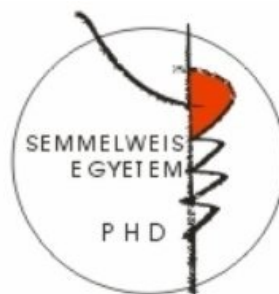


A nitrogén monoxid – ciklikus guanozin monofoszfát jelátvitel kórélettana és farmakológiája diabéteszes kardiomiopátiában

Doktori tézisek

Dr. Mátyás Csaba

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radovits Tamás Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Miklós Zsuzsanna Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Borbély Attila Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Ferdinandy Péter D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Sármán Beatrix Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Juhász Béla Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2017

Bevezetés

A cukorbetegség, vagy másik nevén diabétesz mellitusz (DM) olyan krónikus endokrin betegség, mely optimálisnál magasabb vércukorértékekkel jellemezhető. Két fő formája ismert: az 1-es típusú és a 2-es típusú cukorbetegség (T1DM; T2DM). T1DM esetén a hasnyálmirigy β -sejtjeinek autoimmun eredetű károsodása miatt inzulinhiányos állapot alakul ki, míg T2DM-ben hiperinzulinizmus és inzulinrezisztencia jellemző. A DM mechanizmusától függetlenül, önmagában a károsodott anyagcsere diabéteszes kardiomiopátia kialakulásához vezet. Mindezek összességében nem csak a kardiovaszkuláris mortalitás növekedéséhez járulnak hozzá, hanem a cukorbetegség gazdasági terhet is tovább növelik. Mindezek ismeretében rendkívül nagy az igény olyan új terápiás megoldásokra, melyekkel sikerrel gyógyíthatók vagy megelőzhetők a cukorbetegséghez társuló szív- és érrendszeri szövődmények.

A diabéteszes kardiomiopátia a szívizomzat strukturális és funkcionális átalakulásához vezet. A betegség kialakulásában számos patofiziológiai elváltozást leírtak. Ezek közé tartozik például a megváltozott anyagcserefolyamatok (inzulin jelátvitel károsodása, glukóz transzporter 4 aktivitásának és számának csökkenése, csökkent glukóz és laktát és emelkedett szabadzsírsav felhasználás) miatt kialakuló nitrozatív és oxidatív stressz. Továbbá, a lipid túlkínálat, a glukotoxicitás, a gyulladásozó folyamatok és a reaktív oxigéngyökök (ROS) termeléséért felelős enzimrendszerek (pl. nikotinamid adenine dinukleotid foszfát-oxidázok) túlaktivációja, illetve mitokondriális diszfunkció mind különböző oxidatív gyökök, például a szuperoxid, termelődéséhez vezetnek. A szuperoxid gyökök ezt követően számos molekulával lépnek kölcsönhatásba, így például a nitrogén monoxiddal (NO), melynek eredménye a rendkívül reaktív peroxinitrit molekula képződése. A peroxinitrit különböző sejtalkotókhoz kötődve károsítja azok szerkezetét és működését, így enzimdiszfunkcióhoz, a DNS és a kontraktilis apparátus károsodásához vezet. Ezen folyamatok együttesen kardiális diszfunkció (főleg szisztolés diszfunkció T1DM-ben, míg diasztolés diszfunkció T2DM-ben) kialakulását idézik elő DM-ban.

A NO – ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) – szolubilis guanilát cikláz (sGC) – protein kináz G (PKG) jelátvitel antihipertrófiás, antifibrotikus és antiapoptotikus hatását számos kardiovaszkuláris megbetegedés kapcsán leírták. A jelátviteli út aktivitását a cGMP intracelluláris szintje határozza meg, melyet főleg két tényező befolyásol: 1) az sGC enzim általi cGMP termelődés és a 2) foszfodiészteráz-5A (PDE5A) általi lebomlás.

Cukorbetegség során a fokozott nitro-oxidatív stressz e jelátvitel károsodásához vezet. Ennek egyik fő mechanizmusa az sGC enzim oxidatív károsodása és inaktivációja, míg a PDE5A enzim túlermelődése tovább fokozza a cGMP lebomlását. Ezen folyamatok összességében a cGMP intracelluláris mennyiségének csökkenéséhez és a PKG útvonal aktivitásának következményes károsodásához vezetnek.

A közelmúltban kerültek kifejlesztésre a NO-cGMP-sGC-PKG jelátviteli úton ható új gyógyszermolekulák. Ilyen új gyógyszer csoport az sGC aktivátorok csoportja. Ezen molekulák képesek az sGC enzim hem-kötő alegységéhez kötődve az inaktív enzimet reaktiválni különböző oxidatív stresszel járó kórfolyamatok során. A gyógyszer csoport egyik tagja, a cinaciguat, számos modellrendszerben bizonyult előnyös hatásúnak például kísérletes miokardiális infarktusban, miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodásban, nitro-oxidatív stressz-indukálta endoteliális diszfunkcióban illetve miokardium hipertrofia esetén. Ezen felül a szer alkalmazása előnyös hatású volt akut dekompenzált szívelégtelenségben az első humán klinikai vizsgálatokban. Ezzel szemben fázis IIb klinikai vizsgálat során a gyógyszer intravénás használatakor emelkedett a hipotenziós események, mint nem-kívánatos mellékhatások száma. Fentiek miatt a vizsgálatot a tervezettnél korábban leállították. Ugyanakkor a vizsgálatot végzők véleménye szerint a szer krónikusan, per os alkalmazva előnyös hatású lehet idült szívelégtelen betegek kezelésében.

