

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A diasztolés diszfunkció kialakulását meghatározó miokardiális
változások a szívelégtelenség különböző klinikai formáiban**

Dr. Borbély Attila



DEBRECENI EGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
Kardiológiai Intézet, Kardiológiai Tanszék és Klinikai Fiziológiai Tanszék

Debrecen

2025

I. BEVEZETÉS, TÉMAVÁLASZTÁS

1.1. A szívelégtelenség definíciója, klinikai formái

A szívelégtelenség a szív strukturális és/vagy funkcionális károsodása következtében létrejövő komplex klinikai szindróma, mely során a betegeknél típusos panaszok és tünetek lépnek fel. A szívelégtelenség tünetei nyugalomban vagy terhelés hatására az alacsony perctérfogat és/vagy az emelkedett intrakardiális nyomás következtében jönnek létre.

Az Európai Kardiológus Társaság (ESC) 2021-ben kiadott szakmai ajánlása alapján a bal kamrai ejekciós frakció (BKEF) értéke szerint a szívelégtelenség három klinikai formáját különítjük el: 1. szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval: $BKEF \leq 40\%$ (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF), 2. szívelégtelenség enyhén csökkent ejekciós frakcióval: $BKEF 41-49\%$ (heart failure with mildly reduced ejection fraction, HFmrEF) és 3. szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval: $BKEF \geq 50\%$ (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF).

1.2. A szívelégtelenség epidemiológiája, klinikai és társadalmi jelentősége

A szívelégtelenség progresszív, rokkantságot okozó, magas morbiditással és mortalitással járó betegség. Napjainkban világszerte kb. 64 millió, Európában 15 millió szívelégtelen beteg él. A szívelégtelenség prevalenciája a nyugati társadalmakban 1-2% közé tehető, a 65 év feletti populációban eléri 6-10%-ot, az évente diagnosztizált új esetek száma 1-5 eset/1000 lakos, mely évtizedenként megduplázódik. A szívelégtelenség mellett, hogy jelentősen rontja a betegek életminőséget, kezelése magas közvetlen és közvetett költséggel jár (kórházi kezelések, gyógyszerek és a munkaképesség elvesztése), óriási társadalmi, gazdasági terhet ró a betegekre, gondozóikra és az egészségügyi rendszerekre.

A rendelkezésre álló nem gyógyszeres, gyógyszeres, eszközös és sebészi kezelési eljárások ellenére mindhárom szívelégtelenség fenotípus halálozása továbbra is rendkívül magas, a felismerést követő első évben megközelíti a malignus betegségek mortalitását (30-40%), az ötödik évben pedig elérheti az 60-70%-ot is. Közvetlenül a kórházi elbocsátást követően a HFpEF prognózisa jobb, ugyanakkor a hosszú távú prognózis és a kórházi újrafelvételek száma a HFrEF-el megegyező. Az elmúlt évtizedben végzett epidemiológiai vizsgálatok alapján egyértelművé vált, hogy összhalálozás és a kardiovaszkuláris halálozás a HFrEF csoportban magasabb a HFmrEF és a HFpEF csoporthoz képest, a nem kardiovaszkuláris okból bekövetkező halálozás és hospitalizáció ugyanakkor a HFpEF és a HFmrEF betegekben gyakoribb. HFrEF betegek túlélése az elmúlt két-három évtizedben szignifikánsan javult, azonban a HFpEF-ben szenvedőké érdemben nem változott. Ezen

jelentős különbség háttérében nagyrészt az állhat, hogy a HFrEF kialakulásához vezető kórfolyamatok viszonylag jól ismertek, HFpEF patofiziológiája ugyanakkor továbbra is igen ellentmondásos. A kórfolyamatok pontosabb megértése nagymértékben hozzájárulhat a HFpEF korai felismeréséhez és a jelenleginél hatékonyabb kezelési stratégiák kidolgozásához.

1.3. HFrEF és HFpEF: eltérő etiológia és patofiziológia

A szív strukturális és/vagy funkcionális rendellenességeihez, a bal kamra szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkciójához számos betegség vezethet. A szívelégtelenség legfontosabb rizikófaktorai a hipertónia, a koronária betegség, a 2-es típusú diabétesz, az elhízás, a dohányzás, az alkohol- és kábítószer fogyasztás, valamint az irradiáció és bizonyos kemoterápiás szerek alkalmazása.

A HFrEF legfontosabb okait a jelenleg érvényben lévő etiológiai felosztás alapján a szívizomzat közvetlen károsodása, a kóros kamrai telődési viszonyok és az aritmiák képezik. A szívizomzat károsodásáért a klinikai gyakorlatban leggyakrabban az ischaemiás szívbetegség és a primer szívizombetegségek, az un. kardiomiopátiák tehetők felelőssé. A szívizomzat toxikus ágensek hatására létrejövő, immun/gyulladásos, metabolikus/infiltratív, az endokrin betegségek által okozott károsodásai ugyancsak kiemelt jelentőségűek. Kóros telődési viszonyokhoz vezető kórállapothoz leggyakrabban a hipertónia, a szívbillentyűk, a perikardium és az endomiokardium betegségei vezetnek. A pitvari és kamrai aritmiák (pl. pitvarfibrilláció és pitvari flutter, pitvari tachycardia, kamrai extraszisztolé, kamrai tachycardia), valamint alacsony kamrafrekvenciával járó ritmus- és vezetési zavarok (szinuszcsemó-betegség, pitvar-kamrai blokk) fennállási idejüktől függően szintén szívelégtelenség kialakulását eredményezhetik. A HFrEF patofiziológiájában a szervezet neurohormonális rendszereinek - ezeken belül a szimpatikus idegrendszer és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) - aktivációja kiemelt szerepet játszik. A tartósan emelkedett neurohumorális és vazokonstriktor ágensek hatására a szívizomzat kóros strukturális és funkcionális átépülése, un. remodelling jön létre. HFrEF-ben a remodelling excentrikus megjelenésű és főként szisztolés funkciózavart eredményez. Az érintett neurohumorális rendszerek gátlószerei (angiotenzin konvertáló enzim (ACE)-gátlók, angiotenzin receptor-blokkolók (ARB-k) vagy angiotenzin receptor neprilizin inhibitorok (ARNI), béta-blokkolók, mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA)) és a nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlók a HFrEF kezelésének alappilléreit képezik, ezeket a gyógyszereket - kontraindikáció vagy intolerancia hiányában - minden HFrEF betegnek kapnia kell (I. osztályú ajánlás, A evidencia szint).

A HFpEF etiológiai szempontból is különbözik a HFrEF-től. A HFpEF-ben szenvedő betegek általában idősebbek, nagyrészt nők, köztük gyakoribb az elhízás, a hipertónia, a

pitvarfibrilláció, ugyanakkor ritkább a koronáris betegség előfordulása. A HFpEF betegeknél rendszerint számos kísérőbetegséget (COPD, vashiány, anémia, veseelégtelenség, depresszió) is fel lehet ismerni. A HFpEF klinikai megjelenése, a betegségben megfigyelhető strukturális és hemodinamikai jellemzők is nagymértékben eltérnek a HFrEF-ben észleltektől.

A diabétesz mellitusz (DM) előfordulása szívelégtelenségben egyre nő, a szívelégtelenségben szenvedő cukorbeteg halálozási és hospitalizációs aránya továbbra is különösen magas. A DM a szívelégtelen betegek 20-35%-ában fordul elő, HFpEF-ben ez az arány még magasabb. A 2-es típusú DM és a HFpEF gyakran együttesen fordul elő, hiszen mindkét állapothoz magasvérnyomás betegség, elhízás és idős kor társul. A DM önmagában is közvetlenül károsítja a szívizomzat felépítését és működését, melynek legkorábbi jele a diasztolés funkció romlása. A jelenség patofiziológiája a több mint három évtizedes klinikai- és alapkutatás ellenére sem kellően tisztázott, mely nagyban megnehezíti új és hatékony kezelési stratégiák kidolgozását.

Ismert, hogy a hiperglikémia az extracelluláris mátrixban, a szívizom anyagcseréjében, a szívizom kontraktilis rendszerében és a szívizomzatot ellátó erekben számos komplex maladaptív folyamatot indít el. DM-ben az extracelluláris mátrix összetétele megváltozik: az I-es típusú kollagén felszaporodása és a kollagén lebontásáért felelős mátrix metalloproteinázok csökkent expressziója következtében az intersticiális és a perivaszkuláris fibrózis növekedése figyelhető meg. A glikációs végtermékek (AGEs) olyan fehérjék vagy lipidek, amelyek aldóz cukrokkal való reakciójuk következtében nem enzimátikus úton glikálódnak, majd oxidálódva közel irreverzibilis keresztkötéseket hoznak létre. Lerakódásuk közvetlen és közvetett módon is hozzájárul a balkamrai szívizomzat-feszülés növekedéséhez.

1.4. Hemodinamikai változások HFrEF-ben és HFpEF-ben

A HFrEF-ben a bal kamra szisztolés pumpafunkciójának romlását (a kontrakciós erő és a BKEF csökkenését) hangsúlyozzák, míg a HFpEF-ben definíció szerint a bal kamra relaxációs zavarát - érdemi szisztolés funkcióvesztés nélkül - emelik ki, mely változások bal kamrai nyomástér-fogat összefüggések segítségével is illusztrálhatóak. A klinikai gyakorlatban a diasztolés diszfunkció kvantitatívan a transzmitrális korai (MV E, mm/s) és késői pitvari (MV A, mm/s) áramlási csúcssebesség, az E/A arány, a bal kamrai diasztolés nyomáscsökkenés és bal kamrai diasztolés telődés echokardiográfiás paramétereivel jellemezhető. A diasztolés nyomáslejtő abnormitása a $-dp/dt$ csúcértékének csökkenésében, az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) és az ehhez tartozó időállandó (τ) megnyúlásában tükröződik.

A HFpEF-ben szenvedő betegek nagy része nyugalomban panaszmentes, fizikai terhelés hatására azonban légszomjérzés, fulladás, esetleg súlyos kisvérköri pangás alakulhat

ki. A normál viszonyokkal ellentétben terhelés hatására a bal kamrai végdiasztolés volumen HFpEF-ben változatlan marad, a pulmonális kapilláris éknyomás (PCWP) viszont nagymértékben emelkedik. Utóbbiak miatt a betegek nehezen tolerálják az elő- és utóterhelés fokozódását, a diasztolés idő csökkenését (tachycardia) vagy a pitvari kontrakció kiesését (pitvarfibrilláció). A kórosan emelkedett bal kamrai töltőnyomás pulmonális pangáshoz, pitvarfibrilláció, pulmonális hipertónia, valamint jobb kamra diszfunkció kialakulásához vezet.

1.5. A HFrEF és a HFpEF gyógyszeres kezelése

Az utóbbi évtizedekben az intenzív kutatásoknak köszönhetően a szívelégtelenség gyógyszeres terápiája jelentős fejlődésen ment keresztül. A bázisterápiát képező gyógyszerek közös jellemzője, hogy csökkentik a mortalitást, a hospitalizációk számát, így javítják a betegség prognózisát. A RAAS-gátló vegyületek közül kiemelendők az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE)-gátlók, melyek az ACE mediálta angiotenzin I (ATI) és angiotenzin II (ATII) átalakulás folyamatát gátolják. Az ACE-gátlók vazodilatáció révén csökkentik a bal kamrai utóterhelést, az afterload-ot, de a só- és vízretenció csökkentése révén a bal kamrai előterhelésre, a preload-ra is hatással vannak. A direkt kardiális hatások közül fontos az antiproliferatív, antifibrotikus és anti-remodelling hatás. ACE-gátló intolerancia esetén az ATII receptorának (AT1) közvetlen gátlására angiotenzin-receptor blokkolók (ARB-k) alkalmazásával nyílik lehetőség. A HFrEF-ben számos evidencia áll rendelkezésre a nátriuretikus peptidekhez (NP, pitvari és agyi nátriuretikus peptid: ANP és BNP) köthető útvonalak szerepéről is. Ezen peptid hormonok aktív formáinak pozitív hatásai közül kiemelendő a nátriurézis, a RAAS gátlása, valamint az antiapoptotikus és antiremodellációs hatások. A nátriuretikus peptidek lebontásáért felelős neutrális endopeptidáz, neprilizin gátlásával az aktív forma szintje növelhető, ezáltal számos pozitív hatás érhető el, ahogyan ezt mára több nagy klinikai tanulmány is igazolta. Ennek megfelelően ARB-vel kombinálva a neprilizin inhibitor, a szakubitril a HFrEF bázisterápiájában szintén alkalmazandó megközelítés, mivel ilyenkor a RAAS gátlás és a NP útvonal befolyásolása egymást erősítve jön létre. Az MRA-k a nátrium-reabszorpció gátlásán keresztül hatékonyan képesek fokozni a nátrium ürítést, továbbá hosszú távon szintén csökkentik a mortalitást, illetve a kórházi kezelések számát is. A szimpatikus idegrendszer túlaktivációja szelektív β_1 -receptor blokkolók segítségével valósítható meg, melyek ugyan rövid távon negatív inotróp hatásúak, de hosszabb távon mindezt ellensúlyozzák a mortalitáscsökkentő hatások (pl. remodeláció és RAAS-gátlás, katekolamin okozta miokardiális toxicitás csökkentés). Az SGLT2 gátlók 2021-ben több mérföldkő tanulmány pozitív eredményei alapján bekerültek a HFrEF bázisterápiájába. Az SGLT2 gátlók hatásmechanizmusa még továbbra sem teljesen tisztázott, azonban az ismert, hogy a vese

csökkenő glükóz és nátrium-reabszorpciója valószínűleg hozzájárul ezen szerek diuretikus hatásához, következtetésképp hatékonyan csökkentik az intersticiális ödémát és preload-ot is.

A HFrEF első vonalbeli gyógyszeres kezelését tehát *négy gyógyszercsoport* képezi: 1. ACE-gátlók vagy angiotenzin receptor neprilizin inhibitor (ARNI); 2. béta-receptor blokkolók (BB); 3. mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA); 4. nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlók.

Azon HFrEF betegek számára, akik az első vonalbeli gyógyszerek ellenére panaszosak maradnak, ún. *másodvonalbeli gyógyszerek* állnak rendelkezésre. Ebbe a csoportba tartoznak a diuretikumok, az angiotenzin receptor blokkolók (ARB-k), az ivabradin, a direkt vazodilatátor kombináció (hydralazin+nitrát), a digoxin és a szolubilis guanilat cikláz stimulátor vericiguat.

