

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A Protein Kináz G jelátviteli útvonal vizsgálata ateroszklerózis és diabétesz mellitusz talaján kialakult kardiális diszfunkcióban

Dr. Priksz Dániel

TÉMAVEZETŐ: Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2019

**A PROTEIN KINÁZ G JELÁTVITELI ÚTVONAL VIZSGÁLATA
ATEROSZKLERÓZIS ÉS DIABÉTESZ MELLITUSZ TALAJÁN KIALAKULT
KARDIÁLIS DISZFUNKCIÓBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Gyógyszerészeti Tudományok tudományágban

Írta: Dr. Priksz Dániel okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Juhász Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok:	Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
	Dr. Tóth E. Béla, PhD

A doktori szigorlat időpontja:	2019. június 4., 11.00
	Debreceni Egyetem ÁOK
	Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

	Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
	Dr. Deák Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
	Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
	Dr. Deák Ádám, PhD
	Dr. Tóth E. Béla, PhD

Az értekezés védésének időpontja:	2019. június 4., 13.30
	Debreceni Egyetem ÁOK
	Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika előadóterme

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések	1
1.1.	Kardiális diszfunkció és szívelégtelenség.....	1
1.2.	Célkitűzések	4
2.	Anyagok és módszerek	5
2.1.	A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell.....	5
2.2.	A Goto-Kakizaki patkánymodell-tanulmány kísérleti protokollja	5
2.3.	A hiperkoleszterinémias (HC) nyúl modell	6
2.4.	A nyúlmodell kísérletek protokollja	6
2.5.	Vegyszerek.....	7
2.6.	Morfometria, vérvétel és metabolikus paraméterek	7
2.7.	Echokardiográfia.....	9
2.8.	Vaszkuláris mérések.....	11
2.9.	Szöveti vizsgálatok.....	12
2.10.	Western blot	12
2.11.	cGMP-szint meghatározása.....	14
2.12.	Statisztikai elemzések	14
3.	Eredmények.....	16
3.1.	A Goto-Kakizaki patkánymodell-kísérletek eredményei	16
3.1.1.	Metabolikus paraméterek	16
3.1.2.	Endothel-függő vazorelaxáció	16
3.1.3.	Echokardiográfia	17
3.1.4.	Western blot	17

3.2.	A nyúlmodell-kísérletek eredményei	18
3.2.1.	Echokardiográfia	18
3.2.2.	Morfometria	19
3.2.3.	Szérum paraméterek.....	19
3.2.4.	Endothel-függő vazorelaxáció és PDE9 expresszió az aortában	20
3.2.5.	Szövettani festések	20
3.2.6.	Western blot és miokardiális cGMP-szint	21
4.	Megbeszélés	22
4.1.	A Goto-Kakizaki patkánymodell eredményeinek megbeszélése	22
4.2.	A HC nyúl modell eredményeinek megbeszélése	23
5.	Összefoglalás.....	26
6.	Az értekezés új tudományos eredményei.....	27
7.	Saját közlemények jegyzéke	28
8.	Köszönetnyilvánítás	32

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. Kardiális diszfunkció és szívelégtelenség

Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben az orvostudomány jelentős eredményeket ért el a kardiovaszkuláris mortalitás csökkentésében, továbbra is folyamatos az igény a betegségek patomechanizmusának mélyebb megértésére, illetve hatékonyabb gyógyszerek és terápiás eljárások fejlesztésére.

A szívelégtelenség egy klinikai szindróma, melyet tipikusan olyan szubjektív tünetek mint a légszomj, fáradtság-érzés és lábdagadás, valamint olyan diagnosztikus jelek mint a megnövekedett juguláris vénás nyomás, perifériás ödéma és pulmonális zörejek jellemeznek. A *kardiális diszfunkció* a szívelégtelenség prekursora, és a mögöttes funkcionális elváltozásra utal, mely már a manifeszt tünetek megjelenése előtt fennáll. A szívelégtelenség becsült prevalenciája a felnőtt populációban 1-2% körüli (~38 millió páciens), mortalitása igen magas, a 10 éves túlélés mindössze 10 %. Számtalan kórkép okozhat szívelégtelenséget, azonban népegészségügyi szempontból a legjelentősebb okok a diabétesz mellitusz, illetve az ateroszklerózis.

A diabétesz mellitusz (DM, a továbbiakban: diabétesz) a szívelégtelenség kialakulásának meghatározó kockázati tényezője, függetlenül az életkortól, a fennálló hipertóniától vagy koronária-betegségtől. Habár a megfelelő glükózkontroll csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót, a szív-érrendszeri megbetegedések előfordulása magasabb a diabéteszes populációban, és mintegy 2-5-szörös a szívelégtelenség kockázata. Definíció-szerűen a diabéteszes kardiomiopátia (DKM) olyan bal kamrai diszfunkció, mely az egyéb rizikófaktoroktól függetlenül alakul ki cukorbetegben, és leggyakrabban diasztolés diszfunkcióval és szívizom-hipertrófiával jár, illetve, előrehaladott állapotban szisztolés funkcióromlás is kíséri. A DKM patofiziológiájához számos körülmény hozzájárul, úgymint metabolikus eltérések, autonóm idegrendszeri károsodás, inflammáció és oxidatív stressz. Az elérhető friss tanulmányok szerint a

legfontosabb folyamatok a mitokondriális károsodás, az endoplazmatikus retikulumot ért stressz (ER-stressz) és a kalcium-homeosztázis zavarai. Jelenleg nem áll rendelkezésre specifikus gyógyszer sem a diabéteszes kardiomiopátia, sem a diasztolés funkcióromlás kezelésére.

Az ateroszklerózis következtében kialakuló koronária-artéria betegség (CAD) és iszkémiás szívbetegség (ISZB) a szívelégtelenség leggyakoribb oka és legfőbb rizikófaktora, a hipertónia mellett. Becslések szerint a szívelégtelenségben szenvedő páciensek 70%-ában koronária-betegség áll fenn, és az esetek legalább 50 %-ában a CAD a szívelégtelenség primer oka. A diszlipidémia már önmagában, AMI indukálása nélkül is a szívelégtelenség kockázati tényezőjének tekinthető. Az emelkedett szérum koleszterin-szint közvetlenül is összefüggésbe hozható a hipertóniával, a megnövekedett érfali merevséggel, illetve az emelkedett bal kamrai tömeggel és falvastagsággal. Aterogén étrenden tartott állatmodellekből származó kísérletes bizonyítékok alapján pedig a hiperkoleszterinémia szisztolés és diasztolés diszfunkciót is okoz.

Az utóbbi évtized tanulmányai alapján az endothel-diszfunkció és a cGMP-PKG rendszer szerepe hangsúlyosnak tűnik a kardiális diszfunkció patomechanizmusában. A cGMP-PKG szignalizációs kaszkád kardioprotektív útvonalak aktivitását növeli, így farmakológiai befolyásolása terápiás lehetőségeket kínál. A cGMP-PKG rendszer nitrogén-monoxid (NO), vagy natriuretikus peptid (NP) útvonalon történő aktiválása vazodilatatív és vaszkuloprotektív hatásokat közvetít, amely már önmagában kedvező a szívizomra mind iszkémiás, mind nyomás-vagy volumenterhelt állapotokban. E hatások mellett az utóbbi évek kutatásai megerősítik a cGMP-PKG rendszer direkt miokardiális anti-remodellációs és diasztológiát befolyásoló szerepét. A PKG foszforilációs célpontjai a hipertrófia gátlásán kívül egyéb, főként a szívizom relaxációját meghatározó folyamatokban is részt vesznek. A PKG a titin N2-bus régiójában található specifikus aminosavak foszforilálásával befolyásolja a fehérje elaszticitását, ezáltal csökkenti a miofibrillumok passzív feszülését, merevségét.

Ugyanakkor bizonyított az is, hogy a cGMP-PKG rendszer aktiválása képes a foszfolambán szabályzó-fehérje foszforilálására, így a SERCA pumpa működésének serkentésére, ezáltal hozzájárulva a kardiomiociták elernyedési funkciójához.