A jelátviteli út modulációjára elérhető másik beavatkozási lehetőségünk a PDE5A enzim gátlása. A PDE5A gátlók (például a vardenafil) az erektilis diszfunkció kezelésében széles körben elterjedt gyógyszerek. A PDE5A kóros szerepét korábban a miokardium kóros remodellációjában is leírták PDE5A génkiütött egérmodellben. A PDE5A gátlás protektív szerepét több kardiovaszkuláris megbetegedésben bizonyították, úgy mint akut miokardiális infarktusban, szívizom hipertrofiában, szívelégtelenségben vagy éppen toxikus kardiomiopátiában. Klinikai vizsgálatokat végeztek a PDE5A inhibitor sildenafil krónikus szívelégtelenségre kifejtett hatásainak felmérésére, ugyanakkor az előrehaladott szívelégtelen betegek sildenafille való kezelésekor nem javult a betegek fizikai terhelhetősége, sem pedig a betegség klinikai kimenetele. Ezzel ellentétben a PDE5A gátlás előnyös hatása feltételezhető cukorbetegséggel együtt járó szívelégtelenség esetén.

Célkitűzések

A közelmúlt kutatási eredményei egyre inkább a szívelégtelenségben látható komorbiditások fontosságára irányították a figyelmet, mivel azok jelenléte mind a mortalitást mind pedig a morbiditást jelentősen befolyásolhatják. A különböző komorbiditások között a cukorbetegség szignifikáns hatással bír. A cukorbetegség a szívelégtelenségben megfigyelhető mortalitáshoz jelentős mértékben hozzájárul. A cukorbetegség nem csak hozzájárul, de önmagában is szívelégtelenség, az ún. diabéteszes kardiomiopátia kialakulásához vezet.

A multi-morbid szívelégtelen betegek gyógyszeres terápiája még napjainkban sem tökéletes. Emiatt a komorbiditások jelenlétének figyelembevétele elengedhetetlen a terápia tervezés, a személyre szabott medicina során. Mindezekhez olyan új gyógyszerterápiák bevezetése szükséges, melyekkel a betegek kezelése optimálisabbá válhat. Ennek során a cGMP jelátvitel befolyásolása egy ígéretes alternatíva lehet.

Fentiek alapján jelen vizsgálatunk célkitűzései a következők voltak:

1. A szívizomzat funkcionális (szisztolés és diasztolés) és strukturális (nitro-oxidatív stressz, fibrotikus és hipertrófiás remodeláció és apoptózis) változásainak összehasonlítása T1DM és T2DM állatmodelljeiben
2. A NO-cGMP jelátvitel károsodásának vizsgálata a diabéteszes szívben
3. Az sGC aktivátor cinaciguat hatásainak vizsgálata T1DM-hez társuló diabéteszes kardiomiopátiában
4. A PDE5A inhibitor vardenafil hatásainak vizsgálata T2DM-hez társuló diabéteszes kardiomiopátiában

Módszerek

T1DM modellje

Fiatal hím Sprague-Dawley patkányokban T1DM-et egyszeri, i.p. streptozotocin (60 mg/kg) injekcióval váltottunk ki. Az injekciót követő 72 órával vércukormérést hajtottunk végre és a >15 mmol/l vércukorértékkel rendelkező állatokat cukorbetegnek tekintettük és a vizsgálatba bevontuk. A vizsgálatokat 8 hét diabétesztartamot követően végeztük.

T2DM modellje

A Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkánytörzs homozigóta recesszív egyedei (fa/fa) elhíznak, inzulinrezisztencia, hiperglikémia és T2DM alakul ki bennük a leptin receptor genetikai mutációjának és egy speciális diétának (Purina #5008) köszönhetően. A homozigóta domináns (+/+) és heterozigóta (fa/+) genotípusú állatok egészségesek maradnak. 7 hetes hím ZDF diabéteszes (fa/fa) és ZDF sovány (lean) (+/?) állatokat használtunk. A vizsgálatokat az állatok életkorának 32. hetében végeztük el.

Vizsgálati protokoll

A T1- vs. T2DM összehasonlító vizsgálathoz 16 hetes Sprague Dawley és 32 hetes ZDF patkányokat használtunk.

A cinaciguat hatásait T1DM modellünkben vizsgáltuk. 8 hetes állatokat 4 csoportba osztottunk: placebóval kezelt kontroll (Co; n=12), cinaciguattal kezelt kontroll (CoCin; n=12), placebóval kezelt diabéteszes (DiabCo; n=12) és cinaciguattal kezelt diabéteszes (DiabCin; n=10). Az állatokat 0,5 % metilcellulóz (Co, DiabCo) vivőanyaggal vagy az sGC aktivátor cinaciguat szuszpenziójával (CoCin, DiabCin; 10 mg/kg/nap) kezeltük 8 hétig.

A vardenafil hatásait T2DM modellünkben vizsgáltuk. 7 hetes hím ZDF (fa/fa) vagy ZDFLean (+/?) állatokat 4 csoportba randomizáltuk: placebóval kezelt kontroll (ZDFLean; n=8), vardenafillal kezelt kontroll (ZDFLean+Vard; n=7), placebóval kezelt diabéteszes (ZDF; n=7) és vardenafillal kezelt diabéteszes (ZDF+Vard; n=8). A patkányokat 10 mg/kg vardenafillal vagy vivőanyaggal (0,01 mol/l citrát puffer) kezeltük 25 héten át.

Biokémiai vizsgálatok

A vér és vizelet glukóz szintjét digitális vércukormérő segítségével határoztuk meg. A plazma cGMP és nitrit/nitrát szinteket kereskedelmi forgalomban kapható kittel mértük.

Szívultrahang vizsgálat

A ZDF állatok szívének morfológiai megítélésére szívultrahang vizsgálatot végeztünk 1-2 % izoflurán anesztéziában. A szív középső papilláris izom magasságában, hossz- és rövidtengelyben készített B-módú felvételekből meghatároztuk végszisztolében és végdiasztolében ('s' és 'd') a balkamra (LV) elülső és hátsó falának vastagságát (LVAW; LVPW) és a LV belső átmérőjét (LVID). A következő paramétereket számítottuk: balkamrai izomtömeg (LV_{mass})= $1,04 \times [(LVAW_d + LVID_d + LVPW_d)^3 - LVID_d^3]$, relatív falvastagság (RWT)=(LVAW_d+LVPW_d)/LVID_d. Az LV_{mass} értékét a testtömegre (BW; kg) (LV_{mass} index) és a tibiahosszra (LV_{mass}/TL) normalizáltuk.