Az elmúlt két évtizedben végzett számos klinikai vizsgálat (perindopril (PEP CHF), irbesartan (I-Preserve), candesartan (CHARM Preserved), spironolakton (TOPCAT), nebivolol (SENIORS), angiotenzin receptor-neprilysin inhibitor LCZ696 (PARAGON-HF), vericiguat (SOCRATES-PRESERVED), ivabradin (EDIFY)) ellenére a HFpEF kezelésére 2021-ig nem állt rendelkezésünkre olyan bizonyítékokon alapuló terápia, amely a betegek prognózisát lényegesen javítaná. Ennek oka leginkább az, hogy a kórkép patofiziológiája kellő részletességgel továbbra sem ismert. Emiatt nem sikerült olyan klinikai szempontból fontos gyógyszer támadáspontokat azonosítani, mely HFpEF esetén - a HFrEF gyógyszeres kezelésében már elért - eredményességet biztosíthatna. Az érvényben lévő szakmai ajánlások szerint a HFpEF kezelésének a vérnyomás normalizálására, a bal kamra hipertrófia regressziójának elősegítésére (ACE-gátlók, ARB-k, MRA-k), a tachycardia megelőzésére (β -blokkolók), a normál pitvari kontrakció fenntartására (antiarritmiás szerek, abláció) és a pangásos tünetek csökkentésére (diuretikumok) kell irányulnia. A RAAS-re ható szerek HFpEF-ben tapasztalt relatív hatástalansága és az újabb kutatási eredmények tehát arra hívják fel a figyelmet, hogy a két kórkép kapcsán a miokardium működésének humorális szabályozása is nagymértékben eltérő. HFpEF-ben a specifikus etiológia tisztázása, a kardiovaszkuláris és nem kardiovaszkuláris társbetegségek azonosítása és megfelelő kezelése, a nátrium- és vízretenció megakadályozására diuretikumok adása javasolt. Örömteli, hogy 2021-ben a HFmrEF és a HFpEF betegek kezelésére két SGLT2 gátló (empagliflozin (EMPEROR-Preserved) és dapagliflozin (DELIVER)) is hatékonynak bizonyult a kardiovaszkuláris halálozás és a szívelégtelenség miatti kórházi felvételek számának csökkentésében.

Az eddigiekben azt kívántam megvilágítani, hogy a szívelégtelenség kialakulásának középpontjában a bal kamrai szisztolés és/vagy diasztolés funkció hanyatlása áll. Arra is hangsúlyt kívántam fektetni, hogy a jelenlegi gyógyszeres kezelések a szív összehúzódásait és

elernyedéseit közvetlenül nem befolyásolják. A hagyományosnak tekintett és széles körben elterjedt β -mimetikus pozitív inotróp hatású gyógyszerekkel kapcsolatban komoly klinikai tapasztalat halmozódott fel, mely a klinikusokat alkalmazásuk korlátozására inti. Az új hatásmechanizmusú, miozin-aktivátor pozitív inotrópokkal kapcsolatban jelenleg még kevés a meggyőző preklinikai és klinikai tapasztalat.

Kutatómunkám során elsősorban olyan erőfeszítéseket kívántam tenni, melyek segítségével a bal kamrai szisztolés és diasztolés funkció HFpEF-ben és HFrEF-ben jelentkező eltérései sejtszintű és molekuláris szinteken is értelmezhetővé válnak. Kutatási eredményeink a szívelégtelenség jövőbeli kezeléséhez és a pumpafunkció gyógyszeres támogatásához nyújtanak újszerű támpontokat.

1.6. A szívizomzatban bekövetkező strukturális és funkcionális változások a szívelégtelenség különböző formáiban

1.6.1. A szívizomzat kontraktilitását meghatározó tényezők HFrEF-ben és HFpEF-ben

A szív összehúzódásait a szívizomsejtek kontraktilis fehérjerendszerei (ún. miofilamentumok) hozzák létre, melyek szarkomerekbe rendeződve koordinálják a sejtrövidülésekhez és ezáltal erő- és kamrai nyomás-növekedésekhez vezető folyamatokat. A szisztoléhoz a szívizomsejtek intracelluláris kalciumion (Ca^{2+}) koncentrációjának emelkedni kell, míg a relaxáció a Ca^{2+} koncentráció diasztolés szintre történő csökkenését feltételezi. A szívizomsejt kontrakciója és relaxációja tehát az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tranziens emelkedésének és csökkenésének (röviden a Ca^{2+} tranziensnek) a függvénye. Az ún. vékony (dominánsan aktin) és vastag (dominánsan miozin) miofilamentumok Ca^{2+} -szabályozott interakciója (aktin-miozin ciklus) hatására ébredő erő- és sejthossz-változásokra, mint a szívizomsejt aktív tulajdonságaira hivatkozunk. A szívizomsejt Ca^{2+} -független mechanikai viselkedését, passzív tulajdonságokként jelölik meg. Utóbbiak a szívizomsejt nyújthatóságát, rugalmasságát tükrözik, melyek a miofilamentumokon kívül a szívizomsejtek citoskeletális rendszereinek köszönhetők. A szívizomsejtek aktív és passzív tulajdonságait számos paraméter: pl. az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, a miofilamentális és citoskeletális fehérjék mennyisége és összetétele, azok foszforiláltsága, oxidatív állapota, a szarkomerek hossza (pl. kamratágulat kapcsán), továbbá különböző élettani és kóros jeltovábbító mechanizmusok együttesen határozzák meg. A szívizomszövet szisztolés és diasztolés működésére a szívizomsejteken kívül az extracelluláris mátrix (pl. a kötőszövet szerveződése, a kollagén lerakódással járó fibrózis stb.), a perikardiális tér, a keringés hemodinamikai paraméterei és szervezetben érvényesülő neurohumorális kontroll egyaránt hatást gyakorol. Mindazonáltal a szív szisztolés

és diasztolés funkcióinak megértéséhez és a kóros kontraktilitás javításához csak a szívizomsejtekben érvényesülő folyamatokon keresztül juthatunk el. Kutatómunkám során a szív diasztolés funkcióját befolyásoló celluláris tényezők feltárásának kiemelt figyelmet szenteltem.

A HFrEF-ben észlelt csökkent szívizomsejt-kontraktilitás hátterében a sejtszintű Ca^{2+} mozgásokért felelős fehérjemolekulák szerkezeti, funkcionális változásai, a kontraktilis fehérjerendszer megváltozott Ca^{2+} érzékenysége és az aktin-miozin keresztkötési ciklus kóros működése egyaránt állhat.

A HFrEF-re jellemző diasztolés diszfunkció során a bal kamra telődése lassú, és a pitvari komponens arányának fokozódása ellenére is csak részleges. Mindezek a kamrafal merevségét tükrözik, mely a szívizomsejtek és az extracelluláris mátrix szerkezet és/vagy passzív funkcióváltozásai következtében jöhetnek létre. Az intracelluláris elemek közül elsősorban a citoskeleton felépítésében szerepet játszó óriásfehérjét, a titint és a mikrotubuláris fehérjéket övezi figyelem, míg az extracelluláris mátrixban a kollagén és az elasztin bír megkülönböztetett jelentőséggel.

A *szívizomsejtek* mechanikai tulajdonságai a miofibrilláris struktúra elemi egységeinek (szarkomerek) hossz-függő viselkedésétől és a Ca^{2+} -szabályozott aktin-miozin interakcióitól elválaszthatatlanok. A szívizomsejtek nyújtása kapcsán tapasztalt erőnövekedés Ca^{2+} jelenlétében a Frank-Starling-mechanizmusról, míg Ca^{2+} hiányában a relaxált izom passzív rugalmasságáról ad felvilágosítást. A szívizomsejtek által generált erő Ca^{2+} -függését ép sejtmembránnal (szarkolemma) határolt, intakt szívizom preparátumokon nehéz megítélni, mert az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a szív ciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. Ez a tény és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció pontos mérésének technikai nehézségei miatt a miofibrilláris erő Ca^{2+} -függésének tanulmányozására egyszerűbb rendszerekre van szükség. A mérésekhez leggyakrabban szarkolemmájuktól megfosztott, permeabilizált szívizom preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok mioplazmatikus terében a szabad Ca^{2+} koncentrációja szabályozható, a kialakult erő pedig ellenőrzött szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Az egyedi szívizomsejten rögzített hossz-feszülés összefüggés (ún. Starling-görbe) csúcspontja, 2,2-2,3 μm körüli szarkomerhossznál alakul ki, itt maximális a miozin és az aktin közötti interakció hatékonysága. A szívizom esetében a szarkomerhossz ritkán haladja meg a 2,2-2,4 μm értéket, a szívizom masszív elasztikus rendszerei (kollagén, titin) ugyanis megakadályozzák a miofilamentumok túlzott megnyúlását.

A *titin*, vagy más néven konnektin 3000 kDa-t meghaladó molekulatömegével az eddig ismert legnagyobb méretű izomfehérje. A titin molekuláris „rugóként” működve felelős a

szívizomsejtek Ca^{2+} független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) kialakításáért. A titin a fél szarkomeren végighúzódik, kiterjedése a Z lemeztől az M sávig terjed, biztosítja a szarkomer magas fokú rendezettségét. Az óriásfehérje több miofilamentális és regulatórikus fehérjével áll kapcsolatban (pl. miozin nehéz láncok, miozin-kötő C fehérje, miomezin, T-cap fehérje, α -aktinin, aktin, calpain), részt vesz jelátviteli folyamatokban, mechanoszenzorként érzékelni képes a diasztolés megnyúlás és a szisztolés kontrakció alatt bekövetkező erőváltozásokat. Szerepe van a korai diasztolés visszarendeződésben, valamint a Frank-Starling mechanizmusra jellemző hosszfüggő aktivációban is.

1.6.2. A miofilamentális fehérjék transzkripció és poszttranszlációs módosulásai szívelégtelenségben - korábbi kutatási eredmények

Szívelégtelenség során a kontraktilis fehérjék expresszióját, foszforilációs és oxidációs állapotát érintő változásokról számos adat áll rendelkezésünkre.

Emlős szívizomban szövet-specifikus alternatív „splicing” mechanizmussal a titin két izoformája található meg: a hosszabb és rugalmasabb N2BA (~3,2-3,7 MDa) és a rövidebb és merevebb N2B (~3 MDa), melyek aránya egészséges humán szívizomzatban 35:65-re tehető. Rágcsálószívben ugyanakkor szinte kizárólag a rövidebb és merevebb N2B izoforma fordul elő. A titin fehérje nyújthatóságáért a szarkomer I sávjában található, ~1 MDa-os szakasz a felelős, amely a proximális és disztális immunglobulinszerű (Ig) doméneket, a PEVK (prolinban, glutaminsavban, valinban és lizinben gazdag) régiót, valamint az N2B elemet tartalmazza. Az N2BA izoforma N2A elemet is tartalmaz, ezen kívül egy további, ún. középső Ig doménnel és változó hosszúságú PEVK régióval rendelkezik, melyek biztosítják ezen izoforma magasabb fokú rugalmasságát. Az N2BA és N2B titin izoformák arányának megváltozása (titin izoforma váltás) hatással van a szívizomsejtek passzív feszülésére.

Külföldi kollaborációs partnereinkkel végzett korábbi vizsgálatainkban elsőként mutattunk rá, hogy a HFpEF kialakulásában központi szerepet játszó diasztolés diszfunkció hátterében a szívizomzat kóros relaxációja és a szívizomsejtek Ca^{2+} -tól független ún. passzív feszülés értékének megnövekedése felismerhető. 2005-ben publikált tanulmányunkban HFpEF-ben szenvedő betegek *in vivo* meghatározott hemodinamikai paramétereit, valamint a betegekből diagnosztikus szívkatéterezés során nyert endomiokardiális biopsziák felhasználásával az *in vitro* mért szívizomsejt-funkciót, a miofilamentális fehérje-összetételt és a fibrózis mértékét vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a biopsziákból izolált, membránfosztott szívizomsejtekben mért $F_{\text{passzív}}$ kóros mértékben emelkedett. Vizsgálataink legérdekesebb eredményeként összefüggést találtunk a magas $F_{\text{passzív}}$ és a bal kamra diasztolés funkcióját jellemző *in vivo* mért paraméterek (pl. bal kamrai végdiasztolés nyomás, miokardiális stiffness

modulus) között. Az emelkedett $F_{\text{passzív}}$ -ot a β -adrenerg útvonal kulcsenzimével, a protein kináz A-val (PKA) történt kezelés a kontroll csoportban mért értékre csökkentette.

Tekintettel arra, hogy a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ -ot membránfosztott szívizomsejteken határoztuk meg, az emelkedett $F_{\text{passzív}}$ háttérében a miofilamentális fehérjék, feltételezhetően a titin izoforma összetételében és/vagy foszforilációjában bekövetkező változások állhatnak. Irodalmi adatok alapján ugyanakkor a titint érő oxidatív károsodások is fontos szerepet játszhatnak az $F_{\text{passzív}}$ szabályozásában: például az N2Bus régióban oxidáció hatására létrejövő diszulfid hidak növelik a szívizomsejtek passzív feszülését.

A HFpEF betegekből diagnosztikus szívkatéterezés során nyert endomiokardiális biopsziák elemzése során az is kiderült, hogy szívizomsejtek mellett az őket körülvevő extracelluláris mátrixban és a szívizomzat mikrovaskuláris rendszerében is számos kóros eltérés jön létre. A HFpEF-ben megfigyelhető endotheliális diszfunkció háttérében nagy valószínűséggel az endothelium gyulladásos folyamatai állnak. HFpEF-ben megváltozik az extracelluláris mátrix összetétele is: az intersticiális térben növekszik az I-es típusú kollagén lerakódása, elsősorban perivaszkuláris fibrózis alakul ki. Emellett a kollagén lebontásáért felelős mátrix metalloproteinázok expressziójának csökkenését is kimutatták.

A fentiekben vázlatosan ismertetett hemodinamikai paramétereket, a bal kamra morfológiát, a szívizomsejtek passzív feszülését, az extracelluláris mátrix szerkezetét és a mikrovaskulátúra különböző szintjeit érintő változások együttesen, de vélhetően nem mindig egységes mértékben járulnak hozzá a HFpEF-ben megfigyelhető miokardiális diszfunkcióhoz. Továbbá, az elmúlt években a mitokondriális és energetikai diszfunkciók feltételezett kóros szerepe is a HFpEF kutatások előterébe került. Mindazonáltal a szívizomsejt hipertrofia, a csökkent NO termelés, a következményes PKG alulműködés következtében létrejövő fokozott szívizomsejt merevség ($F_{\text{passzív}}$ növekedés) és a fibrózis jelenleg is kiemelt figyelmet érdemel a bal kamrai diasztolés diszfunkció elemzésekor. A felsorolt résztényezők HFpEF-hez rendelhető patofiziológiai jelentősége azonban pillanatnyilag még vitatott.