Az intracelluláris cAMP és cGMP szintjét a foszfodiészteráz enzimek (PDE-k) regulálják. A PDE-k gátlásával létrehozott cGMP-szint emelkedés kardioprotektív hatása terápiásan kiaknázható szívelégtelenségben és pulmonális hipertóniában. Az útvonallal kapcsolatos legújabb eredmény a PDE9A enzim szerepének igazolása. A PDE9A elsősorban a natriuretikus peptid útvonalon létrejövő cGMP lebontásáért felelős, és *up-regulálódik* a humán miokardiumban hipertrófia és szívelégtelenség fennállásakor. A PDE9A gátlása ugyanakkor visszafordíthatja a nyomásnövekedés következtében kísérletesen kialakított szívbetegséget, NO-független útvonalon. Az enzim expresszióját ateroszklerózis és diabétesz kapcsán azonban még nem vizsgálták.

A kismolekulájú BGP-15 jelű gyógyszerjelölt (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) magyar eredetű originális molekula. A BGP-15 jelenleg váz- és szívizom hatásai miatt tart számot a legnagyobb tudományos érdeklődésre, az utóbbi években ilyen témájú publikációk igen rangos folyóiratokban jelentek meg. Izomdisztrófiában szenvedő, *mdx* egereken *Gehrig és mtsai* (Nature, 2012) leírták, hogy a BGP-15-kezelés javította az izomerőt és a kontraktilitást harántcsíkolt izmokon, csökkentette a kyphosist, továbbá megnövelte az állatok élettartamát, amelyet a hsp72 hősokk-fehérje indukálásával és a SERCA pumpa funkciójának megőrzésével magyaráztak. *Sapra és mtsai* (Nature Communications, 2014) transzgénikus, szívelégtelen-pitvarfibrilláló egérmodellt hoztak létre, melyen 4 hétig tartó (napi 15 mg/ttkg) BGP-15-kezelés csökkentette a pitvar megnagyobbodását, szignifikánsan javította a szisztolés funkciót, csökkentette a kollagén-1 expressziót, továbbá megelőzte az aritmiák kialakulását. A fenti két vizsgálat alapjain *Kennedy és mtsai* megerősítették, hogy

a BGP-15 protektív hatással bír mind a vázizom, mind a szívizom funkcióira, de eltérő, és csak kis részben felderített mechanizmusok által.

A BGP-15 szívizomra gyakorolt hatása és a mögöttes hatásmechanizmus továbbra is kérdéses, illetve a fentiek alapján különféle betegség-modelleken eltérő lehet, így folyamatban lévő vizsgálatok tárgya.

1.2. Célkitűzések

A fentiek alapján munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A 2-es típusú diabétesz mellitusz során kifejlődő kardiális diszfunkció értékelése Goto-Kakizaki patkánymodellen, valamint a BGP-15 gyógyszerjelölt kardiovaszkuláris hatásainak összehasonlítása ismert, pleiotróp hatású antidiabetikumokkal.

Kísérleteinkhez Wistar kontroll, diabéteszes GotoK, valamint BGP-15-, metformin- és pioglitazon-kezelt GotoK állatokat alkalmaztunk; echokardiográfiával vizsgáltuk a kardiális paramétereket, értékeltük az endothel-függő vazorelaxációt, illetve vizsgáltuk a PKG útvonal aktivitását a VASP protein foszforilációján keresztül; továbbá meghatároztuk a SERCA2a, foszfolambán és PDE9A proteinek expresszióját.

2. Az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció részletes echokardiográfiás leírása hiperkoleszterinémiás CAL-NZW nyúl modellen, az endothel-függő vazorelaxáció és a cGMP-PKG-PDE9A jelátviteli útvonal vizsgálatával.

A vizsgálatokhoz egészséges kontroll és aterogén étrenden tartott (HC) nyulakat használtunk fel, majd hagyományos-, Doppler- és STE echokardiográfiával értékeltük a szívfunkciót, meghatároztuk az endothel-függő vazorelaxációt, vérvételt és szövettani festéseket végeztünk, továbbá vizsgáltuk a cGMP-PKG jelátviteli útvonal aktivitását, végül a VASP és PDE9A fehérjék expresszióját.

2. Anyagok és módszerek

2.1. *A Goto-Kakizaki diabéteszes patkánymodell*

A patkánymodelleken végzett vizsgálatokhoz Goto-Kakizaki altörzsből származó diabéteszes állatokat, kontrollként pedig ennek háttéréből, a Wistar törzsből származó egészséges patkányokat használtunk. A patkányokat a Charles River Laboratories Inc. disztribútorától, az AnimaLab Kft-től szereztük be (Vác, Magyarország). Az Európai Unió 2010/63/EU azonosítószerű előírásának megfelelően minden állat humánus bánásmódban részesült, kezelésüket és a kísérleti procedúrákat megfelelő szakképesítéssel rendelkező személyzet végezte, a tanulmányt a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága 25/2013 DEMÁB számmal vette nyilvántartásba, valamint a Hajdú-Bihar Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte.

2.2. *A Goto-Kakizaki patkánymodell-tanulmány kísérleti protokollja*

A 12 hetes GotoK és Wistar patkányokat beérkeztetésük után 2 héttel random módon 5 alcsoportra osztottuk ($n=6$ /csoport): (I) *egészséges* Wistar (Kontroll) csoport, *vivőanyag-kezelés*; (II) GotoK diabéteszes csoport, *vivőanyag-kezelés („hatóanyaggal kezeletlen csoport”)*; (III), GotoK+BGP15 csoport, napi 10 mg/ttkg perorális BGP-15-kezelés; (IV) GotoK+MET csoport, napi 100 mg/ttkg perorális metformin-kezelés; (V) GotoK+PIO csoport, napi 10 mg/ttkg perorális pioglitazon-kezelés. A kezelések megkezdése előtt és a végpontban az állatok farokvénájából vért vettünk a szérum glükóz- és inzulin-szintek meghatározásához. Az állatok súlyát minden héten lemértük a pontos hatóanyag-dózisok kiszámításához. A kezeléseket orális szondázással („gavage”) végeztük, minden reggel, 12 héten keresztül. A végpontban vért gyűjtöttünk a farokvénából, majd echokardiográfiás vizsgálatokat végeztünk. Ezután mély (100/10 mg/ttkg) ketamin-xylazin anesztézia alatt thoracotomiát végeztünk, a

szívet kimetszettük, Ca^{2+} -mentes Krebs-oldatban feldaraboltuk, majd azonnal folyékony nitrogénen lefagyasztottuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on eltároltuk. A kimetszett aorta thoracicát jéghideg Krebs-oldatban szállítva rögtön felhasználtuk az endothel-függő vazorelaxáció vizsgálatához, *ex vivo*.

2.3. *A hiperkoleszterinémiás (HC) nyúl modell*

A kísérletek második fázisához 2700-3000 g súlyú, 20 hetes hím nyulakat használtunk fel, melyeket a Juráskó Kft-től (Debrecen) szereztünk be. Az általunk felhasznált nyulak a New-Zealand fehér (NZW) és a Kaliforniai (CAL) fajták keresztezéséből származtak, emiatt a szokásosan használt New-Zealand fajtához képest eleve nagyobb testzsír-százalékkal rendelkeznek, illetve hízekonyabbak. Mivel a kísérleteinknél elsődleges cél volt a koleszterin-értékek emelése, feltételeztük, hogy ezen nyúlfajta használata előnyösebb lehet, mint a hagyományosan használt New-Zealand állatok bevonása. A Kontroll csoport normál rágcsálótápot kapott, míg a hiperkoleszterinémiás (HC) csoportot „aterogén” diétára állítottuk. Az ún. aterogén rágcsálótáp a normál táphoz képest 1% hozzáadott koleszterint és 1% hozzáadott telített zsírt tartalmazott. A laboratóriumi állatok humánus bánásmódban részesültek, továbbá az összes kísérletet a 2010/63/EU „Principles of Laboratory Animal Care” direktívával összhangban végeztük, és a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által engedélyezettünk (25/2013 DEMÁB; 2014 január 29.).

2.4. *A nyúlmodell kísérletek protokollja*

Az állatokat a beérkezésük után 2 héttel (akklimatizáció), véletlenszerűen 2 csoportra osztottuk: A Kontroll (I) csoport ($n=9$) normál rágcsálótápot kapott; a HC (II) csoport ($n=9$) pedig aterogén tápot, 4 hónapon keresztül. Az állatok súlyát a kezdeti- és a végpontban is regisztráltuk (0. és 16. hét). A végpontban vérvétel történt az állatok marginális fülvénájából, majd echokardiográfiás vizsgálatot végeztünk. Ezután „mély” anesztézia alatt (ketamin-xylazin, 100/10 mg/ttkg) thoracotomiát végeztünk, majd szervmintákat izoláltunk Ca^{2+} -mentes Krebs-

oldatban (szív, bal kamra, aorta thoracica, vese, tüdő), morfometriai vizsgálatokhoz. Az aorta thoracicát kimetszettük, a felső szakaszát 4%-os formalin-oldatban eltároltuk, az alsóbb szakaszt pedig jéghideg Krebs-oldatba helyeztük, majd azonnal felhasználtuk az *ex vivo* vaszkuláris mérésekhez. A bal kamrát folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk a későbbi molekuláris biológiai mérésekhez.