In vivo hemodinamikai mérés

Invazív hemodinamikai vizsgálatot végeztünk a kardiális funkció részletes karakterizálása céljából. A következő paramétereket határoztuk meg nyomás-térfogat (P-V) analízis során: artériás középnyomás (MAP), szívfrekvencia (HR), LV maximális szisztolés nyomás (LVSP), LV végdiasztolés nyomás (LVEDP), maximális és minimális dP/dt (dP/dt_{max}; dP/dt_{min}), LV relaxáció időkonstansa (Tau_w; Weiss módszer szerint), ejekciós frakció (EF), vérömunka (SW) és perctérfogat (CO), balkamrai végszisztolés P-V összefüggés egyenesének meredeksége (E_{es}; kurvilineáris modell), "preload recruitable stroke work" (PRSW) és a balkamrai végdiasztolés P-V összefüggés egyenesének meredeksége (EDPVR).

Permeabilizált balkamrai kardiomiociták in vitro erőmérése

Permeabilizált LV kardiomiocitákat mechanikus apparátusban rögzítettünk az izometriás erő és a szarkomerhossz (SL) mérése céljából. A maximális aktív erőt (F_{max}; szaturáló Ca²⁺ koncentráció esetén) és a Ca²⁺-független passzív erőt (F_{passive}; relaxáló oldatban) mértük 2,3 μm SL mellett. Az F_{passive} értékét változó SL (1,9 μm és 2,5 μm között) regisztráltuk.

Génexpressziós vizsgálatok

A kataláz, glutation reduktáz (GSR), szuperoxid diszmutáz 1 és 2 (SOD1 és 2), tioredoxin-1, pitvari nátriuretikus faktor (ANF), alfa és béta miozin nehézlánc (α- and β-MHC), Bcl-2, Bcl2-höz társult X protein (BAX), endoteliális NO szintáz (eNOS), hő sokkprotein 70a1 (HSP70a1), mátrix metallopeptidáz 2 és 9 (MMP-2 és 9), MMP szöveti inhibitor 1 és 2 (TIMP-1 és 2), kollagén 1a1 és 3a1 (Colla1 és 3a1), fibronektin, foszfolambán (PLB), kaszpáz-12, c-fos, c-jun és endotelin-1 (ET-1) gének expresszióját vizsgáltuk. A génexpressziós adatokat a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) szintre normalizáltuk.

Western blot technika

Az eNOS, sGC, PDE5A, PKG, vazodilátor-stimulált foszfoprotein (VASP) és foszforilált-VASP (p-VASP), MMP-2 és 9, transzformáló növekedési faktor β 1 (TGF- β 1), PLB, p-PLB, poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP1) protein expresszióját mértük. A GAPDH és tubulin expresszióját használtuk belső kontrollként.

Szövettan és immunhisztokémia

Hematoxillin-eozin (HE), Masson trikróm (MT) és Picrosirius vörös festéseket végeztünk a kardiomiocita hipertrófia (kardiomiocita átmérő) és fibrózis (MT pontszám és picrosirius vörös terület) meghatározására. Ezen felül 3-nitrotirozin (3-NT, nitro-oxidatív stressz marker), cGMP, TGF- β 1 és fibronectin immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Az apoptózis és DNS fragmentáció megítélésére TUNEL módszert alkalmaztunk.

Statisztika

Adatainkat átlag és standard hibaként ábrázoltuk (SEM). Shapiro-Wilk normalitás tesztet alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

T1DM-hez és T2DM-hez társuló diabéteszes kardiomiopátia összehasonlító vizsgálata

Párosítatlan két-oldalas Student *t*-tesztet használtunk a diabéteszes és a kontroll állatok paramétereinek összehasonlítására. A két modell közötti, cukorbetegség indukálta elváltozások összehasonlításához minden állat paraméterét a hozzá tartozó kontroll csoport átlagértékére normalizáltuk.

sGC aktiváció hatásainak vizsgálata T1DM-hez kapcsolódó diabéteszes kardiomiopátiában

Kétutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk (faktorok: "T1DM" és "Cinaciguat"). Tukey HSD post hoc tesztet használtunk.

PDE5A gátlás hatásának vizsgálata T2DM-hez kapcsolódó diabéteszes kardiomiopátiában

Kétutas ANOVA-t alkalmaztunk (faktorok: "T2DM" és "Vardenafil"). Tukey HSD post hoc tesztet használtunk.

Gyógyszerek

A cinaciguatot 0,5 %-os metilcellulóz oldatban, míg a vardenafilt 0,01 mol/l citrát pufferben oldottuk fel.

Eredmények

Diabéteszes kardiomiopátia összehasonlító vizsgálata T1DM és T2DM esetén

Alapadatok

Cukorbetegségben csökkent a testtömeg, növekedett a vér és a vizelet glukóz szintje. Továbbá a szívtömeg (HW)/BW arány növekedése miokardium hipertrófiát jelzett az állatokban.

Nitro-oxidatív stressz

Cukorbetegség esetén megnövekedett nitroztatív és oxidatív stresszt láttunk: erősebb 3-NT festődés és a különböző antioxidáns enzimrendszerek (kataláz, tioredoxin-1, GSR, HSP70a1, SOD1 és SOD2) génexpressziójának növekedése volt megfigyelhető. A nitro-oxidatív stressz mértéke jelentősebbnek bizonyult T1DM, mint T2DM esetén.

Miokardium hipertrófia és fibrózis

Mindkét cukorbeteg modellünkben a miokardium kóros remodelláción ment keresztül. DM esetén megnövekedett HW/BW arányt figyeltünk meg. Szívvultrahang vizsgálattal miokardium hipertrófia jeleit láttuk, a kardiomiociták átmérőjének növekedése pedig mikroszkópos szinten bizonyította a kardiomiocita hipertrófia jelenlétét. A szívizomzat hipertrófikus remodellációja a szív génexpressziós mintázatának karakterisztikus változásával járt együtt: az ANF, β/α -MHC, ET-1, c-fos és c-jun expressziója növekedett. Ezen felül miokardiális fibrózis alakult ki, amit a magasabb MT pontszám, megnövekedett picosirius terület és a TGF- β és fibronectin expressziójának növekedése, illetve az MMP-k és Col1a1 és 3a1 termelődésének zavara jelzett. A szívizomzat patológiás remodellációja jelentősebbnek bizonyult T1DM esetén.