1.6.3. A mieloperoxidáz enzim (MPO) szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedésekben, oxidatív fehérjekárosodások a szívizom kontraktilis fehérjerendszerében

A mieloperoxidáz enzim egy olyan lizoszomális hemfehérje, mely a szívizomban a fehérvérsejtek aktivációjakor szabadul fel. Az enzimműködés következtében oxidatív szabad gyökök keletkeznek, melyek hozzájárulnak a szervezet védekezőképességéhez, de a szívszövetet is károsíthatják. Az MPO ígéretes biomarker számos kardiovaszkuláris megbetegedésben, mivel az enzimnek fontos szerepet tulajdonítanak a miokardiális infarktust követő bal kamrai remodelling kialakulásában. Az MPO plazmakoncentrációja ugyanakkor

nem különbözik iszkémiás és non-iszkémiás kardiomiopátiában, ami az enzim általános szerepére utal.

Szívelégtelenségben a reaktív oxigén gyökök (ROS) a kontraktilis rendszer erőgeneráló képességét nemcsak indirekt módon (Ca^{2+} homeosztázis zavara, kinázok aktiválása), hanem a miofilamentális fehérjék funkciójának direkt károsítása révén is képesek csökkenteni. Mindez hozzájárulhat a szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkciót létrejöttéhez. A kontraktilis rendszer oxidatív károsodása a szarkomerek szintjén, egyes fehérje-aminosav-oldalláncok poszttranszlációs módosításaival valósul meg, melyeket az alábbiakban részletezem.

Az aminosavláncon belüli metionin (Met) oxidációja során metionin-szulfoxid (MetSO) keletkezik, amely enzimatikusan, a MetSO-reduktáz segítségével képes visszaalakulni a kiindulási aminosavvá. A MetSO azonban nagyobb mértékű oxidatív károsodás hatására irreverzibilisen metionin-szulfonná alakulhat.

A cisztein (Cis) aminosav fehérjén belüli szabad SH csoportjainak oxidációjakor intra- vagy intermolekuláris *diszulfid hidak* (RS-SR') keletkezhetnek az instabil szulfénsav (R-S-OH) intermediéren keresztül, vagy anélkül. A szulfénsav további ROS hatására szulfinsavvá (R-SO₂H), majd szulfonsavvá (R-SO₃H) alakul. Oxidált glutationnal történő reakcióban glutationilált tiol (RS-SG), hidrogén-szulfid hatására szulfhidrált tiol (R-SSH), NO hatására S-nitrozilált tiol (R-S-NO) képződik, míg nitroxil (HNO) hatására szulfinamid, vagy diszulfid jön létre. Az S-glutathionilálás és diszulfid-képződés reverzibilis, míg a szulfon sav keletkezése irreverzibilis reakció. Nem minden, Cis-t érintő oxidatív poszttranszlációs módosítás vezet a kontraktilis funkció csökkenéséhez: enyhe oxidatív stresszt követően a fehérjék S-nitrozilálása (SNO) kardioprotektív, HNO hatására pedig a kalcium-érzékenység és kontraktilis erő növekedése figyelhető meg.

Nagyobb mértékű oxidatív stressz hatására a szívizomfehérjék *karbonilációja* következik be. Direkt oxidációval a fehérjék lizin, arginin, prolin és threonin aminosav oldalláncain alakulhatnak ki karbonil csoportok. Cisztein, lizin és hisztidin aminosavakon is kialakulhatnak karbonilszármazékok lipidek, karbohidrátok és előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products, AGEs) oxidálásával keletkező reaktív karbonil gyökökkel történő másodlagos reakció során.

A tirozin aminosavak oxidatív hatásra nitrálódhatnak és klorinálódhatnak. A 3-*klorotirozin* az mieloperoxidáz (MPO)-működés specifikus markere, míg nitrotirozin keletkezhet MPO és ONOO⁻ (peroxinitrit) reakciói során is. MPO hatására a tirozin aminosav tirozil gyökké is oxidálódhat, majd két tirozil gyök ditirozinná összekapcsolódva fehérje kereszthidakat képez.

Az MPO szubsztrátja, a hidrogén peroxid (H_2O_2) egy stabil és membránpermeábilis molekula, melynek *in vivo* koncentrációja nagymértékben függ a képződési és lebomlási sebességétől. A H_2O_2 semlegesítését magas H_2O_2 koncentrációnál a kataláz enzim, míg alacsony H_2O_2 koncentrációknál a glutation-peroxidáz enzim végzi. Amennyiben nem semlegesítődik, úgy fémionokkal (vas, réz) reakcióba lépve $\cdot\text{OH}$ -t, a mieloperoxidáz (MPO) enzim ko-szubsztrátjaként pedig hipoklórossavat (HOCl) hoz létre.

A H_2O_2 szívizomra kifejtett hatásai két csoportba sorolhatók: 1. *direkt* fehérje oxidáció, melynek során a szulfhidril (SH)-csoport oxidáció és/vagy karboniláció megy végbe (aktin, miozin könnyűlánc-1 (MLC-1)); 2. *indirekt* hatások, amikor a H_2O_2 másodlagos messengerként protein kinázokat aktivál (redox signaling, protein-kináz C delta (PKC δ), troponin I (TnI) foszforiláció). A H_2O_2 koncentrációfüggő módon bal kamrai diszfunkciót okoz patkány szívbén és diszulfid-hídképződést indukál aktin és tropomiozin (Tm) esetében.

Az MPO működése során ROS-t képez, halogenizációs (klorinációs), illetve peroxidáz ciklusán keresztül. Mivel a halogenizációs ciklus két-elektronos oxidációja során hipotiocianát (HOSCN) és kis mennyiségű hipobrómosav (HOBr) mellett *in vivo* leginkább, kísérleti körülményeink között pedig kizárólag a nagy reaktivitású HOCl keletkezik, ezért a továbbiakban az MPO ezen aktivitására, mint *klorinációs aktivitásra* hivatkozunk. A *peroxidáz aktivitás* működése során reaktív nitrogén intermedierek (nitrozónium ion (NO^+), nitrit, NO_2), tirozil-gyök és ditirozin keletkeznek.

Az MPO működése az MPO-inhibitor (MPO-I) 4-aminobenzhidrazid (ABAH) segítségével gátolható. Az ABAH oxidálódik az MPO Compound I és II által, és a képződő gyökök az enzimet a klorinációs és peroxidáz cikluson kívül álló, lassú turnovervel rendelkező Compound III-ba taszítják, így mindkét említett aktivitás gátlódik. Az MPO gátlása ígéretes terápiás célpont lehet a reperfüziós károsodás kivédésében és/vagy csökkentésében.

A miofilamentális fehérjék módosulása a szívizom iszkémia-reperfüziós károsodása, valamint reaktív oxigén gyökök (ROS) és egyes gyulladásos citokinek kóros mértékű felszabadulása során is bekövetkezhet. Egy korábbi munkánkban a miofibrilláris rendszer peroxinitrit-indukált funkcionális károsodásának hátterében álló folyamatokat vizsgáltuk humán szívizomsejteken. Peroxinitrit kezeléseket követően a maximális Ca^{2+} -aktivált erő csökkenésével párhuzamosan a szívizomsejtek harántcsíkolatának nagymértékű elmosódását, valamint az $F_{\text{passzív}}$ növekedését tapasztaltuk. A kontraktilis változásokat az aktív erőgeneráló keresztkötések számának csökkenésével magyaráztuk. Megállapítottuk, hogy a peroxinitrit inkább strukturális, mint regulatórikus változásokat okoz a kontraktilis rendszerben, hiszen sem az erőgenerálás Ca^{2+} érzékenysége és a kontraktilis fehérjerendszeren belül uralkodó

kooperativitásra (pCa_{50} és n_{Hill}), sem az aktin-miozin ciklus sebességére (k_{tr}) nem volt szignifikáns hatással. Az α -aktinin nitrálódás mértéke és a humán szívműködés Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása között fordított arányosságot mutattunk ki. Az MPO enzim működése következtében képződő ROS szívműködésre kifejtett közvetlen hatásairól azonban viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. A miofilamentális fehérjék, valamint az óriás szarkomer fehérje, a titin oxidatív változásainak diasztolés diszfunkcióban betöltött szerepe szintén nagyrészt ismeretlen.

1.6.4. A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben

A biológiai nem fontos szereppel bír a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában, az alkalmazott terápia hatékonyságában, valamint a mortalitásban. A menopauza előtt álló nők esetén kisebb a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának valószínűsége a menopauzán már átesett nőkhez, valamint a férfiakhoz viszonyítva. Menopauza előtt álló nőknél kisebb a BK hipertrófia és remodelling incidenciája, valamint az iszkémia/reperfúziós károsodás mértéke. A HFpEF előfordulása viszont gyakoribb idős nők esetében, melyhez hozzájárul az elhízás és a diabétesz magasabb prevalenciája, valamint a női szívműködés emelkedett intrinzik feszülése is. Ezen megfigyelések a női nemi hormonok (ösztrogén és progeszteron) kardioprotektív hatását valószínűsítik.

Az ösztrogén hatását magreceptorain ($ER\alpha$ és $ER\beta$), valamint membránreceptorán (GPR30) keresztül fejti ki. Az ösztrogénreceptorok kimutathatóak szívműködésben, fibroblasztokban, endotél- és érfal simaizom sejtekben nőkben és férfiakban egyaránt. Az ösztrogénreceptorok upregulációját mutatták ki hipertrófiában és szívelégtelenségben, míg $ER\beta$ knockout egéren megnövekedett bal kamra hipertrófiát és fibrózist, valamint nagyobb iszkémia/reperfúziós károsodást és nekrozist észleltek. Az ösztrogén elősegíti az NO mediált vazodilatációt, iszkémia/reperfúziós károsodás során az L-típusú Ca^{2+} csatornákat S-nitrozilálva csökkenti a sejtek Ca^{2+} túltöltődését, a ROS termelődés és az apoptózis csökkentésén keresztül antiinflammatorikus és antioxidáns hatású.

Stressz állapotokban - mint a kortizol prekursora - a mellékvese progeszteron termelése és szekréciója nemtől és ösztrogéntől függetlenül emelkedik. A progeszteron gyulladásos reakció gátlása révén csökkenti az iszkémia/reperfúziós károsodás mértékét, emellett a repolarizáció felgyorsításával antiaritmikus hatást fejt ki, és képes gátolni az szívműködés apoptózisát.

Az ismert kardiovaszkuláris rizikófaktorok mellett a pszichoszociális stressz is káros hatást gyakorol a kardiovaszkuláris rendszerre. Ennek egyik megnyilvánulása a Takotsubo-

kardiomiopátia (TCM, stressz kardiomiopátia, „broken heart” szindróma). TCM-ban a katekolamin szint ugrásszerű emelkedése után a BK apikális hipokinézise és ballonszerű tágulata következik be, melynek hátterében a β_2 -adrenerg receptorok stimulatorikus G fehérjéről (G_s)-ről inhibitorikus G fehérjére (G_i) történő átkapcsolódását és az ennek hatására bekövetkező szívműködés kontraktilitás csökkenését valószínűsítik. A szimpatikus idegrendszer aktiválódása a β -adrenerg jelátvitelen keresztül központi szerepet játszik a szívműködés kontraktilis funkciójának és Ca^{2+} érzékenységének szabályozásában. A kontraktilis fehérjék (miozinkötő C-fehérje (MyBP-C), troponin-I (TnI), titin) PKA-mediált foszforilációja befolyásolja a szívműködés kontraktilis működését. A menopauzához köthető hormonális változások szívműködés mechanikára kifejtett hatásai azonban nagyrészt feltáratlanok.

1.7. Új gyógyszeres lehetőség a szív pumpafunkciójának javítására: miozin aktivátorok

A szívelégtelenség progressziója során az optimális gyógyszeres és eszközös kezelés ellenére a betegek állapota gyakorta romlik, előrehaladott szívelégtelenség („advanced heart failure”) alakul ki. Ebben a betegcsoportban a definitív terápiát a szívtranszplantáció, illetve - bizonyos betegek esetében - a mechanikus keringéstámogatás jelenti. Ezek a terápiás modalitások az igen szigorú kritériumok miatt sajnos csak kevés beteg számára érhetőek el. A betegek nagyobb hányadánál a konzervatív, gyógyszeres kezelés kerül alkalmazásra, melynek egyik hatékony eszköze lehet a pozitív inotróp/inodilátor kezelés. Ezen szerek hosszútávú használata azonban növeli a mortalitást és nem csökkenti a hospitalizációk számát sem. A jelenlegi kutatások célja ezért olyan szelektív, a szívműködés kontraktilitást fokozó (pozitív inotróp) gyógyszerek kifejlesztése, amelyek már a HFrEF korábbi stádiumában is alkalmazhatók és elsődlegesen a szív pumpafunkciójának javítását célozzák.

A konvencionális, „upstream” mechanizmusú pozitív inotróp szerek (dobutamin, dopamin, milrinon, adrenalin, noradrenalin és szívglikozidok) az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt szignáltranszdukciós és/vagy receptorális útvonalak módosításával befolyásolják. Ezek a szerek a β_1 -receptorok aktiválásán keresztül olyan foszforilációs folyamatokat iniciálnak, melyek végső soron a szívműködés intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedéséhez vezetnek, egyúttal fokozzák a miokardium energiaigényét és oxigénfelhasználását. A hatásukra sokszor kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség pitvari és kamrai aritmiák kialakulásának kedvez.

A „centrális” mechanizmusú gyógyszer, a levosimendan (Levo) növeli a troponin C (TnC) Ca^{2+} iránti affinitását, az ATP-szenzitív K^+ -csatorna aktiválásán keresztül pedig

vazodilatációt vált ki, ezért ezt a szert inodilátornak is nevezik. A Levo nagyobb plazmakoncentrációk esetén foszfodiészteráz-3 (PDE3)-gátló hatást is mutat.

A „downstream” mechanizmusú szerek nem befolyásolják az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, így mentesek a konvencionális pozitív inotróp szerek mellékhatásaitól, energetikailag is kedvezőbbek a szívizomsejteknek. Ezen gyógyszercsoport egy korábbi képviselője az EMD 53998 (EMD), mely egy enantiomer molekula. Egyik párja downstream mechanizmus útján hat, míg a másik PDE3-gátló hatással rendelkezik. Ide tartozik az omecamtiv mecarbil (OM) és a danicamtiv, melyek a miozin-ATPáz aktivitásának fokozásával hatnak, ezért miozin-aktivátoroknak is nevezik őket.