2.5. Vegyszerek

Minden reagens, alapanyag, antitest, só és pufferoldat, melyeket a Western blot vizsgálatok, szövettani festések és assay-k során használtunk, a Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Németország) vagy az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) beszállítóktól érkezett. Az *ex vivo* vaszkuláris vizsgálatokhoz norepinefrin-hidrokloridot (Arterenol®), acetyl-kolin-kloridot és adenosin 5'-trifoszfát-hidrátot, valamint módosított Krebs-puffert használtunk. A Krebs-oldat összetétele: 118 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l NaH₂PO₄, 1,2 mmol/l MgCl₂, 24,9 mmol/l NaHCO₃, 11,5 mmol/l glükóz, és 0,1 mmol/l aszkorbinsav; bidesztillált vízben oldva és karbogen gázzal szellőztetve. A vaszkuláris vizsgálatokhoz használt gyógyszerhatóanyagokat ebben a pufferben oldottuk fel vagy hígítottuk ki. Az szervmintákat (aorta, szívmusculus, vese, máj) CaCl₂-mentes Krebs-pufferben izoláltuk a további felhasználáshoz. A Goto-Kakizaki állatok kezeléséhez használt metformin-hidrokloridot és pioglitazon-hidrokloridot, valamint a BGP-15-öt (O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)-nikotinsav-amidoxim) Sigma-Aldrich-Merck Kft-től (Darmstadt, Németország) szereztük be. Az orális szondázáshoz („gavage” technika) a hatóanyagokat hidroxietil-cellulóz nyák és desztillált víz 1:5 elegyében oldottuk fel, minden kezelés előtt, frissen.

2.6. Morfometria, vérvétel és metabolikus paraméterek

A patkányok súlyát hetente lemértük, a pontos hatóanyag-dózisok kiszámítása végett (0.-12. hét). A kezdeti- és végpontban, egy éjszakán át tartó

éheztetés után a farokvénából vérvétel történt, majd a szérum glükózt Accu-Chek vércukormérővel (Roche Diagnostics, Risch, Svájc) határoztuk meg. A maradék mintát 4 °C-on, 2 percig 10000 G-n centrifugáltuk, a plazmát lefagyasztottuk és -80 °C-on eltároltuk. A plazma inzulin-szintet radio-immuno-assay (RIA) kittel határoztuk meg (RK-400CT, Magyar Tudományos Akadémia Izotópkutató Intézet). A HOMA-IR indexet (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) az alábbi képlettel határoztuk meg: $\text{HOMA-IR} = \text{éhomizulin} (\mu\text{IU/ml}) \times \text{éhomiglükóz} (\text{mmol/ml}) / 22,5$; míg bétasejt funkciót (HOMA-B index) a következő formulával: $\text{HOMA-B} = 20 \times \text{éhomizulin} (\mu\text{IU/ml}) / \text{éhomiglükóz} (\text{mmol/ml}) - 3,5$. A másik kísérletsorozatban a nyulak súlymérését a kezdeti és a végpontban végeztük el (0., 16. hét.). A 16. hét leteltével egy éjszakán át tartó éheztetés után vért vettünk a marginális fülvénából Vacutainer Plast SSTII csövekbe (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A szérum lipid- és inzulin-szintek, májenzimek és egyéb markerek meghatározása a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetének jóvoltából történt. Az inzulin-szintet Liaison XL DiaSorin platformon (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA) határozták meg. A többi „rutin” paramétert Roche Cobas Integrated Platform (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) rendszer segítségével mérték. A meghatározott lipid-paraméterek: össz-koleszterin (TChol), low-density lipoprotein (LDLc), high-density lipoprotein (HDLc), apolipoprotein A és B (ApoA és ApoB), valamint triglicerid (TG). Májenzimek: aszpartát-transzamináz (AST) és alanin-transzamináz (ALT). Egyéb markerek: kreatinin, troponin T, kreatin-kináz MB izoforma (CK-MB) és C-reaktív protein (CRP). Az aterogén-index (össz-koleszterin/HDLc) és ApoB/ApoA arány kiszámítását is elvégeztük. A szérum NT-pro-BNP-t „sandwich electrochemiluminescence immunoassay” (ECLIA) módszerrel határozták meg, Roche Cobas Integrated Platform segítségével.

A nyúl-kísérlet végpontjában mély anesztézia alatt (ketamin/xylazin, 75/5 mg/ttkg) végzett thoracotomia után a szívet izoláltuk, tömegét lemértük, majd a papilláris izmok magasságában elmetsettük, az apikális részt 4%-os formalin-oldatba helyeztük, a bal kamra egy darabját (mindig ugyanazon régióból) pedig azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és -80 °C-on eltároltuk a későbbi molekuláris biológiai technikákhoz. A vese- és tüdőminták tömegét lemértük (nedves tömeg), majd szárítószekrényben 60 °C-on egy éjszakán át teljesen kiszáritottuk, és a tömegüket újra lemértük (száraz tömeg). Az aorta thoracica felsőbb harmadát 4 %-os formalinba helyeztük a későbbi szövettani festésekhez. A jobb tibia-t kimetszettük, megtisztítottuk, majd a hosszát (cm) lemértük, így az egyes szervek tömegét – a testtömeg mellett - tibia-hosszra is tudtuk normalizálni.

2.7. Echokardiográfia

Az echokardiográfiás képalkotást (TTE) GE Vivid E9 ultrahang-készülékkel végeztük (GE Healthcare, New York, USA) mindkét állatmodell esetében, azonban más-más transzducerrel és beállításokkal. A patkánymodell vizsgálatához i13L típusú, ún. lineáris transzducert használtunk, 14 MHz frekvencián. A patkányokat előzetesen elbódítottuk ketamin-xylazin kombinációval (i.m., 50/5 mg/ttkg), majd a mellkasi szőrzetet elektromos szőrníróval eltávolítottuk, és az állatokat háton fekvő helyzetbe pozícionáltuk. A nyúl modell esetében 12S-D „szektor” típusú transzducert használtunk 12 MHz frekvencián. Az anesztéziát ketamin-xylazin kombinációval végeztük (i.m., 35/3 mg/ttkg), a sternalis szőrzetet eltávolítottuk, és az állatokat oldalt fekvő helyzetbe helyeztük. Ettől a ponttól a két állatmodellen ugyanazt a képalkotási protokollt követtük, összhangban az American Society of Echocardiography ajánlásával. Elsőként parasternalis hossztengetyi metszetben (PLAX) 2D és M-mód echokardiográfiával vizualizáltuk az aortát és a bal kamrát, valamint a pitvart. A papilláris izmok magasságában M-mód felvételt készítettünk a falvastagságok és a bal kamra üregének meghatározásához szisztolében és diasztolében (bal kamrai