DNS károsodás és apoptózis

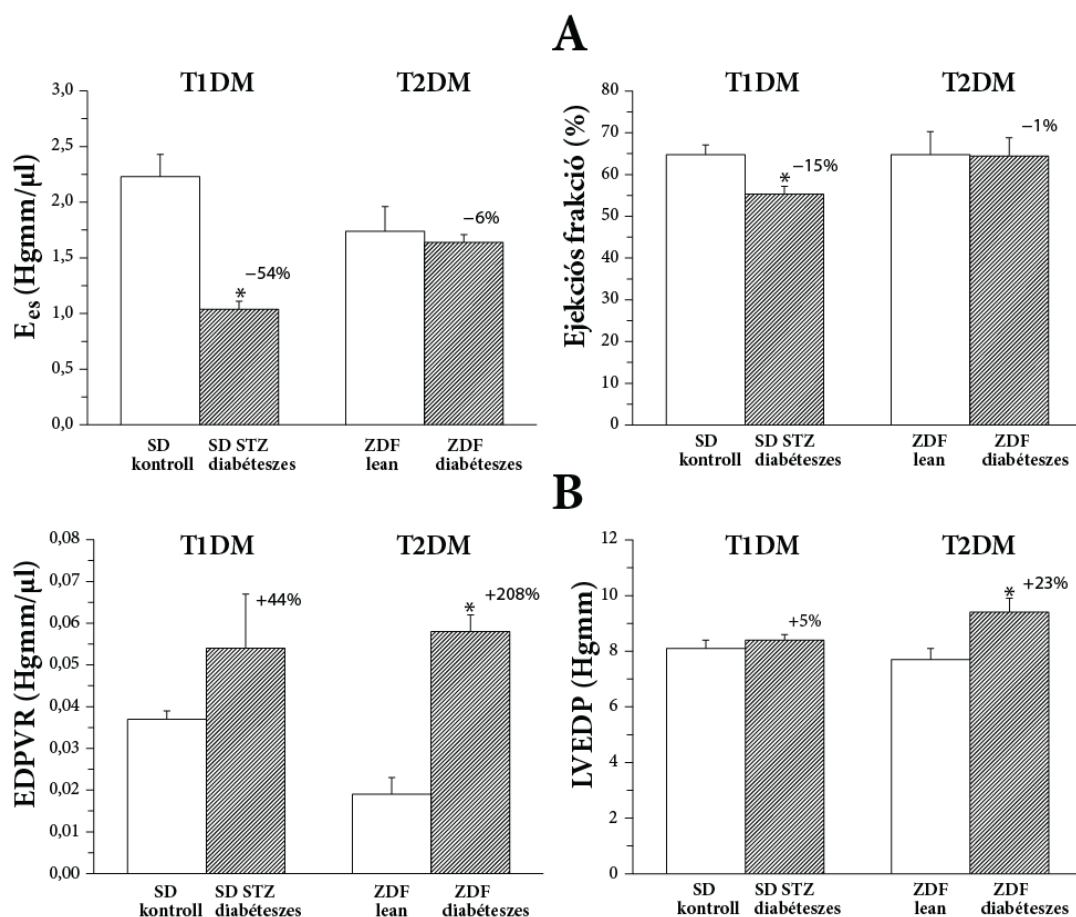
A DM-ben megfigyelhető fokozott nitro-oxidatív stressz hatására DNS károsodás és apoptózis alakult ki, melyet a TUNEL pozitív sejtek számának növekedése jelzett. T1DM esetén a nagyobb mértékű oxidatív stressz kifejezettebb DNS károsodáshoz és apoptózishoz vezetett. ZDF állatokban a kaszpáz-3 és a PARP1 aktivációját figyeltük meg. Ezzel szemben a BAX/Bcl-2 arány nem változott.

NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel

A NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel súlyos fokú károsodását találtuk. A DM típusától függetlenül az intracelluláris cGMP szintje csökkent, míg a PDE5A expresszió növekedett a miokardiumban. Fentiekhez az eNOS enzim csökkent expressziója is hozzájárulhatott. A jelátviteli út aktivitása jelentősen károsodott, amelyet a csökken p-VASP/VASP arány jelzett. Ezzel párhuzamosan ugyanakkor a plazma nitrit/nitrát szintje nem változott T2DM-ben.

In vivo és in vitro kardiális funkció

A MAP értéke nem különbözött a modellek között, míg a HR T1DM-ben alacsonyabb volt a kontroll csoporténál. A klasszikus szisztolés paraméterek (EF, CO, dp/dt_{max} , LVSP, SW) és a szenzitív kontraktilitás indexek (E_{es} , PRSW) ugyanakkor a szisztolés funkció nagymértékű károsodását jelezték T1DM-ben (1A ábra). Ennek ellenére T2DM esetén megtartott szisztolés



1 ábra. Miokardium diszfunkció T1DM és T2DM modellekben

Kontraktilitás indexek (A): végszisztolés nyomás-térfogat (P-V) összefüggés egyenesének meredeksége (E_{es}), ejekciós frakció (EF). Falmerevség paraméterek (B): végdiasztolés P-V összefüggés egyenesének meredeksége (EDPVR), végdiasztolés nyomás (LVEDP). Csoportok: SD kontroll, streptozotocin (STZ)-kezelt diabéteszes SD, Zucker Diabetic Fatty (ZDF) lean, és ZDF állatok. A diabéteszes csoportok egyes paramétereinek százalékos változását tüntettük fel a megfelelő kontroll csoporthoz viszonyítva. * $p < 0,05$ vs. megfelelő nem diabéteszes kontroll csoport.

funkciót láttunk (1A ábra), míg a diasztolés relaxáció (Tau_w) mindkét modellben károsodott. Megjegyzendő, hogy az EDPVR és az LVEDP értéke T2DM esetén megnőtt, mely a LV falmerevség fokozódására utal (1B ábra). A fentiekkel összhangban a LV kardiomiociták erőmérése során emelkedett $F_{passive}$ míg változatlan F_{max} értéket regisztráltunk, amely a kontraktilis apparátus merevségének jelzője.