Az OM és a danicamtiv szelektíven kötődnek a kardiális típusú miozin S1 régiójához, és fokozzák ATP-hidrolizáló képességét. Ez gyorsítja az ADP és P_i képződését, valamint a P_i disszociációját a miozinferről, így felgyorsítva a ciklus sebességmeghatározó lépését és a miozin-ADP komplex keletkezését. Ez az átalakulás elősegíti a miozin gyengén kötött konformációjából az erősen kötött konformációs állapotba történő átmenetét, amit a kontraktilis erőgenerálás fokozódása követ. Teoretikusan így növekszik az egy ciklus alatti aktin-miozin interakciók száma, lehetővé téve a nagyobb erő kifejtését az oxigénfelhasználás növekedése nélkül. Preklinikai vizsgálatok során igazolták, hogy az OM jelentősen képes fokozni a patkányból izolált szívizomsejtek kontrakciós erejét, a kontrakciós idő kisfokú elnyújtása révén, mindezt a szisztolés intracelluláris Ca^{2+} tranziens befolyásolása nélkül. *In vivo* vizsgálatok során OM hatására különböző szívelégtelenség-állatmodellekben a bal kamra funkció javult az oxigénfelhasználás fokozódása nélkül. Az első dóziskereső klinikai vizsgálat, illetve az ATOMIC-HF vizsgálat során intravénás OM kezelést hasonlítottak össze placeboval, míg a COSMIC-HF vizsgálatban per os kezelést alkalmaztak, mindkettőben HFrEF betegekkel. A vizsgálatokban az OM javította a szisztolés funkciót, növelte a szisztolés ejekciós időt (SET), jól tolerálható és biztonságos volt, de kismértékű plazma troponin I (TnI) növekedést okozott, ami nem függött össze az alkalmazott dózissal. A GALACTIC-HF vizsgálatban az OM-al kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt az elsődleges összetett végpont, de a kardiovaszkuláris halálozásban nem volt különbség. A danicamtiv, mint új miozin-aktivátor, hasonló hatásokat mutatott, de szélesebb terápiás ablakot és nagyobb kontraktilis funkció-javító potenciált ígért. Fázis I. klinikai vizsgálatok alapján a danicamtiv biztonságos, és szívelégtelen betegekben javította a bal kamra szisztolés funkcióját. A danicamtivra vonatkozó preklinikai és klinikai adatok ugyanakkor továbbra sem egyértelműek, különösen ennek az új inotrópnak a diasztolés funkcióra kifejtett hatásaira vonatkozóan léteznek bizonytalanságok.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a szívelégtelenség különböző klinikai formáiban a szívizomzatban bekövetkező kóros molekuláris és sejtszintű változások tanulmányozását, valamint az új miozin aktivátorok szívizom kontraktilitásra kifejtett hatásainak vizsgálatát tűztük ki célul.

Az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen hasonlóságok/különbségek ismerhetők fel a HFrEF-ben és HFpEF-ben szenvedő betegek szívizomzatában?
2. Hogyan és milyen mértékben járul hozzá a bal kamrai diasztolés diszfunkcióhoz a szöveti fibrózis, a glikációs végtermékek jelenléte és a szívizomsejt passzív feszülés-növekedése diabéteszes és nem diabéteszes HFrEF és HFpEF betegekben?
3. Mi lehet a β -blokkoló kezelés eltérő klinikai hatásainak molekuláris magyarázata HFrEF-ben és HFpEF-ben?
4. Felelőssé tehető-e a titin izoforma összetételében és/vagy foszforilációjában bekövetkező változások a szívelégtelenségben kóros mértékben megnövekedett szívizomsejt passzív feszülésért?
5. Hogyan és milyen mértékben járulnak hozzá a MPO peroxidáz és klorinációs aktivitásának következtében létrejövő oxidatív miofilamentális fehérjemódosulások a bal kamrai szisztolés és diasztolés diszfunkcióhoz? Revertálhatóak vagy kivédhetőek-e a MPO-indukált funkcionális hatások és biokémiai változások?
6. A női nemi hormonok hiánya és az akut stressz hatással van-e a bal kamrai izolált szívizomsejtek erőgenerálására? Milyen poszttranszlációs miofilamentális fehérjemódosulások magyarázhatják a szívizomsejtek kontraktilis funkciójában bekövetkező változásokat?
7. Milyen hatással van az OM izolált, intakt szívizomsejtek szisztolés és diasztolés funkciójára, a kontrakció kinetikájára, valamint az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienstre *in vitro*?
8. Hogyan befolyásolja az új típusú miozin-aktivátor, a danicamtiv a szívciklus időtartamait, a szisztolés és diasztolés funkciót *in vivo*?

3. MÓDSZEREK

3.1. Humán, patkány és kutya szívizomminták

Tanulmányainkban humán és állati (patkány) szívizommintákat használtunk, melyeket megfelelő tartósítás és fagyasztás után -80°C -on tároltuk. Az *in vitro* kísérletekhez intakt membránrendszerű kutyaszív sejteket izoláltunk.

3.2. Kontraktilis erő mérése izolált szívizomsejt mérőrendszer segítségével

A membránfosztott szívizomsejtek erőgenerálását egy Magyarországon egyedülálló, személyre szabott erőmérő rendszer segítségével mértük. A szívizomsejteket homogenizátorral diszpergáltuk, Triton-X-100 oldattal permeabilizáltuk, majd 15°C -on erőméréseket végeztünk, a Ca^{2+} -függő aktív erőt ($F_{\text{aktív}}$) és a passzív erőt ($F_{\text{passzív}}$) aktiváló és relaxáló oldatokban határoztuk meg. A Ca^{2+} -érzékenységet és a fehérjerendszer kooperativitását pCa görbékkel jellemeztük. PKA, PKG, gelsolin, BDM, H_2O_2 , MPO, valamint antioxidánsokkal történő kezeléseket vizsgáltuk. Az akut stressz és ovariectomia hatásainak értékelése során az $F_{\text{aktív}}$ -ot, $F_{\text{passzív}}$ -ot és pCa₅₀-et mértük kontroll, stresszelt (kontroll-S), ovariectomizált (OVX) és stresszelt ovariectomizált (OVX-S) csoportokban, hasonló protokoll alapján.

3.3. Fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív hisztomorfometria

Az endomiokardiális szívizomminták strukturális elemzése során reprezentatív mintákon meghatároztuk a szívizomsejt átmérőt (MyD), von Gieson elastica festett szívizommetszeteken a kollagéntartalmat (kollagén térfogat arány - CVF), a miofibrilláris sűrűséget és a glikációs végtermékek (AGEs) lokalizációját és intenzitását.

3.4. A miofilamentális fehérjék és a titin izoforma összetételének és foszforilációjának vizsgálata

A szívizomminták miozin, dezmin, aktin, troponin T és I, tropomiozin, titin (N2B/N2BA izoforma), valamint MLC-1 és MLC-2 tartalmát és degradációját SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk. A foszforilációs állapotot ProQ[®] Diamond, míg a fehérjemennyiséget SYPRO Ruby vagy Coomassie blue festéssel határoztuk meg.

3.5. MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése

Az MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérését speciális, kereskedelmi forgalomban elérhető kitek segítségével végeztük. Az $\text{MPO} + \text{H}_2\text{O}_2$ aktivitás értékeit tekintettük 100%-nak, ehhez hasonlítottuk az MPO-I, valamint a Met hatását.

3.6. Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározása

A szívizom homogenizátumokat *in vitro* alkalmazott enzim (MPO), enzim gátló (MPO inhibitor), oxidáló (H_2O_2 , dithiodipiridin (DTDP)) és redukáló (DTT, metionin) kezelések előtt és azokat követően molekulatömegük szerint szétválasztottuk.

3.6.1. A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman-reakcióval

Az MPO által kiváltott SH-oxidációt Ellman-reakcióval vizsgáltuk. A SH-tartalmat NAC standard sor alapján, 1 mg liofilizált szívizomra vonatkoztatva, az idő kontroll mintákhoz viszonyítva százalékosan adtuk meg.

3.6.2. Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel

A miofilamentális fehérjék SH-csoportjait biotinnal jelöltük, majd a fehérjekoncentrációt dot-blot módszerrel határoztuk meg. Pozitív kontrollként DTDP-vel oxidált mintákat használtunk.

3.6.3. Fehérje karboniláció vizsgálata

Humán bal kamrai szívizom mintákat H_2O_2 -vel és MPO-val kezeltük, pozitív kontrollként Fenton-reagenst alkalmaztunk. A karbonil-csoportok derivatizálása után a fehérjetartalmat dot-blot módszerrel, Sypro Ruby festéssel határoztuk meg. A karbonilált fehérjéket ECL módszerrel detektáltuk. Az OxyBlot™ módszerrel mért karbonilációt fehérjemennyiségre normalizáltuk, és karbonilációs indexként (KI) fejeztük ki.

3.7. A Ca^{2+} szint változások és szarkomerhossz rövidülések egyidejű mérése

A szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -szintjét Fura-2 AM fluoreszcens festékkel mértük, jól összehúzódó és morfológiailag ép sejtek kiválasztásával. A sejteket 0,1 Hz-es frekvenciával, szobahőmérsékleten stimuláltuk, a fluoreszcens emissziót 340 nm és 380 nm hullámhosszakon detektáltuk az intracelluláris Ca^{2+} szint változásainak vizsgálatára. Különböző gyógyszerekkel (OM, Levo vagy EMD) történt inkubálást követően ismételt téringerléseket kezdtünk és rögzítettük a kontrakciókat és a Fura 2 arány változásait.

3.8. A kontraktilis paraméterek és Ca^{2+} tranziensek jellemzése

A nyugalmi szarkomerhosszat (RSL; μm) a steady-state állapot elérése után, valamint az egyes kezelések után rögzítettük, miközben elemeztük a frakcionális szarkomerhossz rövidülést (FSL; %), az összehúzódás időtartamát, a kontrakció és a relaxáció sebességét. A nyugalmi Ca^{2+} -szintet a Fura-2 arány alapján becsültük, míg a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit, kialakulásuk sebességét, lecsengési kinetikáját és időtartamát is meghatároztuk.

3.9. Patkánymodell, *in vivo* kísérletek

Az *in vivo* kísérleteket 8-12 hetes felnőtt Sprague-Dawley patkányokon (n=14) végeztük. A danicamtivot iv. 2 mg/kg dózisban, egyszeri bolusban adtuk be az előzőleg kanülált farokvénába.

3.9.1. Konvencionális echokardiográfia

A transzthorakális echokardiográfiát (TTE) a Vevo 3100 képalkotó rendszerrel, magas frekvenciájú transzducerrel végeztük, a danicamtiv iv. beadását követően 5-15 percig. Az adatgyűjtést különböző módokban (B-, 2D-, M- és Doppler-módban) és különböző nézetekből végeztük, meghatározva a szívfrekvenciát, a falvastagságot, a bal kamra átmérőit, valamint a diasztolés és szisztolés térfogatokat, frakcionált rövidülést, pulzustérfogatot és prectérfogatot. Továbbá, a diasztolés funkciót Doppler és szöveti Doppler képalkotással értékeltük, mértük az áramlási sebességeket és időtartamokat, valamint kiszámítottuk az E/e' arányt, minden paramétert három szívciklus átlagolásával.

3.9.2. Strain echokardiográfia

A strain paraméterek meghatározását offline végeztük VevoLAB[®] szoftver segítségével. A hosszanti és radiális strain paramétereket a PLAX nézetből, míg a cirkumferenciális strain paramétereket a PSAX nézet képeiből értékeltük. Az iv. danicamtiv beadása után elemeztük a radiális szisztolés csúcs- és átlagsebesség értékeket (cm/s), a globális longitudinális strain (GLS; %), a globális cirkumferenciális strain (GCS; %)

3.9.3. Elektrokardiográfia

Az echokardiográfiás vizsgálatokkal párhuzamosan három elvezetéses EKG monitorizálás során az alábbi paramétereket vizsgáltuk: szívfrekvencia, PQ- QRS és QT-idő, korrigált QT-intervallum, valamint T-hullám amplitudó. Az értékeléshez 5 egymást követő szívciklust átlagoltunk.

3.10. Adatelemzés és statisztika

Az eredmények értékeléséhez és ábrázolásához Excel (Microsoft, 2007) és GraphPad Prism 5.0 programokat használtunk. Statisztikai elemzésére varianciaanalízist (ANOVA, Bonferroni- és Dunnet-posthoc teszt), vagy többszintű kevert-hatás lineáris regressziós analízist, Ca²⁺-erő összefüggések összehasonlításához Student-féle páros és párosítatlan *t*-tesztet alkalmaztunk.

A kemilumineszcens (antitestek), fluoreszcens (Sypro Ruby-fehérjemennyiség, Pro Q Diamond-foszforiláció), valamint Coomassie jelek intenzitásának meghatározására a görbe alatti terület mérését ImageJ és Magic Plot programok segítségével végeztük. A fehérje

foszforiláció, nemi hormonok és szívműködés funkció közötti összefüggéseket lineáris regresszióval határoztuk meg. Az eredmények kiértékelése és grafikonok elkészítése a GraphPad Prism 9.0 szoftverben történt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Az *in vitro* mérések során az egyes csoportokban a kísérletek száma 7 és 11 között változott 6 különböző szívből. A háttér fluoreszcencia-intenzitási szinteket a mérések végén egy szívműködés nélküli régióból nyertük és manuálisan kivontuk a fluoreszcencia-intenzitásokat. Tizennégy patkányt vizsgáltunk a danicamtiv iv. kezelése előtt és után. Minden kísérlet esetében a kapott eredményeket értékeltük a normalitás szempontjából (Kolmogorov-Smirnov normalitási teszt), majd páros *t*-tesztekkel, vagy közöségi egyirányú ANOVA-val, vagy Kruskal-Wallis-teszttel többszörös összehasonlítással elemeztük. A mérési adatokat átlag $\pm$ SEM értékeként adtuk meg.

Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak egy változást, ha *p* értéke kisebb volt, mint 0,05.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Strukturális és funkcionális különbségek HFrEF-ben és HFpEF-ben

Ebbe a vizsgálatba olyan szívelégtelenségben szenvedő betegeket ($n=58$) vontunk be, akik akut szívelégtelenség tüneteivel kerültek kórházi felvételre. Minden betegnél az ischaemiás és a gyulladásos kóreredit kizárására koronarográfia és endomiokardiális biopszia vétel történt. Mindazokat a betegeket, akiknél a koronarográfia szignifikáns koszorúér-szűkületet, valamint a szövettani vizsgálat infiltratív vagy gyulladásos kórereditet igazolt, kizártuk a vizsgálatból ($n=14$). A fennmaradó 44 beteget a BKEF alapján HFrEF betegcsoportba ($n=22$, BKEF= $34\pm 2\%$), valamint az ESC Diasztolés Szívelégtelenség Munkacsoportjának ajánlása szerint megőrzött BKEF-el és kórosan emelkedett bal kamrai végdiasztolés nyomással (LVEDP) jellemezhető HFpEF ($n=22$, BKEF= $62\pm 2\%$) betegcsoportba osztottuk.