hátsó fal vastagsága, interventrikuláris szeptum vastagsága, bal kamra belső átmérője, frakcionált rövidülés és ejekciós frakció meghatározása). Az aortagyök fölött lementük az aorta átmérőjét, majd a pitvart a legnagyobb szélességénél. Ugyanezeket a felvételeket rövid tengelyi nézetből (SAX) és elkészítettük a pontosabb meghatározás végett. Ezután apikális 4 üregű metszetből lementük a mitrális billentyű szisztolés kitérését (mitral annular plane systolic excursion: MAPSE), majd Doppler módban (pulsatile wave: PW) a mitrális beáramlási sebességgörbét. Ebből a metszetből szöveti Doppler technikával (tissue Doppler imaging: TDI) meghatároztuk a laterális és a szeptális anulusok mozgási sebességét is a diasztolés funkció értékelésére. A bal kamrai kiáramlási traktus (left ventricle outflow tract, LVOT) sebesség- és nyomásgradienseit is meghatároztuk a Doppler technika alkalmazásával. A nyúl modell esetében apikális metszetekből 5 szívciklusnyi mozgóképet rögzítettünk a megfelelő frame rate-en, majd offline, az STE technika alkalmazásával Globális Longitudinális Strain-t (GLS) határoztunk meg, a kamrafal szegmenseinek manuális kijelölése után. Az adatokat merevlemezen eltároltuk, majd elemeztük EchoPAC PC szoftver (ver. 112, GE Healthcare, New York, USA) segítségével. Néhány paramétert utólagos számítások segítségével származtattunk. TDI felvételekből nyert adatokból Tei-indexet számítottunk a következő képlettel: $Tei\ index = IVRT + IVCT/ET$; amely a bal kamrai globális teljesítményt jellemzi. A bal kamra tömegét az alábbi egyenlet segítségével kalkuláltuk: $LVmass = 0.8(1,04((LVIDd + IVSd + LVPWd)^3 * LVIDd^3))) + 0.6$; ahol LVIDd: bal kamrai végdiasztolés átmérő, IVSd: interventrikuláris szeptum átmérője diasztolében, LVPWd: bal kamrai posterior fal vastagsága diasztolében. A bal kamrai remodeláció geometriáját a relatív falvastagság (relative wall thickness, RWT) számításával becsültük meg: $RWT = 2(LVPWd)/LVIDd$; ahol a megnövekedett RWT koncentrikus remodelációt feltételez. Az eredményeket táblázatos összefoglalás után statisztikai program segítségével értékeltük.

2.8. Vaszkuláris mérések

A vaszkuláris funkciós méréseket thoracotomiát követően végeztük el mindkét állatmodell esetében. A kísérletek végpontjában az állatokat i.m. ketamin-xylozin kombinációval (patkány: 100/10 mg/ttkg; nyúl: 75/5 mg/ttkg) mély anesztézia alá helyeztük, majd a mellkast feltártuk. A szív kimetszése után az abdominális aorta proximális részét azonnal jéghideg Krebs-oldatba helyeztük, majd 2 mm vastagságú gyűrűket készítettünk (minden állat esetében 4 gyűrűt). Az érgyűrű preparátumokat 10 mN előfeszítéssel egy rugós erőmérő műszerhez kötöttük egy 10 ml-es, Krebs-puffert tartalmazó szervkádban (Experimetria TSZ-04, Experimetria Kft, Budapest), melyet karbogén gázzal szellőztettünk (95% O₂ és 5% CO₂ elegye, 36 °C; 7,4-es pH-n). Az érgyűrű izomkötegeinek izometrikus kontraktilis erejét transzducer (Experimetria SD-01) és rugós erőmérő (Experimetria SG-01D) segítségével mértük, és poligráfon (Medicor R-61 6CH Recorder, Budapest) regisztráltuk. Egy 60 perces inkubációs periódust követően noradrenalin (NA) koncentráció-hatás görbét vettünk fel (0,1 nmol/l – 1 μmol/l-ig), és meghatároztuk a félhatásos koncentrációt (EC₅₀). Ezt követően egy 60 perces mosási periódus következett, majd újra noradrenalit adtunk a rendszerhez, éppen a félhatásos koncentrációban. Miután a kontraktilis erő stabilizálódott (prekontrahált állapot), acetyl-kolin (ACh) koncentráció-hatás görbét vettünk fel (0,1 nmol/l – 1 mmol/l-ig), az endothel-függő vazorelaxáció mértékének meghatározásához (az eljárás élettani alapja, hogy acetyl-kolin az eNOS aktiválásával NO-t szabadít fel az endotheliumból). Mosás után újra noradrenalin-prekontrakció következett, majd ATP koncentráció hatás-görbét (0,1-100 μmol/l) is fölvevünk (csak a nyúlmodell esetében). Az egyes állatokból származó érgyűrűk adatait átlagoltuk. A noradrenalin hatását a kontraktilis erő növekedésében mértük (az 10 mN előfeszítéshez képest). Az ACh és ATP hatását az eredeti feszülés (NA prekontrakció) százalékos változásában fejeztük ki és ábrázoltuk.

2.9. Szövetteni vizsgálatok

Szövetteni festéseket a hiperkoleszterinémiás nyúl modell kísérletek során végeztünk. A 4%-os formalin-oldatban fixált aorta-mintákból paraffinba ágyazás után 7 μm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk a HE-festéshez. Deparaffinálás után (xilol, majd alkohol-sor), 15 másodperce hematoxilin-oldatba helyeztük a metszeteket, majd differenciálás (10 perc csapvizes mosás) után 0,1%-os eozinoldattal és 1 csepp 2%-os ecetsavval 4 percig inkubáltuk. 96%-os etanolos öblítés után a metszeteket víztelenítettük abszolút alkoholban, majd fedőlemezrel lefedtük. Az intima és media vastagságának fénymikroszkóp (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország), illetve morfometriás szoftver (Scion Corp., Torrance, CA, USA) segítségével történő meghatározása után intima/media arányt határoztunk meg.

A fibrotikus szövetek kimutatásához a miokardium-mintákon Masson's trichrome festést alkalmaztunk, a gyártó (Sigma-Aldrich) protokollja szerint. Röviden: deparaffinálás után (xilol, majd alkohol-sor) után Bouin's oldatban refixáltuk a metszeteket (7 μm), majd 10 perces csapvizes mosás következett, ezután vas-hematoxillinnal 10 perces inkubálás és újra csapvizes mosás. Ezt követően 10 percig Biebirch (savas fukszin) festékben 10 perc inkubálás, mosás, majd differenciálás következett egy speciális savban (foszfor-molibdén/foszfor-wolfrám-sav). A kollagén kék színét ezután anilin-kék festék és 1%-os ecetsav hozzáadásával érték el. Végül a metszeteket víztelenítettük abszolút alkoholban, majd lefedtük.

2.10. Western blot

A Western blot analízist mindkét állatmodell esetében bal kamrai miokardiumból izolált fehérje-mintákon (300 mg) végeztük el, továbbá – a nyúlmodell esetében – aorta thoracica mintákat (100 mg) is felhasználtunk (csak a PDE9A expressziójának méréséhez). A fehérje-izoláláshoz a mélyfagyasztott szövetekből késes homogenizátor (T10 basic Ultra-Turrax, IKA, Németország) és

proteáz-inhibítort tartalmazó standard homogenizáló puffer segítségével fehérje-homogenizátumot készítettünk. A minták teljes fehérje-koncentrációját spektrofotométer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével, BCA-módszerrel határoztuk meg, miután ismert koncentrációjú BSA-fehérjéből hígítási sort készítettünk és abszorbancia-koncentráció standard egyenest vettünk fel. A homogenizátumokból Laemmli-puffer hozzáadásával készítettük el a végleges, vizsgálandó izolátumokat. A mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel szeparáltuk (120 V, 70-90 perc), majd a géleket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V, 90 perc). A membránok szabad kötőhelyeit 120 percig TBS-T (tris-buffered saline: Trisz(hidroximetil)-aminometán hidroklorid sója (Tris-HCl), NaCl és Tween®-20 elegye) pufferben feloldott 5%-os BSA-ban blokkoltuk, majd a kérdéses fehérjének megfelelő primer antitestekkel 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A primer antitesteket (egérben, vagy nyúlban termeltetett) a Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Németország) és az Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság) gyártóktól szereztük be. A primer antitestek a következő fehérjékre voltak specifikusak: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), foszfodiészteráz 9A (PDE9A), Protein Kináz G (PKG), vazodilátor-stimulált foszfoprotein (VASP), Ser239-foszfo-vazodilátor-stimulált foszfoprotein 16C2 klón (pVASP), szarko/endoplazmatikus retikulum ATPáz 2a (SERCA2a), foszfolambán (PLB), Ser16-foszfo-foszfolambán (pPLB). A foszforilált fehérjéket detektáló primer antitestekből azokat választottuk, melyeknél a gyártó garantálta, hogy kizárólag az adott aminosavon foszforilált fehérjét ismeri fel, a teljes, foszforilálatlan formát nem. Az antitesteket a beszállító által javasolt koncentrációkban, tipikusan 1:1000 – 1:5000 hígításban alkalmaztuk. A protokoll második napján 3*15 perc TBS-T mosás után a membránokat a megfelelő (anti-egér, vagy anti-nyúl) szekunder, HRP-konjugált (*horse-raddish peroxidase*, tormaperoxidáz-enzim-kapcsolt) antitestekkel (1:10 000) inkubáltuk 90 percig, 3% BSA-t is tartalmazó TBS-T pufferben. Mosást követően 3 ml ECL-szubsztrátot (*Enhanced Chemiluminescent*

Substrate) csepegtettünk a membránokra (2 percig), mely a tormaperoxidáz hatására fényt emittál, így az egyes jelölt proteinek detektálhatóvá váltak C-Digit® blot szkennel és Image Studio Digits ver. 5.2. szoftver (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) segítségével. Az egyes fehérjék expressziós szintjét a detektált fény intenzitásából származó pixel-denzitás jelezte. Denzitometriás analízis után a keresett fehérjék képének pixel-sűrűségét minden minta esetében a megfelelő, azonos mintából származó háztartási-fehérje, a GAPDH pixel-denzitására normalizáltuk. Az adatokat 3 megismételt kísérletből átlagoltuk, majd statisztikailag elemeztük és ábráztuk.