Cinaciguat hatása T1DM-asszociált diabéteszes kardiomiopátiában

Alapadatok

A cinaciguatnak nem volt hatása a vércukor, a HW, BW értékekre és a HW/BW arányra.

Nitro-oxidatív stressz

Cinaciguat eredményesen csökkentette a diabéteszsel összefüggő 3-NT emelkedést és megelőzte a különböző antioxidáns enzimrendszerek génexpressziójának fokozódását.

Miokardium hipertrófia és fibrózis

A cinaciguat antifibrotikus hatású volt (csökkent TGF- β immunreaktivitás és az MT pozitív terület mértéke). Cinaciguat megelőzte az MMP rendszer diszregulációját (MMP/TIMP arány helyreállítása). A gyógyszer csökkentette a kardiomiocita átmérőt és az ANF gén expresszióját.

DNS károsodás és apoptózis

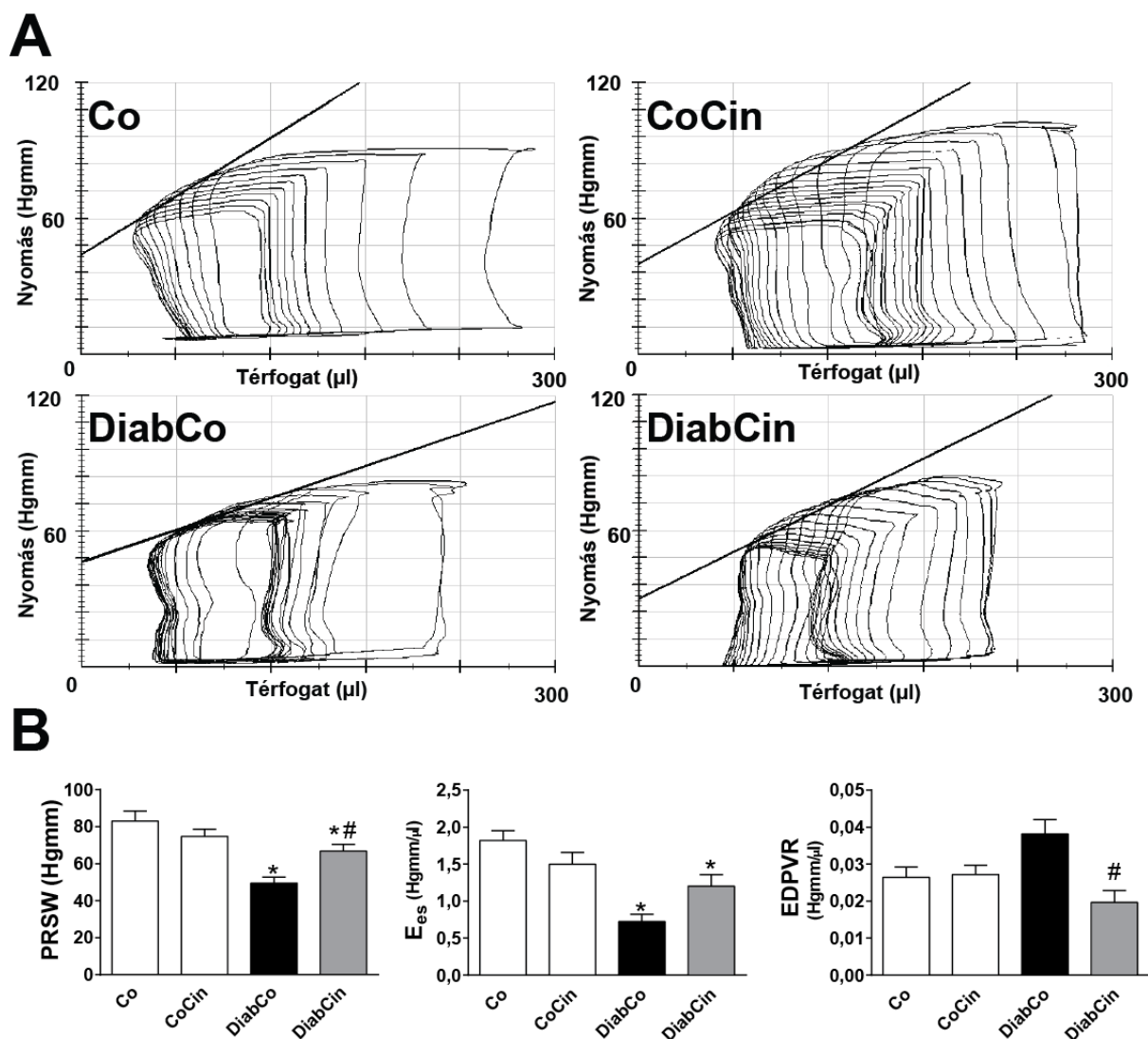
A gyógyszer jelentősen mérsékelte a DNS károsodást és az apoptózist, amit a TUNEL pozitív sejtek számának csökkenése jelzett. A BAX/Bcl-2 arány ugyanakkor nem változott.

NO-sGC-cGMP-PKG szignalizáció

Cinaciguat hatására a jelátvitel aktivitása visszatért a fiziológiás mértékűre (magasabb plazma/miokardiális cGMP szint, alacsonyabb PDE5A expresszió és magasabb p-VASP/VASP arány [PKG aktivitás markere]).