A HFpEF csoportban több beteg szenvedett magasvérnyomás betegségben és volt elhízott, mint a HFrEF betegek között. A HFpEF betegekben szignifikánsan magasabb LVEDP-t, szívindexet, bal kamrai falvastagságot, bal kamrai tömeg index/végdiasztolés nyomás hányadost (LVMI/LVEDP) és alacsonyabb végdiasztolés térfogat indexet (EDVI) mértünk, mint a HFrEF betegcsoportban.

A két betegcsoportból származó szívizombiopsziák fénymikroszkópos feldolgozásának eredményei alapján a HFpEF betegekben szignifikánsan, mintegy 25%-kal nagyobb átmérőjű szívizomsejteket találtunk, mint a HFrEF betegekben. A kollagén térfogat arány (CVF), az intersticiális fibrózis mértéke nem különbözött a két betegcsoportban. Ha a szívizomsejtek átmérőjét a CVF függvényében ábrázoltuk szignifikáns összefüggést találtunk a két paraméter között. Ez arra utal, hogy a szívizomsejtek átmérő növekedésével párhuzamosan a fibrózis mértéke is progrediál mindkét betegcsoportban.

Az átlagos CVF-et használtuk a HFrEF és HFpEF betegek alacsony (átlag alatti) vagy magas (átlag feletti) CVF csoportokra való felosztásához. Mind a HFpEF-ben, mind az HFrEF-ben a legnagyobb miofibrilláris sűrűség magas CVF esetén figyelhető meg. Mind alacsony, mind magas CVF esetén a legnagyobb miofibrilláris sűrűséget HFpEF-ben találtuk.

Az elektronmikroszkópos hisztomorfometria segítségével meghatározott miofibrilláris sűrűség nagymértékű csökkenését, a miofibrillumok eltűnését találtuk a HFrEF-ben, míg ez a HFpEF-ben nem volt megfigyelhető. A mitokondriumok négyzetmikrométerenkénti száma és a kapilláris bazális membrán vastagsága hasonló volt az HFrEF és a HFpEF esetén.

A szívizomsejtek kontraktilis funkciójának megítélésére a szívizombiopsziákból mechanikusan izolált, membránjaiktól megfosztott szívizomsejteken izometriás erőmérést végeztünk. A HFpEF-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeinek $F_{\text{passzív}}$ értéke szignifikánsan

magasabb volt, mint a HFrEF betegeké. PKA kezelés hatására az $F_{\text{passzív}}$ szignifikáns mértékben csökkent mindkét betegcsoportban, az $F_{\text{passzív}}$ csökkenése nagyobb volt HFpEF-ben, mint az HFrEF-ben, mivel az $F_{\text{passzív}}$ hasonlóan alacsony szintre csökkent az HFrEF-ben és a HFpEF-ben. A maximális aktivációnál mért F_{total} nem változott a PKA után egyik csoportban sem. HFpEF betegek szívmusclejének Ca^{2+} érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt, mint a HFrEF betegekből származóké. PKA kezelés hatására a pCa_{50} mindkét csoportban jelentősen csökkent, de a Ca^{2+} érzékenység nagyobb mértékű csökkenését tapasztaltuk HFrEF-ben. A HFpEF betegeknél az $F_{\text{passzív}}$ korrelált a betegeken *in vivo* mért szívmuscle stiffness modulussal és LVEDP-vel. Ezek az összefüggések hiányoztak HFrEF-ben.

Funkcionális méréseinket követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a PKA melyik célfehérjéjének módosulása állhat a HFpEF betegek szívmusclejében mért $F_{\text{passzív}}$ kóros mértékű növekedésének hátterében. Ennek érdekében a titin izoformák elkülönítését végeztük el - technikai okok miatt több betegből összevont - endomiokardiális biopsziás anyagon. A HFpEF szívmuscle titin N2BA/N2B aránya alacsonyabb volt, mint az HFrEF szívmuscle. Az elvégzett egydimenziós gélelektroforézis tehát a rövidebb és merevebb N2B titin izoforma arányának növekedését igazolta a HFpEF betegek szívmusclejében.

A fenti eredmények alapján megállapítottuk, hogy a HFpEF és HFrEF betegek klinikai jellemzői között számos különbség figyelhető meg. A HFpEF betegek nagyobb hányada szenvedett magasvérnyomás betegségben, cukorbetegségben és volt elhízott. A két betegcsoport a hemodinamikai paraméterek tekintetében is eltérő volt.

A szívmuscle strukturális és funkcionális jellemzőinek összehasonlításakor HFrEF-ben alacsonyabb miofibrilláris sűrűséget és Ca^{2+} érzékenységet, míg HFpEF-ben szívmuscle sejtek hipertrófiát, a szívmuscle sejtek megnövekedett passzív feszülését és a Ca^{2+} érzékenység fokozódását figyeltük meg.

Bal kamra hipertrófia jelentlétéről már beszámoltak HFpEF-ben, ezt jelen vizsgálatban a normálisnál magasabb LVMI is megerősítette. Utóbbit HFrEF-ben is megfigyeltünk, de a HFpEF-el ellentétben ehhez csak kisebb mértékű szívmuscle átmérő növekedés társult, mely összhangban van a két szívelégtelenség fenotípusra jellemző koncentrikus és excentrikus bal kamrai remodellingel: koncentrikus bal kamrai hipertrófiában (HFpEF) a szívmuscle sejtek transzverzális irányban nőnek, miközben a sejtek hossza állandó marad, míg excentrikus hipertrófiában (HFrEF) a szívmuscle sejtek arányos hosszanti és a transzverzális irányú növekedése figyelhető meg.

A szívmuscle átmérő növekedését HFrEF-ben kollagénlerakódás kísérte. HFpEF-ben a kollagénlerakódás a szívmuscle átmérő további növekedésével járt együtt. Mivel a

kollagénlerakódás és a szívizomsejt hipertrófia kialakulása mind az HFrEF-ben, mind a HFpEF-ben jelen volt, az ACE-gátlók, az ARB-k és az MRA-k alkalmazása, amelyek a szívizomfibrózis és a maladaptív hipertrófia ellen hatnak, mindkét szívelégtelenség fenotípusban indokoltnak tűnik. A CHARM vizsgálatban (Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity) az ARB kandezartán kedvező hatásairól nemcsak HFrEF-ben, hanem HFpEF-ben is beszámoltak.

A CVF-tól függetlenül a HFpEF betegek szívizomsejt átmérője meghaladta a HFrEF betegek átmérőértékeit. Ez a különbség HFpEF-ben valószínűleg a hipertónia jelenlétével függött össze, amely a HFpEF betegek 73%-ában, míg a HFrEF betegek csupán 13%-ában volt megfigyelhető. A HFpEF betegek 60%-a cukorbetegségben szenvedett, 50%-uk pedig elhízott volt. A diabétesz és az inzulinrezisztencia kísérleti modelljeiben a szív hipertrófiájának kialakulásáról már korábban beszámoltak.

A HFpEF betegekben mért $F_{\text{passzív}}$ 34%-kal magasabb volt, mint HFrEF betegekben mérhető passzív erő érték. A magasabb $F_{\text{passzív}}$ háttérében a Ca^{2+} anyagcsere megváltozása, vagy miofilamentális és citoskeletális fehérjék módosulása állhat. Mivel a kísérletek előtt a szívizomsejtek Triton X-100-ban inkubáltuk, a szarkolemmális és szarkoplazmatikus membránok integritása sérült, így Ca^{2+} anyagcsere megváltozása nem járulhatott hozzá a magasabb $F_{\text{passzív}}$ kialakulásához. Korábbi vizsgálatunkban HFpEF betegek endomiokardiális biopsziáiban nem találtunk változást a miofilamentális fehérjék expressziójában vagy foszforilációjában, ezért a magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot a citoskeletális fehérjék megváltozott expressziójának vagy foszforilációjának tulajdonítottuk. Mivel a PKA korrigálta az $F_{\text{passzív}}$ -ot, az érintett citoskeletális fehérjéknek foszforilációs helyekkel kell rendelkezniük. A titin rendelkezik foszforilációs helyekkel, és PKA általi foszforilációja csökkenti az $F_{\text{passzív}}$ -ot izolált szívizomrostokban, különösen a titin merev, N2B izoformájának overexpressziója esetén. A jelen vizsgálatban a HFpEF betegek endomiokardiális biopsziás mintáiban a merev N2B titin izoforma magasabb expresszióját figyeltük meg. Az $F_{\text{passzív}}$ csökkenése a PKA után nagyobb volt a HFpEF-ben, mint HFrEF-ben, mely szintén összhangban áll HFpEF betegek biopsziás mintáiban mért magasabb N2B-expresszióval. A titin izoforma expressziójának hasonló eltolódását a rugalmas N2BA izoformáról a merev N2B izoforma felé korábban már igazolták kísérleti körülmények között létrehozott hipertónia modellben.

A HFpEF betegekben mért $F_{\text{passzív}}$ és az LVEDP, valamint a szívizom stiffness modulus között mind a jelen, mind egy korábbi vizsgálatunkban korrelációt mutattunk ki. Mivel a PKA korrigálta a magas $F_{\text{passzív}}$ -ot, a szívizom PKA-aktivitásának adrenoceptor-stimulációval történő növelése javíthatja a balkamra diasztolés funkcióját HFpEF-ben. Az izoproterenol adása során

javuló diasztolés bal kamra funkciót mutattak ki hipertrófiás kardiomiopátiában szenvedő betegeknél, akik gyakran szenvednek HFpEF-ben is. A PKA mellett érdekes lenne a PKG hatásának vizsgálata is, hiszen a PKG miokardiális aktivitása nitrogén-oxid és foszfodiészteráz 5A-gátlók hatására növelhető, a képződő nitrogén-oxid pedig javítja a diasztolés bal kamra funkciót egészséges, hipertrófiás és elégtelenné váló szívekben is, a szildenafil pedig kedvező hatású szívizom hipertrófiában.

HFpEF betegeken 20%-kal nagyobb volt a miofilamentális sűrűség, mint a HFrEF betegeken, mely szintén hozzájárulhatott a HFpEF-ben mért magasabb $F_{\text{passzív}}$ -hoz. Az $F_{\text{passzív}}$ PKA hatására hasonló szintre csökkent HFpEF-ben és HFrEF-ben, ami ellene szól annak, hogy a magasabb miofilamentális sűrűség lenne a felelős a HFpEF-ben megfigyelt emelkedett $F_{\text{passzív}}$ -ért. Az alacsonyabb miofilamentális sűrűség HFrEF-ben a miofilamentális lebomlásból eredhetett. Bár a miofilamentális sűrűség alacsonyabb volt HFrEF-ben, maximális aktiváláskor a szívizomsejtek hasonló F_{total} -al rendelkeztek, melynek hátterében megváltozott titin izoformák vagy a foszforilációból eredő fokozott aktin-miozin kölcsönhatás állhat.

Összességében kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a bal kamrai szívizomzat felépítése és működése eltér HFrEF-ben és HFpEF-ben. A megfigyelt változások összhangban állnak a szívizomzat csökkent kontraktilitásával HFrEF-ben és magyarázhatják a kamraizomzat kóros relaxációját, illetve túgulékonyságának csökkenését HFpEF-ben. A különbségek alátámasztják a két szívelégtelenség fenotípus klinikai elkülönítését.

4.2. A fibrózis, a keringő glikációs végtermékek (AGEs) és a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ szerepe a diasztolés diszfunkcióban

Ebben a tanulmányunkban nem diabéteszes és diabéteszes szívelégtelen betegek endomiokardiális biopsziáinak felhasználásával azt vizsgáltuk, hogy a fibrózis, a keringő AGEs és a szívizomsejtek passzív feszülése hogyan és milyen mértékben járul hozzá a betegekben *in vivo* megfigyelhető bal kamrai diasztolés diszfunkció kialakulásához.

Hasonló gyógyszeres kezelésben részesülő nem-cukorbeteg és cukorbeteg, ép koszorúér-státusszal rendelkező HFpEF (n=28) és HFrEF (n=36) betegből származó bal kamrai endomiokardiális biopsziákat dolgoztunk fel, akik közül 16, illetve 10 beteg volt diabéteszes. Meghatároztuk a szívizomminták AGEs és kollagén tartalmát, valamint a biopsziákból izolált szívizomsejteken az $F_{\text{passzív}}$ -ot.

A diabéteszes betegekben *in vivo* emelkedett diasztolés feszülést mértünk tekintet nélkül a bal kamrai szisztolés funkcióra. HFrEF-ben szenvedő diabéteszes betegekben nagyobb CVF-t találtunk. A diabéteszes HFrEF betegekben nagyobb mértékű AGEs lerakódást figyeltünk meg, mint a diabéteszes HFpEF betegekben. Az AGEs lerakódásával párhuzamosan a

diabéteszes HFrEF csoportban a mikroerekben az endotheliális gyulladás markerének, az E-szelektinnek a növekvő expresszióját is kimutattuk.

HFpEF betegekben a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ szignifikánsan magasabbnak bizonyult. A PKA-val történt kezelés után az $F_{\text{passzív}}$ csökkent, különösen a DM^{+}_{HFpEF} betegekben, és ezáltal az $F_{\text{passzív}}$ értékei összehasonlíthatóvá váltak az összes betegcsoportban. A DM^{+}_{HFpEF} szívizomsejtekben mért magasabb $F_{\text{passzív}}$ -hoz a szarkomer Z-vonal kiszélesedése társult, amely mind az α -aktininre festett immunfluoreszcens, mind az elektronmikroszkópos képeken szignifikánsan nagyobb volt a DM^{+}_{HFpEF} -ben, mint a DM^{-}_{HFpEF} -ben. A HFpEF betegekben az $F_{\text{passzív}}$ korrelált az stiffness modulussal és a DM időtartamával.

Bár a DM-ben megfigyelhető szívizom diszfunkció leggyakoribb oka továbbra is a koszorúér-betegség, a DM-hez kapcsolódó hiperglikémia, inzulinrezisztencia és hiperlipidémia közvetlenül is hathatnak a szívizomra: pl. a szívizom energianyeréséhez a glükóz felhasználásról a zsírsav-oxidációra áll át. A DM által kiváltott szívizom diszfunkció első klinikai leírásakor a fő jellemzők a bal kamrai tágulat és a szisztolés bal kamrai diszfunkció voltak, ezért ezt az állapotot dilatatív kardiomiopátiának minősítették. Később a diasztolés bal kamrai diszfunkciót a diabétesz okozta szívizom-diszfunkció korai megnyilvánulásaként azonosították. A jelen vizsgálat megerősítette, hogy a diabéteszes betegeknél jelentős koszorúér-betegség hiányában is növekszik a diasztolés bal kamrai merevség.