2.11. cGMP-szint meghatározása

A miokardiális cGMP-szintet a nyúl modell esetében tudtuk meghatározni, bal kamrai mintákból, direkt kompetitív immunoesszé segítségével (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). A módszerhez a gyártó által biztosított standard cGMP-ből hígítási sort készítettünk, és a miokardium-mintákat 0,1 M-os sósavban homogenizáltuk. A méréseket G-proteinnel bevont (antitestet kötő), speciális 96-üregű plate-en, spektrofotométer segítségével végeztük. A módszer kompetíción alapul, a mintában található ismeretlen mennyiségű cGMP verseng a hozzáadott standard HRP-konjugált cGMP-vel, a cGMP-specifikus antitest szabad kötőhelyeiért. Kimosás és HRP-szubsztrát hozzáadása után az optikai denzitást 450 nm-en leolvassuk (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország), az abszorbancia fordítottan arányos a minta cGMP-koncentrációjával. A méréseket $n=6$ /csoport mintán, duplikálva végeztük el, majd az adatokat átlagoltuk, és a gyártó által megadott egyenlet segítségével „pmol/mg szövet”-ben fejeztük ki.

2.12. Statisztikai elemzések

Az eredményeket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ -ben (standard error of the mean) adtuk meg. Az adatokat elsőként normalitás-vizsgálatnak vetettük alá (D’Agostino-Pearson omnibus normalitás-teszt). Ha csak 2 csoportot hasonlítottunk össze (nyúlmodell-

kísérletek) kétmintás, párosítatlan t-próbát (Student's t-test) alkalmaztunk, illetve, ha az adatok nem normál-eloszlást követtek, Mann-Whitney tesztet használtunk a különbségek megállapítására. A több csoport összehasonlítását igénylő statisztikai elemzésekhez (patkánymodell-kísérletek) a kis elemszám ($n=6$) miatt Kruskal-Wallis tesztet használtunk, Dunn's post-hoc analízissel. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke 0,05-nél kisebb, továbbá, a *-ok számával jeleztük a szignifikancia szintjét a kontrollhoz képest, ahol: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; és ****: $p < 0.0001$. Néhány módszer esetén a p értékét pontosan megadtuk.

3. Eredmények

3.1. A Goto-Kakizaki patkánymodell-kísérletek eredményei

3.1.1. Metabolikus paraméterek

A GotoK állatok (különösen a GotoK+MET csoport) kezdeti testtömege alacsonyabb volt a korban illesztett Wistar kontroll állatokénál, az irodalmi adatokkal egyezően. A metformin-kezelt állatok testsúlya gyarapodott a legkisebb mértékben a kezelések végére (12. hét), míg a pioglitazon-kezelt patkányok súlya nőtt leginkább, így a végpontra ezen két csoport állatainak tömege szignifikánsan eltért ($361,7 \pm 12,27$ vs. $411,3 \pm 10,40$ g). Az éhomi plazma-glükóz minden GotoK állatban emelkedett volt a Wistar kontrollhoz képest, továbbá, habár minden antidiabetikum csökkentette a glükóz-szintet, csak a pioglitazon-kezelt állatok értékei mutatkoztak szignifikánsan alacsonyabbnak a GotoK csoportéhoz viszonyítva ($13,62 \pm 0,6256$ vs. $7,880 \pm 0,3121$ mmol/l). A GotoK állatok HOMA-IR indexe szignifikánsan nőtt a Wistar kontroll csoport HOMA-IR értékéhez képest, mely inzulin-rezisztenciát jelez.

3.1.2. Endothel-függő vazorelaxáció

A Wistar állatok esetében $10 \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú acetil-kolin az eredeti, 10 nmol/l noradrenalinval kiváltott előfeszülés mértékében mintegy 50 %-os csökkenést okozott. A GotoK csoport állataiban csökkent az acetil-kolin által előidézett vazorelaxáció (mintegy 25 %) a Wistar állatokhoz viszonyítva, de ez nem érte el a szignifikancia szintjét az alkalmazott koncentráció-tartományban (valószínűleg a kis elemszám miatti statisztikai próba szigorúsága miatt). A BGP-15- és metformin-kezelések nem okoztak szignifikáns változást az endothel-függő relaxáció mértékében (a metformin-kezelés esetében tendencia megfigyelhető), ezzel ellentétben a pioglitazon-kezelés szignifikánsan növelte az Ach-ra adott

választ a kezeletlen GotoK csoporthoz viszonyítva, 100 nmol/l és 1 μ mol/l koncentrációkban.

3.1.3. Echokardiográfia

A 12. hét végére az echokardiográfiával értékelt diasztolés szívfunkció szignifikánsan romlott a GotoK csoportban a Wistar kontrollhoz képest. A diasztolés diszfunkciót jelzi a TDI-vel mért e'/a' arány csökkenése a GotoK csoportban ($p = 0,0386$ vs. Wistar), amely a kamrafal csökkent passzív elernyedési képességére utal. Ezt megerősíti az E hullám, valamint az E/e' arány szignifikáns növekedése ($p = 0,002$ és $p = 0,0045$ vs. Wistar), mely a megnövekedett kamrai töltőnyomást jelzi. Az ejekció időtartama (ET) jelentősen megrövidült a GotoK csoportban ($p = 0,05$ vs. Wistar), továbbá a kiáramlási pályán mért sebesség is emelkedett (LVOT V_{max}). A fentebb leírt paraméterek mindegyike szignifikánsan változott a BGP-15-kezelt csoportban. Az e'/a' arány nőtt ($p = 0,0023$ vs. GotoK), az E és A hullámok magassága lecsökkent (a Wistar állatokéhoz hasonló értékre), az E/e' arány, tehát a töltőnyomás csökkent ($p = 0,0019$ vs. GotoK). Az ejekció időtartama megnőtt, ezáltal a Tei-index szignifikánsan javult ($p = 0,0147$ vs. GotoK), amely a globális kardiális funkció javulását jelzi. A szisztolés funkciót jelző paraméterek érdemben nem változtak a kezelések során. A metformin-kezelt csoportban az e'/a' arány, illetve a kiáramlási pálya sebessége megőrzött volt, de további paraméterek nem különböztek szignifikánsan a GotoK csoport értékeitől. A pioglitazon-kezelésnek egyáltalán nem volt hatása az echokardiográfiával meghatározott kardiális funkcióra.

3.1.4. Western blot

A bal kamrai mintákból származó fehérje-izolátumokon foszfo-specifikus antitestekkel végzett Western blot analízisek eredményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze: a foszfolambán (PLB) és VASP fehérjék szintjében és

foszforiláltságban jelentős különbségeket találtunk a csoportok között. A ^{Ser16}foszfo-foszolambán aránya a nem-foszforilált formához képest (pPLB/PLB) szignifikánsan lecsökkent a kezeletlen GotoK csoportban ($p = 0,0171$ vs. Wistar). Ugyanakkor a foszforilált fehérje aránya szignifikánsan nőtt a BGP-15-kezelt GotoK állatok miokardiumában ($p = 0,0348$ vs. GotoK). A metformin-kezelés hasonló tendenciát hozott ($p = 0,1432$ v. GotoK). Mivel a VASP fehérje 239-es szerin aminosava a Protein Kináz G foszforilációs célpontja, a ^{Ser239}foszfo-VASP /totál VASP arányokat is vizsgáltuk. A foszforilált VASP/totál VASP aránya a foszfolambán fehérjéhez hasonló mintázatot követett, vagyis a BGP-15-kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt a kezeletlen állatokéhoz viszonyítva ($p = 0,0094$ vs. GotoK). A metformin-kezelés ebben az esetben is hasonló tendenciával járt ($p = 0,0877$ vs. GotoK). A SERCA2a expressziója nem különbözött szignifikánsan a kezelési csoportok között. Habár a cGMP degradációjáért felelős PDE9A expressziója a GotoK csoportban volt a legmagasabb, a BGP-15-kezelt csoportban pedig alacsonyabb, ezek a különbségek nem érték el az előre definiált szignifikancia-szintet ($p < 0,05$).