Kardiális funkció

A LV funkciót a cinaciguat szignifikáns mértékben javította: a szisztolés funkció megtartott volt, amelyet a PRSW és EF növekedése jelzett (2. ábra), míg a diasztolés aktív relaxáció és a LV falmerevség szintén javulást mutattak (alacsonyabb Tau_w , LVEDP és EDPVR) (2. ábra).



2. ábra Cinaciguat hatása a miokardium funkcióra T1DM-ben

(A) Nyomás-térfogat (P-V) hurkok, (B) „preload recruitable stroke work” (PRSW), végszisztolés P-V összefüggés egyenesének meredeksége (E_{es}) és a végdiasztolés P-V összefüggés egyenesének meredeksége (EDPVR) láthatóak. Csoportok: placebo-kezelt kontroll (Co), cinaciguat-kezelt kontroll (CoCin), placebo-kezelt diabéteszes (DiabCo) és cinaciguat-kezelt diabéteszes (DiabCin). * $p < 0,05$ vs. Co, # $p < 0,05$ vs. DiabCo

Vardenafil hatása T2DM-hez társuló diabéteszes kardiomiopátiában

Alapadatok

A vardenafil nem volt hatással a BW, HW, HW/BW és glukóz értékekre.

Nitro-oxidatív stressz

Vardenafil alkalmazása eredményesen előzte meg a T2DM-hez társuló nitro-oxidatív stressz kialakulását (alacsonyabb LV 3-NT szint, csökkent kataláz és tioredoxin-1 génexpressziós szintek).

Miokardium hipertrófia és fibrózis

A vardenafil antihipertrófiás és antifibrotikus hatásának bizonyult ZDF állatainkban. Echokardiográfiás vizsgálattal a miokardium hipertrófiát jelző paraméterek (LVAWs, LVAWd) szignifikánsan csökkentek vardenafil-kezelt ZDF állatokban. Továbbá, az ANF gén expressziója és a kardiomiocita átmérő/TL arány is csökkentek ZDF+Vard állatokban. A vardenafil antifibrotikus hatását a MT pontszám és a picosirius pozitív területek csökkenése jelezte.

DNS károsodás és apoptózis

A vardenafil csökkentette a TUNEL pozitív magok számát és a hasított kaszpáz 3 és PARP1 szinteket.

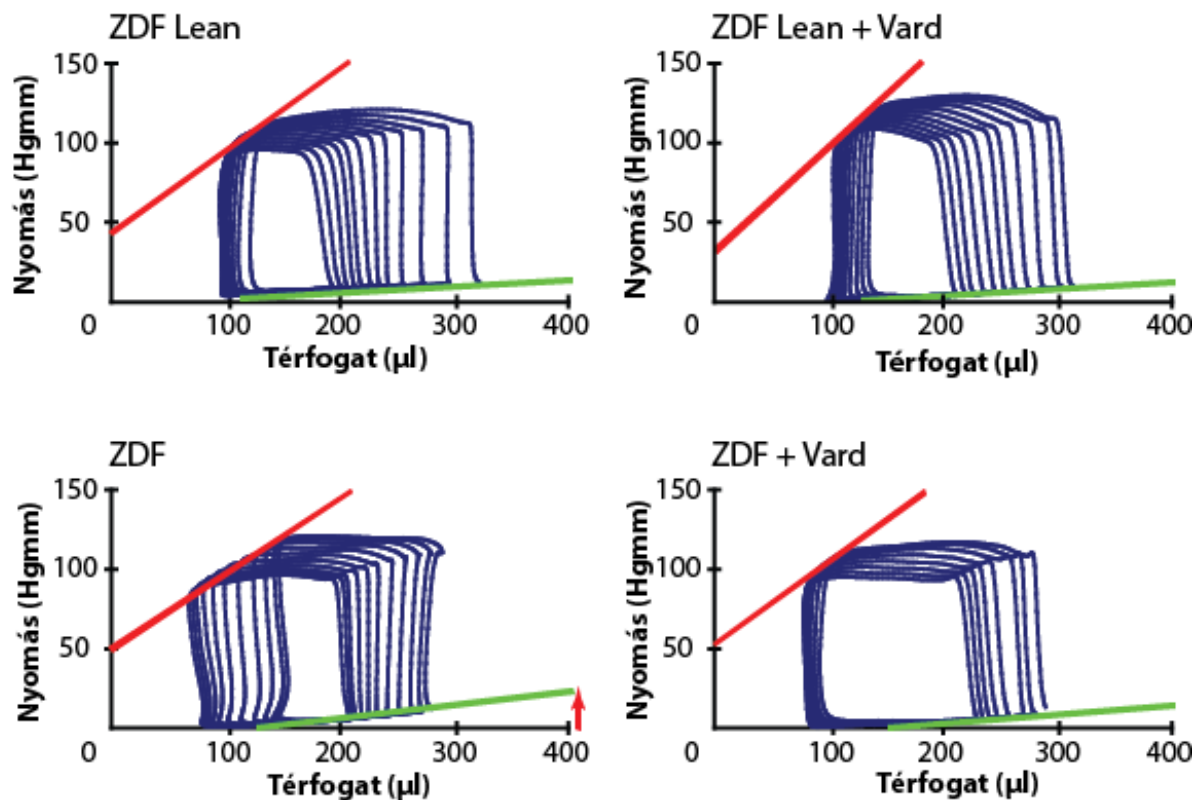
NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel

A vardenafil nem volt hatással a plazma nitrit/nitrát szintekre. Ugyanakkor, a gyógyszer hatásosan reaktiválta a NO-sGC-cGMP-PKG jelátviteli utat, amelyet a magasabb plazma/miokardium cGMP szintek, csökkent PDE5A fehérjeexpresszió és a PKG aktivitás növekedése (magasabb p-VASP/VASP arány) jelzett. Mindezekkel szemben a p-PLB/PLB arány nem változott.