A krónikus miokardiális mikrovaskuláris gyulladás - sejtes infiltráció hiányában is - gyakran megfigyelhető lezajlott miokarditisz után HFrEF betegekben. Ismert, hogy a gyulladás elősegíti az AGE felhalmozódását, a tartós mikrovaskuláris gyulladás pedig CML lerakódáshoz vezet a kis intramiokardiális erekben. Jelen vizsgálatban nem figyeltünk meg intersticiális CML lerakódást, melynek hátterében - szemben a kezeletlen rágszáló DM modellekkel - a betegek jobb glikémiás kontrollja (antidiabetikus és inzulin kezelés) állhat. Az endotheliális AGE lerakódás klinikai jelentőségét korábban már igazolták hipertóniás betegekben, akiknél a keresztkötés-bontó kezelés javította az endothelfunkciót.

Jelen vizsgálatban magasabb CVF-et figyeltünk meg a DM^{+}_{HFpEF} , mint a DM^{-}_{HFpEF} betegekben. A DM^{+}_{HFpEF} betegekben a fibroblasztok aktiválódása a korábban említett AGE lerakódás, a protein kináz C aktiválódása vagy a magas intracelluláris glükózkoncentráció következménye lehetett.

A DM^{+}_{HFpEF} betegekben magasabb stiffness modulust mértünk, mint a DM^{-}_{HFpEF} betegekben. A magasabb SM inkább a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ -jával és kevésbé az AGEs lerakódással függött össze. Az emelkedett $F_{\text{passzív}}$ proteinkináz A általi korrekciója a miofilamentális vagy citoskeletális fehérjék foszforilációs deficitjére utal. A DM^{+}_{HFpEF}

szívizomsejtekben a magas $F_{\text{passzív}}$ -hoz a Z-vonal kiszélesedése társult. A Z-vonal kiszélesedését nebulin vagy izom-LIM fehérje knockout transzgenikus egerekben már leírták. A jelen tanulmány ugyanakkor az első, amely Z-vonal megvastagodásáról számol be humán szívizomzatban, ennek háttérben a citoskeletális fehérjék megváltozott tulajdonságai állhatnak.

Eredményeink arra utalnak, hogy diabéteszes szívelégtelen betegekben a szívizom megnövekedett diasztolés feszüléséért eltérő mechanizmusok felelősek: HFrEF-ben elsősorban a fibrózis és az AGEs lerakódása, míg HFpEF-ben a hipertrófiás szívizomsejtek kórosan emelkedett passzív feszülése játszhat szerepet. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a DM két különböző útvonal aktiválása révén károsíthatja a szív kontraktilis funkcióját: a “AGEs lerakódás-gyulladás-fibrózis” útvonal a HFrEF-re, a “szívizomsejt hipertrófia-megnövekedett szívizomsejt passzív feszülés” útvonal a HFpEF-re jellemző. Ugyanakkor HFrEF-ben a “AGEs lerakódás-gyulladás-fibrózis” útvonal aktiválódása nemcsak a diasztolés, hanem a szisztolés funkciót is rontja. Mivel a két betegcsoportban az éhgyomri vércukorszint, HbA1c érték, valamint a diabétesz fennállásának ideje is hasonló volt, a szisztolés funkció romlásáért valószínűleg a háttérben álló vírusos miokarditisz vagy toxikus szívizom károsodás tehető felelőssé.

4.3. A β -blokkoló kezelés eltérő molekuláris hatásai HFrEF-ben és HFpEF-ben

Arra a kérdésre, hogy a HFrEF-ben és HFpEF-ben a bal kamrai szívizomzat felépítésében és működésében korábban ismertett különbségek magyarázhatják-e a β -blokkolókkal folytatott klinikai tanulmányok eltérő kimenetelét (egyértelműen pozitív hatás HFrEF-ben, nem meggyőző eredmények HFpEF-ben) β -blokkoló kezelésben igen és abban nem részesülő HFpEF és HFrEF betegekből nyert bal kamrai szívizommintákat hasonlítottunk össze.

A szignifikáns koszorúér-betegségben nem szenvedő, β -blokkoló kezelésben nem és abban részesülő betegeket négy csoportra osztottuk: $\beta_{\text{-HFpEF}}$ (n=16), $\beta_{\text{+HFpEF}}$ (n=16), $\beta_{\text{-HFrEF}}$ (n=17) és $\beta_{\text{+HFrEF}}$ (n=22). A betegek szívizommintáiban hisztomorfometriai módszerrel meghatároztuk a miokardiális CVF-t, a szívizomsejt átmérőt, ProQ Diamond festési eljárással a miofilamentális fehérjék foszforilációját, valamint Western immunoblot segítségével a β -adrenerg jelátviteli útvonal és a szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisában kulcsszerepet játszó fehérjék expresszióját. A biopsziákból izolált, membránfosztott szívizomsejteken erőméréseket hajtottunk végre.

A β -blokkoló kezelés szívizomzatra kifejtett hatásai egyrészt hasonlóak voltak a két betegcsoportban, másrészt jellegzetesnek mutatkoztak HFpEF-re vagy HFrEF-re. A miokardiális CVF szignifikánsan alacsonyabb volt a HFpEF-ben, mint a HFrEF-ben, HFpEF-

ben a β -blokkoló kezelés alacsonyabb miokardiális CVF-el társult. A szívizomsejtek átmérője szignifikánsan nagyobb volt HFpEF-ben, mint HFrEF-ben, a β -blokkoló terápia HFpEF-ben járt együtt a szívizomsejt átmérő csökkenésével. A miofibrilláris sűrűség szintén magasabb volt HFpEF-ben, mint HFrEF-ben, de nem volt összefüggésben a β -blokkoló terápiával.

A β -blokkolóval kezelt HFrEF és HFpEF betegekben magasabb $F_{\text{aktív}}$ és pCa_{50} értékeket mértünk. A kezelés HFpEF-ben növelte, HFrEF-ben nem változtatta meg az $F_{\text{passzív}}$ -ot. A PKA kezelést követően a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ mind a négy betegcsoportban csökkent, de a β -blokkolót kapó HFpEF betegekben szignifikánsan magasabb maradt. A pCa_{50} PKA kezelést követően az $F_{\text{passzív}}$ -hoz hasonló tendenciát követett: mind a négy csoportban csökkent, és a β -blokkolót kapó HFpEF-betegeknél magasabb maradt. Az *in vivo* β -blokkoló kezelés tehát az izolált szívizomsejtek kiindulási és PKA-indukált kontraktilis funkcióinak összetett *in vitro* váltoásaival járt együtt, amely különbözött a HFpEF és a HFrEF betegcsoportok között.

A β -blokkoló kezelés mind a HFpEF, mind a HFrEF betegeknél a troponin I (TnI) és a miozinkötő fehérje C (MyBP-C) alacsonyabb foszforilációjával járt együtt, de nem volt hatással más miofilamentális fehérjék foszforilációs státuszára.

A β -adrenerg receptor jelátvitelében részt vevő fehérjék közül a $\beta 1AR$, a GRK2 és a GRK5 expressziója magasabb volt HFrEF-ben, mint a HFpEF-ben, de a β -blokkoló kezelés nem befolyásolta. A β -blokkoló kezelés HFpEF-ben csökkentette az aktiváló G fehérje (G_s) expresszióját, ugyanakkor a gátló G fehérje (G_i) expressziója kizárólag HFrEF-ben csökkent. A szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} -ATPáz (SERCA2a) és a foszfolamban (PLB) expressziós szintjében a β -blokkoló kezeléssel kapcsolatos különbségeket nem figyeltünk meg HFrEF és HFpEF között.

Jelen tanulmányban a CVF kizárólag a β -blokkolóval kezelt HFpEF betegek esetében volt alacsonyabb, a HFrEF betegekben nem. Ez a megfigyelés alátámasztja a korábbi tanulmányok eredményeit, amelyek az előrehaladott miokardiális fibrózist HFrEF-ben a β -blokkoló terápia rossz kimenetelének fontos előrejelzőjeként azonosították. A β^{+HFpEF} betegekben megfigyelt alacsonyabb CVF értékkel párhuzamosan a szívizomsejt hipertrófia csökkenése is megfigyelhető volt. Spontán hipertóniás patkányokban a bisoprolol nem, az ACE-gátló perindopril azonban visszafordította a szívizomsejt hipertrófiát. Ez a vizsgálat arra utal, hogy β^{+HFpEF} betegekben a szívizomsejt hipertrófia visszafejlődésében esetleg a csökkent RAAS aktivitás játszhat szerepet.

A HFpEF betegcsoportban magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot figyeltünk meg a β^{+HFpEF} , mint a β^{-HFpEF} betegekben. A PKA *in vitro* adagolása után β^{+HFpEF} betegeknél az $F_{\text{passzív}}$ még mindig magasabb maradt, ami arra utal, hogy a β -blokkoló kezelés hatása HFpEF-ben nemcsak a

hipofoszforylációval, hanem a miofilamentális fehérjék strukturális vagy egyéb poszttranszlációs módosításával is összefügg. A β^{+}_{HFpEF} szívműködésben megfigyelt, PKA-t követő tartós $p\text{Ca}_{50}$ emelkedés szintén azt támasztja alá, hogy a β -blokkoló terápia a miofilamentális fehérjék további módosításait idézi elő.

Vizsgálatunk során jelentős különbségeket találtunk a $\beta 1\text{AR}$ és a GRK2 proteinek expressziójában a betegcsoportok között: a β -blokkolók kezeléstől függetlenül mindkét fehérje miokardiális expressziója magasabb volt HFrEF-ben, mint HFpEF-ben. A β -adrenerg rendszer különböző komponensei közül a G_s fehérje kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt a β -blokkolót kapó HFpEF betegeknél. A $\beta 2\text{AR}$ - G_s jelátvitel downregulációja előnyös lehet, mivel kedvez a $\beta 2\text{AR}$ - G_i jelátvitelnek, amelyről ismert, hogy antiapoptotikus hatást fejt ki. A normál bal kamrai kontraktilis funkció miatt a megnövekedett $\beta 2\text{AR}$ - G_i jelátvitelből eredő esetleges negatív inotróp hatások kevésbé tűnnek jelentősnek a HFpEF betegek esetében.

A HFpEF-ben és HFrEF-ben alkalmazott β -blokkoló kezelés molekuláris hatásaiban észlelt különbségek összefüggésben állhatnak a β -blokkoló gyógyszerekkel - a két betegcsoportban - végzett klinikai tanulmányok eltérő eredményeivel.

4.4. A titin izoforma összetétel és foszforiláció szerepe a szívelégtelenségben megfigyelhető kóros szívműködés passzív feszülésben

Korábbi tanulmányainkban kimutattuk, hogy HFpEF betegeknél a megnövekedett bal kamrai fal feszülés létrejöttéért az intersticiális fibrózis és a szívműködés megnövekedett passzív ereje tehető felelőssé. Jelen tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy milyen mértékben tehető felelőssé a titin izoforma összetételben és/vagy foszforilációban bekövetkező változások a BKEF alapján nem differenciált és differenciált szívelégtelenségben megfigyelhető kóros mértékben megnövekedett $F_{\text{passzív}}$ -ért.

Szívelégtelenségben (HF), aorta stenosisban (AS) szenvedő betegek és megőrzött szívfunkcióval rendelkező egyének (CON) bal kamrai biopsziáiból izolált szívműködés megnövekedett passzív erejét vizsgáltuk. A mintákban meghatároztuk a titin és titin izoformák expresszióját és foszforilációját. A biopsziákat szívkathéterezés során (44 HF, 3 CON), műtéti úton (25 AS, 4 CON) és explantált szívekből (4 HF, 8 CON) nyertük. A vizsgálatba bevont személyek ép koszorúerekkel rendelkeztek.

A HF betegcsoportban mért szívműködés megnövekedett passzív ereje $F_{\text{passzív}}$ szignifikánsan nagyobb volt, mint a CON vagy az AS csoportokban.

A titin izoformák összetétele (N2BA/N2B) eltérő volt a HF és a CON csoport között, de nem különbözött a HF és az AS betegcsoportokban.

A titin összfoszforilációja hasonló volt a HF és az AS csoportban, de a merev N2B titin izoforma relatív foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb volt a HF, mint az AS csoportban. A foszforilált és az összes fehérje aránya hasonló volt a miozin-kötő C fehérje, a dezmin, a troponin T és a miozin könnyű lánc-2 esetében. Egyedül a troponin I foszforilált és teljes fehérje aránya volt alacsonyabb HF-ben, mint AS-ban.

Mivel korábbi tanulmányainkban az $F_{\text{passzív}}$ különösen a HFpEF betegek bal kamrai szívizomzatából izolált szívizomsejtekben volt emelkedett, ezért összehasonlítottuk a titin izoformák expresszióját és foszforilációját HFpEF és HFrEF betegek alcsoportjaiban. Az N2BA/N2B arány és az *in vivo* mért LVEDWS is a HFrEF betegekben volt a legmagasabb. Az $F_{\text{passzív}}$ és a PKA által indukált $F_{\text{passzív}}$ csökkenés a HFpEF betegekben volt a legnagyobb. Az N2B titin izoforma hipofoszforilációja szintén HFpEF-ben volt a legkifejezettebb, mely magyarázhatja mind a magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot, mind az $F_{\text{passzív}}$ nagyobb PKA-indukált csökkenését is.

Jelen vizsgálatban az $F_{\text{passzív}}$ kétszer olyan magas volt a szívelégtelenségben, mint AS-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeiben. PKA vagy PKG adását követően a magas $F_{\text{passzív}}$ jelentősen csökkent, de változatlan maradt BDM vagy gelsolin *in vitro* adagolása után. A PKA- és PKG-indukált $F_{\text{passzív}}$ csökkenés a miofilamentális fehérjék foszforilációs deficitjére utal. Eddig csak a troponin I-et és a titint azonosították a PKA és a PKG közös miofilamentális célfehérjéjeként. Jelen vizsgálatban a troponin I foszforilációs deficitjét figyeltük meg szívelégtelen szívizomban. A miofilamentális Ca^{2+} érzékenység egyidejű növekedése elősegítheti a diasztolés aktin-miozin interakciót. A kereszthidak kialakulást gátló BDM expozícióját követően az $F_{\text{passzív}}$ ugyanakkor változatlan maradt. A PKA azon képessége alapján, hogy a vékony filamentumok gelsolinnal történő eltávolítását követően képes volt csökkenteni az $F_{\text{passzív}}$ -ot, a titin foszforilációjának szerepét feltételezte szívelégtelen szívizomsejtek magas $F_{\text{passzív}}$ -jának kialakításában.

