezing. *Journal of molecular and cellular cardiology* 15, 653-657 (1983).
117. Egan, B.M., Greene, E.L. & Goodfriend, T.L. Insulin resistance and cardiovascular disease. *American journal of hypertension* 14, 116S-125S (2001).
118. Olsson, P.O., Jorfeldt, L., Arnqvist, H. & Gerhardsson, P. Pre- and postprandial hyperinsulinemia during insulin pump treatment; role of the subcutaneous bolus and basal infusion. *Diabetes research* 16, 55-61 (1991).
119. Lutt, W.W., Wang, X., Sadri, P., Legare, D.J. & Macedo, M.P. Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Canadian journal of physiology and pharmacology* 76, 1080-1086 (1998).

120. Lindstrom, T., Jorfeldt, L., Tegler, L. & Arnqvist, H.J. Hypoglycaemia and cardiac arrhythmias in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 9, 536-541 (1992).
121. Sufke, S., Djonlagic, H. & Kibbel, T. [Impairment of cardiac autonomic nervous system and incidence of arrhythmias in severe hyperglycemia]. *Medizinische Klinik* 105, 858-870 (2010).
122. Regueiro-Purrinos, M., *et al.* Ventricular arrhythmias and mortality associated with isoflurane and sevoflurane in a porcine model of myocardial infarction. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 50, 73-78 (2011).
123. Huang, H.C., *et al.* Protection by scoparone against the alterations of plasma lipoproteins, vascular morphology and vascular reactivity in hyperlipidaemic diabetic rabbit. *British journal of pharmacology* 110, 1508-1514 (1993).
124. Aragno, M., *et al.* Cardiac impairment in rabbits fed a high-fat diet is counteracted by dehydroepiandrosterone supplementation. *Life sciences* 85, 77-84 (2009).
125. Helfenstein, T., *et al.* Impaired glucose tolerance plus hyperlipidaemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *International journal of experimental pathology* 92, 40-49 (2011).
126. Enser, M. Clearing-factor lipase in obese hyperglycaemic mice (ob-ob). *The Biochemical journal* 129, 447-453 (1972).
127. Chen, H., *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495 (1996).
128. Scarda, A., *et al.* Increased adipogenic conversion of muscle satellite cells in obese Zucker rats. *International journal of obesity* 34, 1319-1327 (2010).
129. Panchal, S.K. & Brown, L. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 351982 (2011).
130. Sampey, B.P., *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 19, 1109-1117 (2011).
131. Antzelevitch, C., *et al.* Does Tpeak-Tend provide an index of transmural dispersion of repolarization? *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 4, 1114-1116; author reply 1116-1119 (2007).
132. Aulbach, F., *et al.* Insulin stimulates the L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 42, 113-120 (1999).
133. Maier, S., *et al.* Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovascular research* 44, 390-397 (1999).
134. Ballard, C., Mozaffari, M. & Schaffer, S. Signal transduction mechanism for the stimulation of the sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger by insulin. *Molecular and cellular biochemistry* 135, 113-119 (1994).
135. Laitinen, T., *et al.* Prolonged corrected QT interval is associated with acute and chronic hyperinsulinemia in nondiabetic subjects. *Diabetes care* 26, 2480-2481 (2003).
136. Cui, J., Melman, Y., Palma, E., Fishman, G.I. & McDonald, T.V. Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Current biology : CB* 10, 671-674 (2000).
137. Thomas, D., *et al.* Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovascular research* 59, 14-26 (2003).
138. Zhang, Y., *et al.* Restoring depressed HERG K⁺ channel function as a mechanism for insulin treatment of abnormal QT prolongation and associated arrhythmias in diabetic