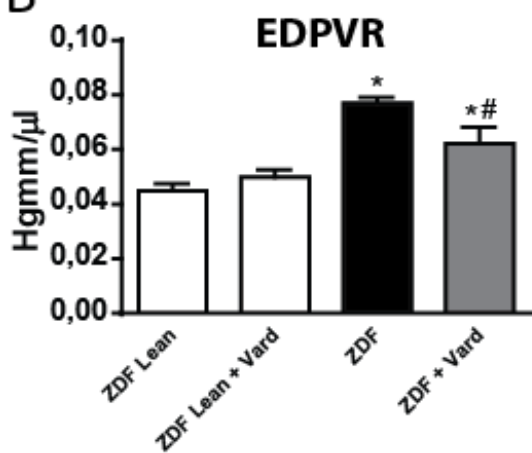
In vivo és in vitro kardiális funkció

T2DM esetén diasztolés diszfunkció alakult ki (fokozott LV falmerevség [meredekebb EDPVR] (3A, B ábrák) és megnyúlt τ_w). Ezzel szemben a szisztolés funkció megtartott volt (3A, C ábrák). Az in vitro kardiomiocita funkció fokozott kardiomiocita merevséggel (magasabb F_{passive}) és változatlan F_{max} értékkel volt jellemezhető. Vardenafil alkalmazásával a súlyos diasztolés diszfunkció eredményesen megelőzhető volt (EDPVR meredeksége szignifikánsan csökkent) (3A, B ábra). Továbbá, az F_{passive} értéke (kardiomiocita stiffness marker) csökkent különböző szarkomerhosszok mellett. Az EDPVR meredeksége pozitívan korrelált a miokardium hipertrófia és fibrózis mértékével.

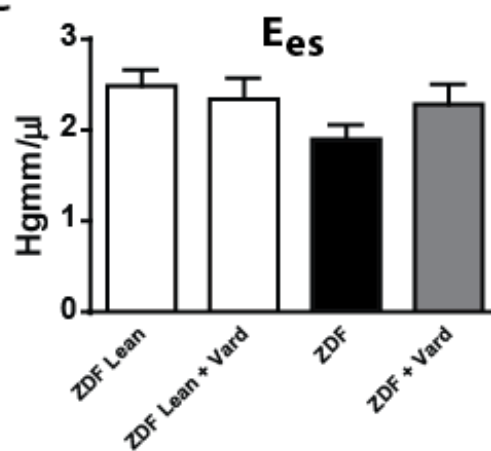
A



B



C



3. ábra Vardenafil hatása az in vivo és in vitro kardiális funkcióra T2DM-ben

(A) Reprezentatív balkamrai (LV) nyomás-térfogat (P-V) görbék. (B) Végdiasztolés P-V összefüggés meredeksége (EDPVR). (C) Végszisztolés P-V összefüggés meredeksége (E_{es}). A nyíl az EDPVR (LV falmervség) növekedését jelöli. Csoportok: placebo-kezelt kontroll (ZDFLean), vardenafil-kezelt kontroll (ZDFLean+Vard), placebo-kezelt diabéteszes (ZDF) és vardenafil-kezelt diabéteszes (ZDF+Vard). * $p < 0,05$ vs. ZDFLean; # $p < 0,05$ vs. ZDF

Következtetések

Első kísérletsorozatunkban a T1DM-ben és a T2DM-ben kialakuló diabéteszes kardiomiopátia összehasonlító vizsgálatát végeztük el. Eredményeink alapján a két típusú diabéteszben különböző hisztológiai és patológiai jellemzőkkel rendelkező kardiomiopátia formák alakulnak ki, melyek ebből eredően eltérő karakterisztikájú kardiális diszfunkcióval társulnak. T1DM esetén szignifikánsan károsodott szisztolés funkciót találtunk, mind a klasszikus mind pedig a speciális kontraktilitás paraméterek tekintetében. Ehhez társultan az aktív relaxáció is károsodott. Ezzel szemben T2DM esetén a szisztolés funkció megtartott volt, míg jelentős diasztolés diszfunkció alakult ki, amely megnövekedett balkamrai falmerevséggel volt jellemezhető. Mindezek háttérében eltérő molekuláris elváltozásokat (nitro-oxidatív stressz, hipertrófia, fibrózis és apoptózis) tártunk fel. A NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel károsodása és aktivitásának csökkenése mindkét modellben megfigyelhető volt.

A második vizsgálatunkban az sGC aktivátor cinaciguat hatásait teszteltük T1DM állatmodelljében. Cinaciguat alkalmazásával sikeresen megelőzhető volt a diabéteszes kardiomiopátiára jellemző szöveti és sejtszintű elváltozások kialakulása (nitro-oxidatív stressz, miokardium remodeláció és apoptózis) a vércukorszintre kifejtett hatás nélkül. A kardioprotektív tulajdonságok háttérében feltehetően a NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel reaktiválódása (magasabb plazma és miokardium cGMP szintek és p-VASP/VASP arány) állhatott.

Harmadik vizsgálatunk során a PDE5A gátlószereinek, a vardenafilnak potenciális kardioprotektív hatásait írtuk le (antifibrotikus, antioxidatív, antiapoptotikus, antihipertrófiás) T2DM állatmodellünkben. Vardenafil alkalmazásával, a NO-sGC-cGMP-PKG tengely reaktiválásán keresztül (plazma/miokardium cGMP emelkedés és p-VASP/VASP arány növekedés), megelőzhetőek voltak a T2DM-hez társuló kóros kardiális elváltozások. Ezek összességében a fiziológiás diasztolés funkció megőrzéséhez vezettek mind in vivo mind pedig in vitro kardiomiocitákban.

Eredményeink szerint a NO-sGC-cGMP-PKG jelátvitel reaktivációja, a fenti gyógyszermolekulák segítségével, előnyös hatású lehet a cukorbetegséghez társuló szívelégtelenség farmakológiai kezelése során. Mindezek alapján az sGC aktivátorok és a PDE5A gátlók fontos terápiás alternatívát jelenthetnek cukorbeteg kardiovaszkuláris megbetegedéseinek kezelésében.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

Mátyás C, Németh BT, Oláh A, Török M, Ruppert M, Kellermayer D, Barta BA, Szabó G, Kökény G, Horváth EM, Beáta Bódi, Papp Z, Merkely B, Radovits T. (2017) Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in type-2 diabetic rats. *Eur J Heart Fail*, 19(3): 326-336.