3.2. A nyúlmodell-kísérletek eredményei

3.2.1. Echokardiográfia

A 16 hétig tartó aterogén diéta után jelentős különbségeket észleltünk a Kontroll és HC csoportok echokardiográfiás paramétereit között, elsősorban a diasztológia tekintetében. A HC csoportban a bal pitvar területe ($p < 0,0001$), a bal kamra tömege ($p = 0,0005$), relatív falvastagsága ($p = 0,005$), továbbá a kiáramlási pálya sebessége ($p < 0,0001$) és nyomásgradiense ($p < 0,0001$) szignifikánsan emelkedett, ezen paraméterek a megnövekedett töltőnyomásra, valamint kamra-hipertrófiára és aorta-szstenózisra utalnak. Az ejekciós frakció szignifikánsan csökkent a Kontrollhoz képest ($p = 0,0026$), de még a fiziológiás tartományban maradt. A Doppler echokardiográfiával meghatározott értékek

közül kitűnik az E/A és TDI e'/a' hányadosok csökkenése ($p < 0,0001$ és $p = 0,002$), a decelerációs idő ($p = 0,0002$) és az izovolumetriás kontrakciós idő megnyúlása ($p < 0,0001$), valamint az E/e' arány növekedése ($p = 0,0002$) a HC csoportban, mely paraméterek érzékenyen jelzik a diasztolés funkciózavart és az emelkedett töltőnyomást. A globális teljesítményt jelző Tei-index szignifikánsan romlott a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,0001$). A Speckle Tracking echokardiográfia során a globális longitudinális szisztolés kamrafunkciót a GLS (*Global Longitudinal Strain*) értékkel jellemeztük. A GLS negatív irányú, a miokardium rostjainak maximális összehúzódását („tömörödését”) mutatja meg az eredeti (relaxált) állapothoz képest. A GLS értéke az egészséges 20 % fölötti értékről 16 % körülire csökkent a HC csoportban ($p = 0,0007$), mely az ejekciós frakciónál specifikusabban jelzi a kezdődő szisztolés elégtelenséget

3.2.2. Morfometria

A HC csoport állatai szignifikánsan magasabb testsúlyt értek el a aterogén étrenddel végzett kezelés végére a Kontrollhoz képest (4153 ± 86 . vs. 3064 ± 87 g) A bal kamra (BK) tömege is nőtt, melyet a testsúlyra és – egy standardizáltabb paraméterre – a tibia hosszára is normalizáltunk ($0,828 \pm 0,038^{**}$ vs. $0,605 \pm 0,046$) A tüdő és vese nedves/száraz tömegarányaiban nem találtunk eltérést a csoportok között, amely arra utalhat, hogy a szövetek között még nem jelent meg jelentős mértékű ödéma.

3.2.3. Szérum paraméterek

A vérvételek eredményei alapján a HC állatok lipid-paraméterei (összkoleszterin, LDL, ApoB: $p < 0,0001$), májenzim-értékei, valamint a C-reaktív protein (CRP) ($p = 0,0359$) és troponin T értékek ($p = 0,0092$) szignifikánsan különböztek a Kontroll nyulak paramétereitől. A HC állatokban tehát markáns

hiperkoleszterinémia, illetve enyhébb szisztémás gyulladás (CRP) volt tapasztalható.

3.2.4. Endothel-függő vazorelaxáció és PDE9 expresszió az aortában

Az izolált érgyűrűkön végzett vizsgálatok eredményei alapján a noradrenalinra adott válasz szignifikánsan eltért a csoportok között, ugyanis 10 és 100 nmol/l-es koncentrációknál szignifikánsan gyengébb kontrakciós válasz volt tapasztalható a HC csoportban. Az acetil-kolin mindkét csoportban relaxációt okozott (a prekontrakcióhoz képest) 1 μ mol/l-es koncentrációig, e fölött kontrakciót váltott ki a preparátumokon. Az aterogén étrenden tartott állatok érgyűrűi szignifikánsan kisebb mértékű relaxációt produkáltak, minden koncentráció-tartományban. A Hill-egyenlet illesztése után meghatározott E_{max} csökkent ($50,9 \pm 9,48$ vs. $93,67 \pm 2,66$, HC vs. Kontroll), míg a $\log EC_{50}$ kismértékben nőtt ($-7,59 \pm 0,16$ vs. $-8,62 \pm 0,36$, HC vs. Kontroll) a HC csoportban, a Kontrollhoz viszonyítva. Az ATP szignifikánsan nagyobb mértékű relaxációt váltott ki a Kontroll csoport preparátumain a HC csoporthoz képest, tehát az aterogén diéta az ATP-indukálta relaxációt is rontotta, a „klasszikus”, acetil-kolinnal vizsgált endothel-függő relaxáció mellett. Az HC állatok torakális aorta-mintáiban a PDE9A expressziója szignifikánsan emelkedett a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,0001$).

3.2.5. Szövettani festések

Az aorták metszetein végzett hematoxin-eozin festés során láthatóvá váltak a habos sejteket tartalmazó plakkok. A plakk nélküli, kontroll erek intimája nagyon vékony, az intima/media arány kicsi, míg az ateromás lézió miatt a HC állatok mintáiban az intima/media arány szignifikánsan megnőtt ($1,623 \pm 0,079$ vs. $0,043 \pm 0,004$). A Masson's trichrome festést tájékoztató, reprezentatív céllal készítettük, kisszámú mintán. A festések során - kék színnel - fibrotikus

szövetnyomok detektálhatóak a HC állatok bal kamrai miokardiumában, míg ezek a Kontroll mintákban nem tűnnek elő.

3.2.6. Western blot és miokardiális cGMP-szint

A HC állatok bal kamrai mintáiban a PDE9A expressziója többszöröse volt a Kontroll mintákban meghatározott szintnek ($p < 0,001$). Mind a foszforilálatlan VASP protein, mind a ^{Ser239}foszfo-VASP (pVASP) expressziója emelkedett a HC csoportban a Kontrollhoz viszonyítva, de a pVASP/VASP arány nem változott, amely változatlan Protein Kináz G aktivitást feltételez. Ezt alátámasztja a miokardiális cGMP szintje is: nem találtunk szignifikáns különbséget a Kontroll és HC állatok cGMP-szintjei között. Ezzel ellentétben a PKG fehérje expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a HC csoportban ($p < 0,001$), így – eredményeink alapján - a megnövekedett expressziót nem követte az enzimaktivitás emelkedése.

4. Megbeszélés

4.1. A Goto-Kakizaki patkánymodell eredményeinek megbeszélése

A GotoK állatok – a vártak megfelelően – emelkedett éhomi glükóz- és inzulinszintekkel rendelkeztek, illetve inzulin-rezisztensek voltak (HOMA-IR). Az alkalmazott hatóanyagok közül, kísérleti elrendezésünkben csak a pioglitazon tudott kifejteni szignifikáns mértékű szérum glükózsztint-csökkentést, habár kismértékben a BGP-15- és metformin-kezelt állatok glükóz-szintje is alacsonyabb volt. A pioglitazon szignifikánsan javította az izolált aortagyűrűk acetil-kolinra adott válaszát, vagyis az endothel-függő vazorelaxációt, melyre a metformin-kezelés csak kis hatással volt az alkalmazott koncentráció-tartományt vizsgálva. A BGP-15-kezelésnek nem volt hatása a vazorelaxációra. A pioglitazon kedvező hatásai ellenére azonban súlygyarapodást tapasztaltunk a kezelt állatokban, mely nem kívánatos T2DM-ben. A kardiális funkció tekintetében a fentiektől lényegesen eltérő hatásokat tapasztaltunk, ugyanis a pioglitazon- és metformin-kezeléseknek csak elhanyagolható hatása volt a GotoK állatokban megfigyelt diasztolés diszfunkcióra, ellenben a BGP-15-kezelt állatokban a kardiális funkcióromlás egyáltalán nem alakult ki. Az echokardiográfia alapján a GotoK+BGP-15 csoportban a passzív kamratelődést jelző E hullám magassága, a miokardium mozgékonyágát mutató e'/a' arány, és a töltőnyomást jelző E/e' hányados is megtartott maradt. Az ejekciós idő, a miokardium teljesítményét leíró Tei-index és a kiáramlási pálya sebessége is a Wistar kontroll állatokéhoz hasonló, a kezeletlen GotoK állatokban mért értékeknél szignifikánsan jobbnak mutatkozott.