- rabbits. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291, H1446-1455 (2006).
139. Shimizu, W. & Antzelevitch, C. Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome: effects of beta-adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation* 98, 2314-2322 (1998).
 140. Giles, W.R. & Imaizumi, Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *The Journal of physiology* 405, 123-145 (1988).
 141. Iwata, H., Kodama, I., Suzuki, R., Kamiya, K. & Toyama, J. Effects of long-term oral administration of amiodarone on the ventricular repolarization of rabbit hearts. *Japanese circulation journal* 60, 662-672 (1996).
 142. McGovern, B. Hypokalemia and cardiac arrhythmias. *Anesthesiology* 63, 127-129 (1985).
 143. Szilvassy, Z., Csont, T., Pali, T., Droy-Lefaix, M.T. & Ferdinandy, P. Nitric oxide, peroxynitrite and cGMP in atherosclerosis-induced hypertension in rabbits: beneficial effects of cicletanine. *Journal of vascular research* 38, 39-46 (2001).
 144. Lohmann, S.M., Fischmeister, R. & Walter, U. Signal transduction by cGMP in heart. *Basic research in cardiology* 86, 503-514 (1991).
 145. Barouch, L.A., *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337-339 (2002).
 146. Tsai, E.J. & Kass, D.A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 122, 216-238 (2009).
 147. Massion, P.B., Feron, O., Dessy, C. & Balligand, J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circulation research* 93, 388-398 (2003).
 148. Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D. & Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews* 62, 525-563 (2010).
 149. Gonzalez, D.R., Treuer, A., Sun, Q.A., Stamler, J.S. & Hare, J.M. S-Nitrosylation of cardiac ion channels. *Journal of cardiovascular pharmacology* 54, 188-195 (2009).
 150. Kumar, R., Namiki, T. & Joyner, R.W. Effects of cGMP on L-type calcium current of adult and newborn rabbit ventricular cells. *Cardiovascular research* 33, 573-582 (1997).
 151. Wang, Y., Wagner, M.B., Joyner, R.W. & Kumar, R. cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovascular research* 48, 310-322 (2000).
 152. Mery, P.F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. & Fischmeister, R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *The Journal of biological chemistry* 268, 26286-26295 (1993).
 153. Taglialatela, M., Pannaccione, A., Iossa, S., Castaldo, P. & Annunziato, L. Modulation of the K(+) channels encoded by the human ether-a-gogo-related gene-1 (hERG1) by nitric oxide. *Molecular pharmacology* 56, 1298-1308 (1999).
 154. Shimizu, W. & Antzelevitch, C. Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 778-786 (2000).
 155. Salata, J.J., *et al.* IK of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for IKs. *The American journal of physiology* 271, H2477-2489 (1996).
 156. Cheng, J., *et al.* Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K⁺ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilideclass III agents. *Cardiovascular research* 43, 135-147 (1999).

157. Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes/metabolism reviews* 4, 437-451 (1988).
158. Haidara, M.A., Yassin, H.Z., Rateb, M., Ammar, H. & Zorkani, M.A. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Current vascular pharmacology* 4, 215-227 (2006).
159. Ziegler, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes/metabolism reviews* 10, 339-383 (1994).
160. Kim, D. & Duff, R.A. Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circulation research* 67, 1040-1046 (1990).
161. Yamada, K.A., Kanter, E.M. & Newatia, A. Long-chain acylcarnitine induces Ca²⁺ efflux from the sarcoplasmic reticulum. *Journal of cardiovascular pharmacology* 36, 14-21 (2000).
162. Ferro, F., *et al.* Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel. *PloS one* 7, e41686 (2012).
163. Shimizu, M., *et al.* Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *Journal of clinical pathology* 46, 32-36 (1993).
164. van Heerebeek, L., *et al.* Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117, 43-51 (2008).
165. de Jong, S., van Veen, T.A., van Rijen, H.V. & de Bakker, J.M. Fibrosis and cardiac arrhythmias. *Journal of cardiovascular pharmacology* 57, 630-638 (2011).
166. Zipes, D.P. The long QT interval syndrome. A Rosetta stone for sympathetic related ventricular tachyarrhythmias. *Circulation* 84, 1414-1419 (1991).
167. Shimizu, W., *et al.* Differential effects of beta-blockade on dispersion of repolarization in the absence and presence of sympathetic stimulation between the LQT1 and LQT2 forms of congenital long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 1984-1991 (2002).
168. Totterman, K., *et al.* Effect of beta-blocking drugs on beta-cell function and insulin sensitivity in hypertensive non-diabetic patients. *European journal of clinical pharmacology* 26, 13-17 (1984).
169. Garrett, B.N., Raskin, P. & Kaplan, N.M. Metoprolol in diabetes mellitus: effect on glucose homeostasis. *Clinical science* 59 Suppl 6, 469s-472s (1980).
170. Jouve, R., *et al.* Effects of cicletanine in the left circumflex coronary artery occlusion-reperfusion canine model of sudden death: analysis of 107 experiments using Cox's proportional hazards model. *Drugs under experimental and clinical research* 14, 167-179 (1988).
171. Tosaki, A., Hellegouarch, A. & Braquet, P. Cicletanine and reperfusion injury: is there any correlation between arrhythmias, 6-keto-PGF1 alpha, thromboxane B2, and myocardial ion shifts (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺) induced by ischemia/reperfusion in isolated rat heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 17, 551-559 (1991).
172. Koltai, M., *et al.* Effect of cicletanine on reperfusion-induced arrhythmias and myocardial ion contents: a comparison with furosemide. *European heart journal* 13, 395-403 (1992).
173. Silver, P.J., Buchholz, A., Dundore, R.L., Harris, A.L. & Pagani, E.D. Inhibition of low Km cyclic GMP phosphodiesterases and potentiation of guanylate cyclase activators by cicletanine. *Journal of cardiovascular pharmacology* 16, 501-505 (1990).