IF: 6,968 (2016)

Mátyás C, Németh BT, Oláh A, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Kökény G, Horváth EM, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2015) The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 14: 145.

IF: 4,534

Radovits T, Korkmaz S, Mátyás C, Oláh A, Németh BT, Páli S, Hirschberg K, Zubarevich A, Gwanmesia PN, Li S, Loganathan S, Barnucz E, Merkely B, Szabó G. (2015) An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction. *J Diabetes Res*, 2015: 728741.

IF: 2,431

Mátyás Cs, Barta BA, Németh BT, Oláh A, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Kökény G, Horváth EM, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2017) The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiol Hung*, 47(1): 34-45.

Mátyás Cs, Sayour AA, Korkmaz-Icöz S, Oláh A, Németh BT, Páli Sz, Hirschberg K, Zubarevich A, Gwanmesia PN, Li S, Loganathan S, Barnucz E, Merkely B, Szabó G, Radovits T. (2017) An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction. *Cardiol Hung*, 47(2): 102-111.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk

Varga ZV, Matyas C, Erdelyi K, Cinar R, Nieri D, Chicca A, Nemeth BT, Paloczi J, Lajtos T, Corey L, Hasko G, Gao B, Kunos G, Gertsch J, Pacher P. (2017) β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1111/bph.13722.

IF: 5,491 (2016)

Benke K, Sayour AA, Mátyás C, Ágg B, Németh BT, Oláh A, Ruppert M, Hartyánszky I, Szabolcs Z, Radovits T, Merkely B, Szabó G. (2017) Heterotopic Abdominal Rat Heart Transplantation as a Model to Investigate Volume Dependency of Myocardial Remodeling. *Transplantation*, 101(3): 498-505.

IF: 3,678 (2016)

Németh BT, Mátyás C, Oláh A, Lux Á, Hidi L, Ruppert M, Kellermayer D, Kökény G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2016) Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. *Sci Rep*, 6: 37166.

IF: 4,259

Oláh A, Kellermayer D, Mátyás C, Németh BT, Lux Á, Szabó L, Török M, Ruppert M, Meltzer A, Sayour AA, Benke K, Hartyánszky I, Merkely B, Radovits T. (2017) Complete Reversion of Cardiac Functional Adaptation Induced by Exercise Training. *Med Sci Sports Exerc*, 49(3): 420-429.

IF: 4,141 (2016)

Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Boengler K, Rohrbach S, Li L, Schluter KD, Schreckenber R, Radovits T, Oláh A, Mátyás C, Lux Á, Al-Khrasani M, Komlódi T, Bukosza N, Máthé D, Deres L, Barteková M, Rajtík T, Adameová A, Szigeti K, Hamar P, Helyes Z, Tretter L, Pacher P, Merkely B, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. (2016) Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: role of mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311(4): H927-943.

IF: 3,348

Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Li S, Németh BT, Hegedüs P, Brlecic P, Mátyás C, Zorn M, Merkely B, Karck M, Radovits T, Szabó G. (2016) Myocardial reverse remodeling after pressure unloading is associated with maintained cardiac mechanoenergetics in a rat model of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311(3): H592-603.

IF: 3,348

Matyas C, Varga ZV, Mukhopadhyay P, Paloczi J, Lajtos T, Erdelyi K, Nemeth BT, Nan M, Hasko G, Gao B, Pacher P. (2016) Chronic plus binge ethanol feeding induces myocardial oxidative stress, mitochondrial and cardiovascular dysfunction and steatosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(11): H1658-1670.

IF: 3,348

Lee WS*, Erdelyi K*, Matyas C*, Mukhopadhyay P, Varga ZV, Liaudet L, Haskó G, Čiháková D, Mechoulam R, Pacher P. (2016) Cannabidiol limits Tcell-mediated chronic autoimmune myocarditis: implications to autoimmune disorders and organ transplantation. *Mol Med*, 22: 136-146.

IF: 3,457

*Megosztott szerzőség

Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Hidi L, Lux Á, Ruppert M, Kellermayer D, Sayour AA, Szabo L, Torok M, Meltzer A, Geller L, Merkely B, Radovits T. (2016) Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of in vivo hemodynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(5): H587-597.

IF: 3,348

Kovacs A, Oláh A, Lux Á, Mátyás C, Németh BT, Kellermayer D, Ruppert M, Torok M, Szabo L, Meltzer A, Assabiny A, Birtalan E, Merkely B, Radovits T. (2015) Strain and strain rate by speckle tracking echocardiography correlate with pressure-volume loop derived contractility indices in a rat model of athlete's heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308(7): H743-748.

IF: 3,324

Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Merkely G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2015) Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *Int J Cardiol*, 182: 258-266.

IF: 4,638

Radovits T, Oláh A, Lux Á, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Mátyás C, Szabó G, Merkely B. (2013) Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy - hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(1): H124-134.

IF: 4,012

Benke K, Sayour AA, Ágg B, Radovits T, Szilveszter B, Odler B, Németh BT, Pólos M, Oláh A, Mátyás C, Ruppert M, Hartyánszky I, Maurovich-Horvat P, Merkely B, Szabolcs Z. (2016) Gene polymorphisms as risk factors for predicting the cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. *Cardiol Hung*, 46(2): 76-81.

Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Geller L, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2016) Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *Cardiol Hung*, 46(1): 1-9.

Oláh A, Lux Á, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Mátyás C, Ruppert M, Merkely G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2013) Detailed hemodynamic characterization of athlete's heart – Left ventricular pressure-volume analysis. *Cardiol Hung*, 43(5): 224-232.

Radovits T, Mátyás C, Oláh A, Kökény G, Barnucz E, Szabó G, Merkely B. (2012) Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil on diabetic cardiovascular dysfunction. *Cardiol Hung*, 42(5): 272-279.