A kardiális funkció megtartottságának hátterében a diasztológiát meghatározó SERCA2a pumpa expresszióját és aktivitását vizsgáltuk. A SERCA pumpa fehérjeszintű expressziója nem különbözött a kezelési csoportokban, ezzel ellentétben a pumpa aktivitását meghatározó foszfolambán foszforilációja

szignifikáns eltéréseket mutatott. A kezeletlen GotoK csoportban a PLB foszforilációja csökkent, míg a BGP-15-kezelt GotoK állatokban megnövekedett, amely a SERCA pumpa megtartott funkcióját jelzi a BGP-15 kezelés hatására. A PLB megfelelő, Ser16-os aminosavának foszforilálása mögött emelkedett Protein Kináz G aktivitás állhat, melyet a VASP protein, unikális PKG-célpont foszforilációjának monitorozásával megerősítettünk. Mivel a BGP-15 az endothel-függő relaxációt nem befolyásolta, azt feltételeztük, hogy a PKG aktivitását nem az NO-útvonalon befolyásolja (bár lehetséges, hogy az érfalban és a szívizomban eltérő jelátviteli útvonalakat aktivál). Ennek függvényében megvizsgáltuk a NP-cGMP lebontásáért felelős PDE9A enzim expresszióját, és habár a kezeletlen csoportban volt a legmagasabb, a BGP-15 kezelt csoportban pedig csökkent, a különbség nem érte el a szignifikancia határát (kis elemszám), ezért ezen vizsgálatok megismétlése hasonló modelleken indokolt lehet.

Összefoglalva, mivel a BGP-15-kezelésnek a GotoK modellen csak elhanyagolható szérum-glükóz-szint csökkentő hatása van, illetve a BGP-15 nem befolyásolja jelentősen az endothel-függő vazorelaxációt, így a kezelés hatására létrejött diasztolés funkció-javulás hátterében részben a PKG enzim megtartott aktivitása, a PLB foszforilálása, ezáltal pedig a megőrzött SERCA funkció, és teljesebb miokardiális relaxáció állhat.

4.2. A HC nyúl modell eredményeinek megbeszélése

A nyúlmodellen végzett kísérleteink tapasztalatai alapján a HC csoport állataiban igen markáns diasztolés diszfunkció fejlődött ki, annak minden echokardiográfiás jelével együtt. Az E/A és e'/a' arány csökkent, a DecT és IVRT megnyúlt, a E/e' megemelkedett. A bal kamra tömege szignifikánsan magasabb a HC csoportban, ezzel pedig a falvastagság (IVS) növekedése, illetve a relatív falvastagság (RWT%) emelkedése is együtt járt, amely koncentrikus hipertrófiára utal. A patológiát a reprezentatív festések során tapasztalt fibrotikus szövet megjelenése is alátámasztja. A globális kardiális funkcióromlást a Tei-index

emelkedése jelezte. A szisztolés funkciók a klasszikus mérések alapján megtartottak voltak, az ejekciós frakció csak kismértékben csökkent, azonban az STE echokardiográfiával megmért GLS (a rostok hossz-irányú tömörödése) szignifikánsan rosszabb volt az aterogén étrenden tartott csoportban. A kiáramlási pálya megnövekedett nyomás- és sebesség-gradiensei perzisztáló aortasztenózist jeleznek a HC csoportban. A bal kamra és a szív megnagyobbodását az ex vivo mérések is alátámasztották, azonban perifériás ödéma jeleit (nedves/száraz tömegarányok) nem tapasztaltuk.

A vérvételek eredményei alapján markáns diszlipidémia alakult ki (összkoleszterin, LDL, ApoB), a gyulladásos és kardiális markerek enyhe, de szignifikáns emelkedésével (CRT, troponin T). Ezt az ateroszklerózis szövettani megjelenése kísérte (habos sejtes plakkok az aortán), amely együtt járt az endothel-függő vazorelaxáció, vagyis a NO-bioelérhetőségének jelentős csökkenésével. Fontos új eredményként a Western blot vizsgálatok során a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját tapasztaltuk az aorta-mintákon, mely a NP-cGMP lebontásával hozzájárulhat az endothel-diszfunkció kialakulásához. A miokardium-szöveten végzett molekuláris biológiai vizsgálatok alapján az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció együtt járt a PDE9A enzim fokozott expressziójával, melyet ateroszklerotikus szívbetegség esetében elsőként írtunk le. Hasonlóan, a VASP protein (foszforilálatlan és Ser239-en foszforilált forma) expressziója is növekedett, amely a hipertróf válasz egyik oka lehet a HC csoportban. A pVASP/VASP aránnyal a Protein Kináz G, kulcsfontosságú, kardioprotektív útvonalakat iniciáló enzim aktivitását monitoroztuk, amely változatlanak bizonyult, azonban a PKG fehérje-szintű expressziója szignifikánsan emelkedett a HC csoportban. A PKG esetében az expresszió-növekedést tehát nem kísérte az aktivitás emelkedése, ennek lehetséges oka pedig az enzim kofaktorának, a cGMP másodlagos messengernek a relatív hiánya. A cGMP-szint meghatározásának eredménye jól korrelál a pVASP/VASP aránnyal, és megerősíti a megnövekedett expresszió melletti változatlan PKG aktivitást. A

cGMP-szint növekedésének limitáló tényezője a lebontásáért felelős PDE9A enzim expressziójának növekedése lehet, mely jelen eredményeink alapján már korai stádiumú kardiális diszfunkcióban kimutatható, így akár jövőbeni gyógyszer-célpont lehet ateroszklerotikus szívbetegségekben.

5. Összefoglalás

A diabétesz melitusz és ateroszklerózis olyan patofiziológia változásokat indukálnak az érrendszerben és a miokardiumban, melyek talaján kardiális funkciózavar jön létre. Az utóbbi évtized kutatásai a cGMP-PKG jelátviteli útvonal szerepére mutattak rá a patológiás változások mögött. PhD munkámban célul tűztük ki a diabétesz mellitusz során kifejlődő kardiális diszfunkció értékelését Goto-Kakizaki patkánymodellen, valamint a BGP-15 gyógyszerjelölt kardiovaszkuláris hatásainak összehasonlítását ismert, pleiotróp hatású antidiabetikumokkal, a PKG útvonal tekintetében. Továbbá célunk volt az ateroszklerózis során kialakult kardiális- és endothel- diszfunkció részletes feltérképezése hiperkoleszterinémiás nyúl modellen, a cGMP-PKG-PDE9A jelátviteli útvonal vizsgálatával. Eredményeink alapján a BGP-15 kezelés javítja a 2-es típusú diabétesz következtében károsodott diasztolés funkciót Goto-Kakizaki patkánymodellen, metabolikus és vaszkuláris hatásoktól függetlenül. A BGP-15 kedvező hatásai mögött részben a foszfolambán Ser16-os aminosaván történő foszforiláltságának emelkedése, ezáltal a SERCA2a pumpa megőrzött funkciója állhat, mely a Protein Kináz G jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül valósulhat meg a miokardiumban. Nyúl modellen az ateroszklerózis talaján kialakult kardiális diszfunkció a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját eredményezi az érfalban és miokardiumban, mely a szívizom-szövetben együtt jár a PKG enzim expressziójának növekedésével, változatlan aktivitás mellett, így a PDE9A túlexpresszáltága hozzájárulhat a kardioprotektív szignálok visszaszorításához ateroszklerózissal társuló kórképekben.