174. Varro, A., Nanasi, P.P. & Lathrop, D.A. Effect of sotalol on transmembrane ionic currents responsible for repolarization in cardiac ventricular myocytes from rabbit and guinea pig. *Life sciences* 49, PL7-12 (1991).
175. Waldo, A.L., *et al.* Survival with oral d-sotalol in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: rationale, design, and methods (the SWORD trial). *The American journal of cardiology* 75, 1023-1027 (1995).

Iktatószám: DEENKÉTK/198/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Drimba László

Neptun kód: WNR7OS

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Drimba, L.**, Döbrönte, R., Hegedűs, C., Sári, R., Di, Y., Nemeth, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: The role of acute hyperinsulinemia in the development of cardiac arrhythmias.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 386 (5), 435-444, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-013-0845-4>
IF:2.647 (2011)
2. **Drimba, L.**, Hegedűs, C., Yin, D., Sári, R., Németh, J., Szilvássy, Z., Peitl, B.: Beneficial Cardiac Effects of Cicletanine in Conscious Rabbits With Metabolic Syndrome.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 60 (2), 208-218, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825c3c4c>
IF:2.287 (2011)



További Közlemények

3. **Drimba, L.**, Németh, J., Sári, R., Di, Y., Kovács, A., Szénási, G., Szilvássy, Z., Peitl, B.: In vivo preclinical evaluation of a promising antiarrhythmic agent, EGIS-7229.
Drug Dev. Res. 74 (3), 173-185, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ddr.21058>
IF:1.193 (2011)
4. Hevér, T., Németh, N., Bráth, E., Tóth, L., Kiss, F., Sajtos, E., Mátyás, L., Szaszko, J., **Drimba, L.**, Peitl, B., Csiki, Z., Mikó, I., Furka, I.: Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunts in the rat model.
Microsurgery. 30 (8), 649-656, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20784>
IF:1.555
5. Peitl, B., Döbrönte, R., **Drimba, L.**, Sári, R., Varga, A., Németh, J., Pázmány, T., Szilvássy, Z.: Involvement of cholecystokinin in baseline and post-prandial whole body insulin sensitivity in rats.
Eur. J. Pharmacol. 644 (1-3), 251-256, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.062>
IF:2.737

Összesített impakt faktor: 10.419

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.934

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.27.



8. TÁRGYSZAVAK

inzulinrezisztencia
hiperinzulinémia
metabolikus szindróma
kardiális aritmogenezis
szívritmuszavar
preklinikai állatmodell
programozott elektromos ingerlés
transzmurális repolarizációs diszperzitás
metoprolol
cikletanin
nitrogén-monoxid (NO)
ciklikus nukleotid (cGMP, cAMP)

KEYWORDS

insulin resistance
hyperinsulinemia
metabolic syndrome
cardiac arrhythmogenesis
rhythm disturbance
preclinical animal model
programmed electrical stimulation
transmural dispersion of repolarisation
metoprolol
cicletanine
nitric oxide (NO)
cyclic nucleotide (cGMP, cAMP)

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Peitl Barnának, aki széleskörű ismereteivel és céltudatos iránymutatásával lehetővé tette, hogy sikeresen kivitelezsem tudományos munkámat és elkészíthessem disszertációm.

Kiemelt köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, aki szakmai iránymutatásával felbecsülhetelen segítséget nyújtott kísérleteim elvégzésében, továbbá széles tudományos látóköre, valamint a kardiovaszkuláris farmakológia területén szerzett tapasztalatai mindig megoldást jelentettek a munkám során felmerülő elméleti és gyakorlati problémákra.

Külön köszönettel tartozom Dr. Németh Józsefnek, Dr. Pórszász Róbertnek és Dr. Sári Rékának, akik áldozatos munkájukkal, szakmai tanácsaikkal, logikus érveléseikkel folyamatosan támogattak tudományos munkám sikeres kivitelezésében.

Segítőkézségükért külön köszönet illeti a munkacsoportunk minden tagját, illetve a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársait: Hegedüs Csaba, Marics Balázs, Szegváriné Erdős Andrea, Hatvaniné Molnár Ilona, Szöllősi Éva, Szalai Andrea, Vatler Gabriella, Tömöri Zsolt.

Elmondhatatlanul hálás vagyok feleségemnek és kislányomnak, akik szeretetükkel mindvégig és töretlenül támogattak céljaim elérésében.

Hálával tartozom szüleimnek, akik odaadó munkájukkal és szeretetükkel lehetővé tették, hogy valóra válthassam gyermekkori álmaim.

10. FÜGGELÉK