A szívelégtelenségben és az AS-ban szenvedő betegek alcsoportjaiban a miokardiális titin izoforma expressziója (N2BA/N2B arány) és az LVEDWS között szoros korrelációt figyeltünk meg. A rugalmas N2BA titin izoforma magasabb expressziója arra utal, hogy a titin izoforma váltás kompenzációs mechanizmus, amelynek során az N2BA izoforma magasabb expressziója kompenzálja a megemelkedett LVEDWS értéket. A titin izoforma váltás kompenzatorikus szerepét korábban már dilatatív kardiomiopátiában szenvedő betegeknél is kimutatták, akiknél az N2BA/N2B arány korrelált az LVEDVI/LVEDP aránnyal, a bal kamra végdiasztolés disztenziásának mérőszámával, valamint a terhelés alatti maximális oxigénfogyasztással.

Mivel a titin izoformák expressziója hasonló volt a szívelégtelen és AS betegek szívizomzatában, az $F_{\text{passzív}}$ közötti különbség más mechanizmusokkal magyarázható. A titin összfoszforilációja hasonló, a relatív titin izoforma-foszforiláció azonban eltérő volt a szívelégtelen és AS szívizomzatban: a szívelégtelenségben kevesebb N2B izoforma foszforilálódott, mint az AS miokardiumban. Korábban kimutatták, hogy a rugalmas N2BA titin izoformához képest a merev N2B titin izoforma hipofoszforilációja jelentősebb mértékben növeli az $F_{\text{passzív}}$ -ot. A merev, N2B titin izoforma hipofoszforilációja tehát magyarázhatja a szívelégtelen szívizomsejtekben megfigyelhető magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot. A titin izoformák foszforilációjának eltolódása az N2BA és N2B titin izoformák foszforilációs helyeinek térbeli elkülönülésével, valamint a proteinkinázok és foszfodiészterázok kompartmentális aktivitásában bekövetkező változásokkal magyarázható. Az N2B egyedi szekvencia tartalmazza a foszforilációs helyet, amely közvetíti az $F_{\text{passzív}}$ csökkenését. Az N2BA izoformában a hely közelebb van a Z-koronghoz. A PKA-t az A-kináz lehorgonyzó fehérjék (AKAP) a transzverzális tubulusokba irányítják, amelyek szintén a Z-korong szomszédságában vannak. Szívelégtelenségben a PKA AKAP általi célzása károsodik, ami a környező miofilamentális fehérjék foszforilációjának csökkenéséhez vezet. A titin izoforma foszforiláció eltolódása szívelégtelenségben nemcsak a cAMP, hanem a cGMP megváltozott helyi elérhetőségéből is eredhet, mivel a szívizom foszfodiészteráz 5 aktivitása is erősen kompartmentalizált.

A fenti kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy a merev N2B titin izoforma hipofoszforilációja fontos szerepet játszik a szívelégtelen betegek szívizomsejtjeinek kórosan emelkedett passzív feszülésében.

4.5. A miofilamentális fehérjék oxidatív módosulásainak szerepe a bal kamrai diasztolés diszfunkció kialakulásában

4.5.1. A mieloperoxidáz enzim (MPO) funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívizomsejteken

A celluláris kontraktilis diszfunkció kialakulásában a kontraktilis fehérjerendszer foszforilációs változásai mellett azok oxidatív módosulásai is szerepet játszhatnak. A miofilamentális fehérjék, valamint az óriás szarkomer fehérje, a titin oxidatív változásainak diasztolés diszfunkcióban betöltött szerepe nagyrészt ismeretlen. Vizsgálatunkban ezért az MPO, az MPO gátlószerének (MPO-inhibitor) és különböző antioxidánsoknak a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára kifejtett hatásait tanulmányoztuk.

Egy *in vitro* humán kísérleti modellrendszer létrehozását követően meghatároztuk az mieloperoxidáz enzim (MPO) és szubsztrátjának, a hidrogén peroxidnak (H_2O_2) a hatását

membránfosztott szívizomsejtek kontraktilis paramétereire. Antioxidáns szerrel (metionin, Met) és MPO-inhibitorral történő szimultán és utókezelések alkalmazásával megvizsgáltuk a létrejövő funkcionális változások revertálhatóságát. Az MPO és a H_2O_2 funkcionális hatásainak pontosabb feltárására biokémiai és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Meghatároztuk az MPO peroxidáz és klorinációs aktivitását Met és MPO-inhibitor jelenlétében. Humán bal kamrai szívizomszövetből nyert homogenizátumokat *in vitro* H_2O_2 , H_2O_2 és MPO, 2,2'-dithiodipiridin (DTDP) és Met kezeléseknél tettük ki. A miofilamentális fehérjék és az óriás szarkomerfehérje, a titin izoforma összetételét (N2BA és N2B), az azokban a fenti kezelések hatására bekövetkező oxidációs változásokat Ellman-reakcióval és SH csoport oxidációs módszerrel (biotinálás), a karbonilációs állapotban bekövetkező változásokat Oxyblot technikával vizsgáltuk.

Az MPO-val végzett kísérletek előtt egy olyan H_2O_2 koncentráció meghatározására törekedtünk, amely már rendelkezik önálló funkcionális hatással, de ez a hatás MPO jelenlétében fokozódik. Az inkubációk során alkalmazott koncentrációk közül a $30\ \mu\text{M}$ -os H_2O_2 oldat csökkentette szignifikánsan a szívizomsejtek aktív erejét, így ezt a H_2O_2 dózist használtuk további kísérleteinkben.

MPO ($8\ \text{U/l}$) és H_2O_2 ($30\ \mu\text{M}$) együttes alkalmazásakor (15 perc) a membránfosztott humán, bal kamrai szívizomsejtek maximális $F_{\text{aktív}}$ -jának ($\text{pCa } 4,75$) szignifikáns csökkenését és az $F_{\text{passzív}}$ ($\text{pCa } 9,0$) jelentős növekedését tapasztaltuk.

Amennyiben a kezelések előtt és után a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú aktiváló oldatokban mért erőértékeket a kezelések előtti maximális ($F_{\text{aktív}}$, $\text{pCa } 4,75$) erőértékekhez viszonyítottuk (relatív Ca^{2+} -erő összefüggés), úgy a MPO+ H_2O_2 kezelést követően bekövetkező erőcsökkenés szignifikánsan nagyobb volt a H_2O_2 kezeléshez viszonyítva. Az MPO+ H_2O_2 hatására létrejövő $F_{\text{passzív}}$ növekedés ugyancsak nagyobb volt a H_2O_2 kezelést követően tapasztalt $F_{\text{passzív}}$ növekedésnél.

MPO+ H_2O_2 kezelést követően a normalizált erő-pCa összefüggés szignifikáns jobbra tolódását, azaz a Ca^{2+} érzékenység (pCa_{50}) csökkenését tapasztaltuk. Ezzel szemben a H_2O_2 -kezelés a pCa_{50} értéket nem befolyásolta. A Ca^{2+} érzékenységi görbe meredekségét jellemző Hill-koefficiens (n_{Hill}) egyik kezelés hatására sem változott. Sem a H_2O_2 , sem a MPO+ H_2O_2 kezelés nem eredményezett fénymikroszkóppal észlelhető strukturális változást a szívizomsejtek harántcsíolatában.

4.5.2. Az MPO-inhibitor (MPO-I) és a metionin (Met) kivédi, a dithiotreitol (DTT) részlegesen revertálja az MPO-okozta kontraktilis diszfunkciót

Az MPO+H₂O₂ kezelés szívmiocytesekre kifejtett káros funkcionális hatásainak kivédhetőségét az MPO-I 4-aminobenzhidrazid (50 µM), valamint az antioxidáns Met (10 mM) és a redukálószer DTT (10 mM) segítségével vizsgáltuk. Mind az MPO-I, mind a Met kivédte az MPO hatására létrejövő F_{aktív} csökkenést és F_{passzív} növekedést. Az MPO-I és Met jelenlétében mért F_{aktív} és F_{passzív} összevethető volt a H₂O₂ kezelés után meghatározott erőértékekkel. Az MPO-I és a Met jelenlétében a Ca²⁺ érzékenységi görbe jobbra tolódása (a pCa₅₀ csökkenése) nem volt megfigyelhető.

A redukálószer DTT, MPO kezelést követően visszafordította az MPO által indukált F_{passzív} növekedést, ugyanakkor az F_{aktív} és a pCa₅₀ MPO hatására bekövetkező csökkenését a DTT nem volt képes revertálni.

4.5.3. A Met gátolja az MPO klorinációs aktivitását, azonban a peroxidáz aktivitásra nincs hatással

Az MPO funkcionális hatásainak hátterében álló biokémiai mechanizmusok feltérképezéséhez meghatároztuk az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását MPO-I és Met jelenlétében. Az MPO-I az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolta. Ezzel szemben a Met csak az MPO klorinációs aktivitását csökkentette, az enzim peroxidáz aktivitására nem volt hatással. Eredményeink arra utalnak, hogy az MPO szívmiocyte funkciót károsító hatásai az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósulnak meg.

4.5.4. Az MPO+H₂O₂ kezelés hatása a miofilamentális fehérjék SH-tartalmára

Biokémiai kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MPO működése során keletkező oxidánsok hogyan károsítják a szívmiocyte fehérjerendszerét. A miofilamentális fehérjék SH tartalmát Ellman-reakcióval vizsgáltuk. A H₂O₂ és kombinált MPO+H₂O₂ kezelés során is kismértékű, de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fehérjék össz SH-csoport tartalmában. Ezt követően SH biotinálási módszer segítségével kísérletet tettünk az SH oxidáción átesett fehérjék azonosítására. H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan csökkent az aktin SH tartalma. Ezzel szemben MyBP-C és az óriás szarkomer fehérje, a titin rugalmasabb (N2BA) és rigidebb (N2B) izoformájának SH tartalma egyik kezelést követően sem változott jelentősen.

4.5.5. Az MPO hatása a szívizomfehérjék karbonilációjára

A miofilamentális fehérjék karbonilációjának vizsgálatakor H_2O_2 kezelés hatására kismértékű, de szignifikáns növekedést tapasztaltunk az aktin karbonil-csoport tartalmában, ez azonban nem változott MPO hozzáadását követően. Az aktinhoz hasonlóan kismértékű, de szignifikáns növekedést mértünk a MyBP-C fehérje karbonilációjában mind H_2O_2 , mind pedig MPO+ H_2O_2 kezelés után. Az óriásfehérje titin N2BA és N2B izoformájának karbonilációja nem változott H_2O_2 és MPO+ H_2O_2 kezelést követően sem.

Az MPO hatását izolált, humán szívizomsejteken vizsgálva megállapítottuk, hogy 1. a MPO az *in vitro* kísérleti körülmények között rontotta a kalciumfüggő izometriás erőgenerálást, növelte az $F_{\text{passzív}}$ -ot és csökkentette a pCa_{50} -et; 2. az MPO által kiváltott funkcionális változások kivédhetők MPO-inhibitorral, valamint az antioxidáns metionin alkalmazásával; 3. az aktin fehérje SH-oxidációja, valamint az aktin és a MyBP-C karbonilációja H_2O_2 és H_2O_2 +MPO kezelés hatására növekedett; 4. az MPO által kiváltott funkcionális hatásokat feltehetően az MPO klorinációs aktivitása közvetíti.

Méréseink során az MPO+ H_2O_2 kezelés $F_{\text{aktív}}$ -ra kifejtett jelentős károsító hatásának hátterében a reakcióban képződő erős oxidáns, a HOCl állhat. Egy korábbi vizsgálatban a HOCl kezelés (10 és 50 μM , 1 perc) - az MPO+ H_2O_2 kezelés hatásához hasonlóan - szignifikánsan csökkentette a maximális erőt. Az $F_{\text{passzív}}$ H_2O_2 hatására kismértékben, míg H_2O_2 +MPO hatására jelentős mértékben fokozódott. Ezen eredményeink összefüggésben állnak a korábbi megfigyeléssel, miszerint membránfosztott patkány trabekulák esetében a H_2O_2 alacsony koncentrációban (10 μM) nem növelte az $F_{\text{passzív}}$ -ot, míg a HOCl-val történő kezelés (10 μM és 50 μM) annak szignifikáns emelkedését okozta. Korábbi eredmények alapján oxidatív stressz hatására diszulfid hidak képződnek a titin molekulák N2B unique sequence régiójában (N2B-U_s), melynek hatására nő a fehérje rigiditása. Jelen tanulmányunkban nem sikerült biokémiai módszerekkel kimutatni a titin fehérje H_2O_2 +MPO kezelést követő SH oxidációját és karbonilációját, funkcionális méréseinkben azonban a DTT szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek H_2O_2 +MPO kiváltotta $F_{\text{passzív}}$ növekedését. Az MPO hatás redukálószerrel történő revertálhatósága annak oxidatív természetére utal.

H_2O_2 +MPO kezelés hatására a pCa_{50} szignifikáns csökkenését tapasztaltunk, amely ellentmondásban áll egy korábbi tanulmány eredményeivel, ahol HOCl kezelést követően a pCa_{50} érték emelkedését mutatták ki. Az eltérő eredmények hátterében az eltérő kísérleti elrendezés (permeabilizált szívizomsejt vs. trabekula) és az eltérő alkalmazott dózisok állhat. A H_2O_2 kezelés nem befolyásolta a pCa_{50} -et, így azt feltételezzük, hogy inkább strukturális,

mintsem regulatórikus változásokat okoz a miofilamentumok szintjén, akár az erőgeneráló kereszthidak számának csökkentése által.

Az MPO gátlás potenciális negatív immunológiai következményei ellenére az MPO-inhibitorok jelenleg is számos CV megbetegedés (miokardiális infarktus, HFpEF) kezelésére klinikai kipróbálás alatt állnak. Az általunk alkalmazott MPO-I, a 4-aminobenzhidrazid és az antioxidáns, HOCl scavenger aminosav, a Met is képes volt megakadályozni azt, hogy az MPO kifejtse káros funkcionális hatásait, amiből arra következtetünk, hogy az észlelt változásokért az MPO klorinációs aktivitása tehető felelőssé. A HOCl károsító mechanizmusának nagy reakciósebessége miatt azonban a HOCl keletkezésének gátlása hatékonyabb lehet, mint a már létrejött HOCl közömbösítése. Az MPO inhibitorral és Met-nal két ponton is sikeresen kivédjük az MPO oxidatív hatásait. A redukálószer DTT azonban a csak részlegesen volt képes visszafordítani az MPO-indukált mechanikai változásokat: az $F_{\text{passzív}}$ -ot a kiindulási értékre csökkentette, azonban az $F_{\text{aktív}}$ -ot és a pCa_{50} értéket érdemben nem befolyásolta. Az MPO által közvetített oxidatív hatások sokfélesége miatt valószínűsíthető, hogy esetünkben több, különböző reakció eltérő poszttranszlációs módosításokat eredményezett a szívizomfehérjéken. Jelen tanulmányunkban a H_2O_2 +MPO hatására megfigyelt szívizom SH oxidáció összhangban áll a szívizom szeleteken nagy dózisú HOCl által kiváltott SH oxidációval. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy oxidatív hatások jelentősen módosíthatják az aktin és miozin filamentumok szerkezetét. Kísérleteinkben aktin esetében szignifikáns SH tartalom csökkenést tapasztaltunk, azonban ennek mértéke nem növekedett MPO hatására, így ez önmagában nem magyarázza a szívizomsejtek aktív erejének csökkenését.