6. Az értekezés új tudományos eredményei

Összefoglalva, eredeti célkitűzéseink tükrében, a fenti két tanulmány alapján az alábbi új eredményeket fogalmaztuk meg a doktori értekezésben:

- A BGP-15 kezelés javítja a 2-es típusú diabétesz következtében károsodott diasztolés szívfunkciót Goto-Kakizaki patkánymodellen, metabolikus- és vaszkuláris hatásoktól függetlenül; és a BGP-15 kedvező hatásai mögött részben a foszfolambán Ser16-os aminosaván történő foszforiláltságának emelkedése, ezáltal a SERCA2a pumpa megőrzött funkciója állhat, mely a Protein Kináz G jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül valósulhat meg.
- Nyúl modellen az ateroszklerózis talaján kialakult, manifeszt kardiális diszfunkció a PDE9A enzim megnövekedett expresszióját eredményezi az érfalban és miokardiumban, mely a szívizom-szövetben együtt jár a PKG enzim expressziójának növekedésével, változatlan aktivitás mellett, így a PDE9A túlexpresszálttsága hozzájárulhat a kardioprotektív szignálok visszaszorításához.

7. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/47/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Priksz Dániel
Neptun kód: BW72WL
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Kiss, R., Hollós, N., Varga, B., Németh, J., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Molecules*. 24 (3), 1-18, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24030586>
IF: 3.098 (2017)
2. **Priksz, D.**, Bombicz, M., Varga, B., Kurucz, A., Gesztelyi, R., Balla, J., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (10), 1-18, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19102882>
IF: 3.687 (2017)





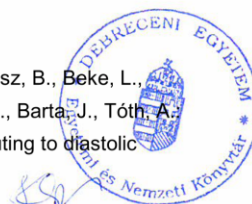
További közlemények

3. Szabó, K., Gesztelyi, R., Lampé, N., Kiss, R., Gálné Remenyik, J., Pesti-Asbóth, G., **Priksz, D.**, Szilvássy, Z., Juhász, B.: Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) Seed Flour and Diosgenin Preserve Endothelium-Dependent Arterial Relaxation in a Rat Model of Early-Stage Metabolic Syndrome.
Int. J. Mol. Sci. 19 (3), 1-21, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030798>
IF: 3.687 (2017)
4. Kurucz, A., Bombicz, M., Kiss, R., **Priksz, D.**, Varga, B., Hortobágyi, T., Trencsényi, G., Szabó, R., Pósa, A., Gesztelyi, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Heme oxygenase-1 activity as a correlate to exercise-mediated amelioration of cognitive decline and neuropathological alterations in an aging rat model of dementia.
Biomed Res. Int. 2018, 1-13, 2018.
IF: 2.583 (2017)
5. Kiss, R., Szabó, K., Gesztelyi, R., Somodi, S., Kovács, P., Szabó, Z., Németh, J., **Priksz, D.**, Kurucz, A., Juhász, B., Szilvássy, Z.: Insulin-Sensitizer Effects of Fenugreek Seeds in Parallel with Changes in Plasma MCH Levels in Healthy Volunteers.
Int. J. Mol. Sci. 19 (3), 771-, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030771>
IF: 3.687 (2017)
6. Varga, C., Veszeka, M., Kupai, K., Börzsei, D., Deim, Z., Szabó, R., Török, S., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Juhász, B., Radák, Z., Pósa, A.: The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: the Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk.
J. Sports Sci. Med. 17 (4), 580-588, 2018.
IF: 1.99 (2017)
7. Vecsernyés, M., Szokol, M., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Fülöp, G. Á., Varga, B., Juhász, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Alpha-MSH induces vasodilatation and exerts cardioprotection via the heme-oxygenase pathway in rat hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 69 (5), 286-297, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000472>
IF: 2.227





8. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Varga, B., Kurucz, A., Kertész, A. B., Takács, Á., Pósa, A., Kiss, R., Szilvássy, Z., Juhász, B.: A Novel Therapeutic Approach in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: allium ursinum Liophylisate Alleviates Symptoms Comparably to Sildenafil.
Int. J. Mol. Sci. 18 (7), 1-19, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071436>
IF: 3.687
9. Szokol, M., **Priksz, D.**, Bombicz, M., Varga, B., Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Csípő, T., Pósa, A., Tóth, A., Papp, Z., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Long term osmotic mini pump treatment with alpha-MSH improves myocardial function in Zucker Diabetic Fatty rats.
Molecules. 22 (10), 1-18, 2017.
IF: 3.098
10. Varga, B., **Priksz, D.**, Lampé, N., Bombicz, M., Kurucz, A., Szabó, A. M., Pósa, A., Szabó, R., Kemény-Beke, Á., Gálné Remenyik, J., Gesztelyi, R., Juhász, B.: Protective Effect of Prunus Cerasus (Sour Cherry) Seed Extract on the Recovery of Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Damage in Zucker Diabetic Fatty Rat.
Molecules. 22 (10), [1-12], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22101782>
IF: 3.098
11. Bombicz, M., **Priksz, D.**, Varga, B., Gesztelyi, R., Kertész, A. B., Lengyel, P., Balogh, P., Csopor, D., Hohmann, J., Bhattoa, H. P., Haines, D. D., Juhász, B.: Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Liophylisate: impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits.
Int. J. Mol. Sci. 17 (8), E1284, 2016.
IF: 3.226
12. Fehér, P., Ujhelyi, Z., Váradi, J., Fenyvesi, F., Róka, E., Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.
Molecules. 21 (10), 1269, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101269>
IF: 2.861
13. Kovács, Á., Fülöp, G. Á., Kovács, A., Csípő, T., Bódi, B., **Priksz, D.**, Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 310 (11), H1671-H1682, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>
IF: 3.348





14. Kertész, A. B., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Balla, J., Balla, G., Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tósaki, Á., Juhász, B.: Adverse Impact of Diet-Induced Hypercholesterolemia on Cardiovascular Tissue Homeostasis in a Rabbit Model: time-Dependent Changes in Cardiac Parameters.
Int. J. Mol. Sci. 14 (9), 19086-19108, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140919086>
IF: 2.339
15. Juhász, B., Kertész, A. B., Balla, J., Balla, G., Szabó, Z., Bombicz, M., **Priksz, D.**, Gesztelyi, R., Varga, B., Haines, D. D., Tósaki, Á.: Cardioprotective Effects of Sour Cherry Seed Extract (SCSE) on the Hypercholesterolemic Rabbit Heart.
Curr. Pharm. Design. 19 (39), 6896-6905, 2013.
IF: 3.288

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 45,904

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,785

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

Debrecen, 2019.03.01.



8. Köszönetnyilvánítás

Hálasan köszönöm Dr. Juhász Béla témavezetőmnek, hogy PhD hallgatójává fogadott, és tanácsaival nem csupán a szakmai munkában, hanem az élet egyéb területein is ellát, valamint odafigyelésével és baráti hozzáállásával napról-napra egyengeti magam és kollégáim pályafutását.

Köszönöm Dr. Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, hogy munkámat a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben minden lehetséges támogatás mellett végezhetem, és hogy szakmai felkészültségével példát állít magam és munkatársaim számára.

Óriási hálával tartozom közvetlen munkatársamnak, Dr. Kozma Mariannak, aki nem múltó kreativitásával segíti a kutatások létrejöttét, barátságával és humorával pedig napról-napra támogat. Köszönet illeti közvetlen kollégámat, Dr. Varga Balázst szakmai segítségéért és őszinte barátságáért, és Dr. Kiszil Okszánát, fáradhatatlan támogatásáért.

Hálasan köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet jelenlegi és volt munkatársainak a magas szintű szakmai munkát és támogatást. Köszönöm Szegváriné Erdős Andrea és Oláh Krisztina kitartó segítségét a kísérletek elvégzésében.

Óriási köszönettel tartozom Dr. Gesztelyi Rudolfnak a kísérletek és a statisztikai elemzések során nyújtott segítségéért, valamint Dr. Kertész Attilának, akitől megtanulhattuk az echokardiográfia rejtelmét.

Hálás vagyok kollaborációs partnereink, a DE Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, Dr. Tóth Attila és Dr. Papp Zoltán Professzoroknak, illetve Dr. Kovács Árpádnak, Dr. Fülöp Gábornak és Dr. Csipő Tamásnak segítségükért és ötleteikért. Köszönet illeti a DE Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait.

Köszönöm TDK hallgatóinknak, és volt munkatársainknak, a Gyógyszerésztudományi Kar alkalmazottainak őszinte támogatásukat. Köszönöm barátaim, Dr. Gaál Balázs és Dr. Pék Ádám tanácsait és segítségét.

Hálasan köszönöm a kitartó támogatást és szeretetet feleségemnek, Dr. Priksz Zsuzsának, és családom minden tagjának.

Munkámat ajánlom szeretett Nagyapámnak, Priksz Mihálynak.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2016-00002 „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