Egy, a munkacsoportunk által korábban használt miokardiális infarktus egér modellben a Ca^{2+} érzékenység csökkenéséhez az aktin és MHC karbonilációja társult, míg magas koncentrációban alkalmazott H_2O_2 az aktin karbonilációját idézte elő. Jelen tanulmányunkban 0,1 mM-nál magasabb H_2O_2 dózist annak MPO gátló hatása miatt nem alkalmaztunk. A használt 30 μ M-os kezelést követően az aktin és MyBP-C esetében kismértékű növekedést tapasztaltunk a karbonilációs indexben. Mivel ezen paraméterben további növekedést nem észleltünk az MPO kezelés hatására, így az MPO-indukált funkcionális hatásokat nem tudtuk egy-egy konkrét szívizomfehérje SH oxidációjával, vagy karbonilációjával magyarázni. Azok hátterében az MPO hatására létrejövő egyéb fehérjemódosulások (pl. klorináció, nitrálás, Met oxidáció, szulfonsav-képződés, fehérjedegradáció) állhatnak.

Jelen tanulmányunkban az MPO hatására a szívizomsejtek kontraktilis funkciója romlott. Újabb tanulmányok eredményei alapján az enyhe oxidatív stressz ugyanakkor kardioprotektív hatású is lehet, sőt akár javíthatja is a kontraktilis apparátus teljesítményét.

Összességében elmondható, hogy az oxidatív ágensek szívizomra kifejtett hatása nagyban függ azok erősségétől és természetétől, valamint a miofilamentumok redox környezetétől. Eredményeink arra utalnak, hogy az MPO szívizomsejt funkciót károsító hatása az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósul meg, mely MPO-inhibitorral és Met-nal kivédhető. Mindezek alapján az MPO gátlása egy ígéretes célpont lehet a gyulladásához társuló miokardiális kontraktilis diszfunkció kivédésében.

4.6. Az ovariectomia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

4.6.1. Az ovariectomia és a stressz hatása a női nemi hormonok szintjére

Vizsgálatunk során az OVX állatok ösztrogén szintje nem érte el az alsó detekciós értéket (4,9 pg/ml), amely sikeres ovariectomiára utalt. A szérum progeszteron szint szignifikánsan magasabb (több mint háromszoros) volt a Kontroll-S, valamint az OVX-S patkányokban. Az akut stressz hatására a Kontroll-S, illetve az OVX-S csoportban a progeszteron szintben bekövetkező emelkedés hasonló mértékű volt.

4.6.2. Az ovariectomia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját

Az $F_{\text{aktív}}$ szignifikánsan nagyobb volt az OVX, valamint OVX-S állatok esetében a Kontroll, illetve a Kontroll-S állatokhoz viszonyítva. Ezzel szemben az akut stressz nem befolyásolta az $F_{\text{aktív}}$ -ot sem a Kontroll, sem az OVX állatcsoportban. A stressz hatására a pCa_{50} -ben bekövetkező csökkenés nem volt szignifikáns. Sem az ovariectomia, sem pedig a stressz nem befolyásolta az $F_{\text{passzív}}$ -ot. Méréseink alapján az OVX, illetve az OVX-S állatok felhasznált szívizomsejtjeinek keresztmetszete jelentősen kisebb volt.

4.6.3. Az ovariectomia és stressz hatása a miofilamentális fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára

Ezen kísérletek során nem találtunk lényeges különbséget a miofilamentális fehérje-összetételben a Kontroll és OVX csoportok között. A TnI foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva, ez azonban nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken mért pCa_{50} -el. Az OVX-S állatcsoportban mérhető TnI foszforiláció összevethető volt a Kontroll és Kontroll-S csoportokban meghatározott értékekkel. A MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabbnak adódott OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban az OVX-S állatokban további, szignifikáns emelkedés nem volt megfigyelhető. A funkcionális méréseknél tapasztalt változatlan $F_{\text{passzív}}$ értékeknek megfelelően nem találtunk különbséget a titin foszforilációban a négy állatcsoport között.

4.6.4. A szívizomsejt kontraktilis funkció összefüggése a miokardiális fehérjék foszforilációjával, valamint a női nemi hormonok szintjével

A szívizomsejtek funkcionális paramétereit a fehérje foszforiláció értékeivel összevetve szignifikáns korrelációt találtunk az $F_{\text{aktív}}$, valamint a MyBPC foszforiláció között ($r=0,99$, $p<0,05$). A titin foszforiláció ugyanakkor nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken meghatározott $F_{\text{passzív}}$ -al. A szérumban mért progeszteron szint és a szívizomsejteken meghatározott pCa_{50} értékek között szignifikáns, inverz korreláció volt megfigyelhető.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy 1. a stressznek kitett állatcsoportokban (kontroll-S, OVX-S) a szérumban mért progeszteron szint több mint háromszor magasabb, mint a kontroll és OVX állatokban, 2. az OVX állatokból származó szívizomsejtek $F_{\text{aktív}}$ -ja szignifikánsan magasabb a kontroll állatokéhoz képest, 3. $F_{\text{passzív}}$ és pCa_{50} nem különbözik az egyes állatcsoportok között, azonban akut stresszt követően pCa_{50} jelzett csökkenése figyelhető meg, 4. a szérumban mért progeszteron szint inverz korrelációt mutat a pCa_{50} értékekkel, 5. a miofilamentális fehérjék összetétele nem különbözik a vizsgált állatcsoportokban, ugyanakkor a MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabb az OVX állatokban.

Ismert, hogy stressz hatására a szérumban mért progeszteron szint nemtől függetlenül jelentősen megemelkedik, melynek hátterében a hormon mellékvesekéregből történő szekréciója áll. A progeszteronszint jelentős emelkedése az általunk vizsgált állatmodellben is megfigyelhető volt a stressznek kitett Kontroll, és OVX-en átesett állatcsoportban.

A progeszteron receptorok (PR) bal kamrai szívizommintákban történő kimutatására irányuló kísérletek mind egér, mind pedig humán szövetekben negatív eredménnyel zárultak. Ezzel szemben humán pitvari szívizomzatban ösztrogén hatására a PR mRNS szintjének növekedését igazolták, melyet fehérjeszinten is sikerült kimutatni posztmenopauzás nőkben, ugyanakkor a PR-expresszió fokozódása a férfiakból származó szövetekben nem volt igazolható. Irodalmi adatok a progeszteron CV hatásait egyre inkább nem genomi útvonalak aktiválódásával hozzák összefüggésbe. Az, hogy ezek a gyors szignáltranszdukciós utak is szerepet kapnak a progeszteron válaszban, felveti az akut stressz által kiváltott progeszteronszint emelkedés esetleges hatásait a szívizomsejtek kontraktilis működésére és/vagy annak szabályozására.

A stressz hatására felszabaduló katekolamin többlet a β -adrenerg jelátviteli úton keresztül a PKA aktiválódásához vezet. A TnI PKA-mediált foszforilációja a miofilamentális rendszer kalcium érzékenységének csökkenése révén befolyásolja a kontraktilis funkciót. Jelen tanulmányunkban nem találtunk jelentős különbséget a pCa_{50} értékek között a négy állatcsoportban. A stressz hatására bekövetkező, kismértékű pCa_{50} csökkenés a stressznek kitett

Kontroll-S, illetve az OVX-S állatcsoportok esetében nem járt együtt a TnI fehérje foszforilációs állapotának változásával. Az ellentmondó eredményeket az általunk használt nem kináz- és foszforilációs hely specifikus festési eljárás is magyarázhatja. Kísérleteink során ugyanis az egyes fehérjék összfoszforilációs szintjét határoztuk meg, mely nem ad információt a különböző protein-kinázok (PKA, PKC- β II, δ , ϵ) által mediált specifikus foszforilációs helyekről. Utóbbiak foszforilációja ugyanis akár ellentétes módon is befolyásolhatja a miofilamentális rendszer Ca^{2+} érzékenységet. Meg kell jegyezni azt is, hogy a kontraktilis fehérjék PKA-függő alap foszforilációs szint rágsálók esetében magasabb, mint a nagyobb emlősök esetében, ami megnehezíti a kisebb különbségek kimutatását.

Kísérleteink során szignifikáns összefüggést találtunk a szérum progeszteron szint és a szívizomsejtek pCa_{50} értékei között. Ez arra utal, hogy a Kontroll-S, illetve az OVX-S állatokban megfigyelt kismértékű, nem szignifikáns pCa_{50} csökkenés kiváltója az emocionális stresszprotokoll volt. A megfigyelésünk alapján azonban nem dönthető el egyértelműen, hogy a pCa_{50} -re a stressz indukált progeszteron, vagy a stressz hatására kialakuló β -adrenerg túlsúly volt hatással. Feridooni és munkatársai a progeszteron akut hatásait vizsgálva egér szíven ugyancsak a Ca^{2+} érzékenység csökkenését figyelték meg a nőstények esetében progeszteron adását követően, mely változás progeszteron receptor antagonistával kivédhetőnek bizonyult. A progeszteron ugyanakkor hím állatokban nem befolyásolta a Ca^{2+} érzékenységet.

Ovariektómiát követően a β -adrenerg receptorok up-regulációja és a β -adrenerg jelátviteli út stimulációja következik be, mely a szíven pozitív inotróp hatást közvetít, emeli a szívfrekvenciát és a kontraktilitást. Kísérletes körülmények között az ovariektómia növeli mind az alap és az izoprenalin-indukálta kontrakciót, valamint a β 1-adrenerg receptor expresszióját. A β 1-adrenerg receptor stimulációja G_s proteineket aktiválva a cAMP koncentráció növekedéséhez és PKA aktiválódáshoz vezet. A PKA képes foszforilálni a miofilamentális fehérjéket, többek között a MyBP-C-t, mely gyorsítja az aktin-miozin kereszthidak kialakulásának kinetikáját és növeli a kalcium aktiválta maximális erőt. Kísérleteinkben is az $F_{\text{aktív}}$ szignifikáns növekedést tapasztaltunk OVX állatokban, melynek hátterében az ovariektómia hatására bekövetkező β 1-adrenerg stimuláció következtében kialakuló MyBP-C foszforiláció állhat. A női szívizomsejtekben fiziológiásan is kisebb és lassabb kontrakciókat, valamint alacsonyabb Ca^{2+} tranzienseket mutattak ki, melyek hozzájárulhatnak a nők esetében megfigyelhető alacsonyabb CV rizikóhoz.

Munkánk során nem találtunk különbséget az egyes állatcsoportok között sem az $F_{\text{passzív}}$ értékekben, sem pedig annak fő regulátorának, a titin fehérjének a foszforilációs állapotában. Patkány trabekula preparátumokon, illetve szívizommintákon végzett kísérletekben az

ovariectomia ugyancsak nem volt hatással a szívizom merevségre, a kollagén tartalomra, valamint a titin izoforma arányra. Nőkben azonban a bal kamra szívizomzat nagyobb merevsége hozzájárulhat a diasztolés diszfunkció gyakoribb előfordulásához.

A tanulmányunkban alkalmazott stressz forma (hideg és immobilizáció) a mindennapi életben viszonylag ritkán fordul elő. Az akut, főként emocionális vagy fizikai stressz hatására létrejövő, a klinikai gyakorlatban is gyakran megfigyelhető, döntő többségében posztmenopauzális nőkben kialakuló Takotsubo-kardiomiopátia (TCM) a bal kamra és szívcsúcs átmeneti, az esetek többségében teljesen reverzibilis falmozgászavara. A betegek szérumában háromszor magasabb katecholamin koncentráció mutatható ki, mint MI-ban szenvedő betegeknél. TCM patkánymodellben kimutatták, hogy az OVX állatok között nagyobb mértékben csökkent a bal kamra funkció azokban az egyedekben, akik nem részesültek ösztrogénpótlásban. A TCM patofiziológiája máig nem ismert teljes mértékben, azonban a közelmúlt kutatásai kimutatták, hogy a korai szövődmények (akut szívelégtelenség, malignus kamrai ritmuszavarok, hirtelen halál) kialakulása mellett a szívfunkció tartós károsodását is eredményezheti egyes betegeknél. A TCM lehetséges kiváltó okainak alaposabb megismerése az elmúlt években jelentősen megváltoztatta ennek a korábban benignusnak vélt kórállapotnak a klinikai megítélését. Ezáltal egyre nagyobb igény mutatkozik a TCM háttérben álló akut és késői folyamatok részletes feltérképezésére, az adekvát, specifikus terápia kidolgozására.

4.7. In vitro kísérletek - az omecamtiv mecarbil (OM), az EMD-53998 (EMD) és a levosimendan (Levo) hatásainak vizsgálata intakt emlős szívizomsejtek kontraktilis paramétereire

4.7.1. Az OM és EMD csökkentette, míg a Levo nem befolyásolja az intakt szívizomsejtek nyugalmi szarkomerhosszát

A OM kezelés hatására a szívizomsejtek nyugalmi szarkomerhossza (SL) koncentráció-függő módon, jelentős mértékben csökkent. Hasonlóan az 1 μM EMD a nyugalmi SL szignifikáns csökkenését idézte elő, míg a Levo nem befolyásolta azt. Az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} koncentráció az OM, EMD és Levo kezelések során változatlan maradt.

4.7.2. Az OM, EMD és Levo eltérő módon befolyásolja a bal kamrai szívizomsejtek kinetikai paramétereit a kontrakció és relaxáció során

Téringerlést követően a szisztolés SL szignifikánsan csökkent 0,03 μM , 0,01 μM , 0,3 μM és 1 μM OM koncentrációk alkalmazásakor. Az OM-hez hasonlóan az EMD és Levo is jelentősen csökkentette a szisztolés SL-t. Az OM 0,03 μM -os koncentrációban növelte a frakcionális szarkomerhossz rövidülést (FSL), de magasabb gyógyszerkoncentrációnál nem volt rá

jelentős hatással. 1 μM -os koncentrációban az EMD és a Levo is szignifikánsan növelte ezt a paramétert. A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit egyik alkalmazott gyógyszer sem befolyásolta. Az OM koncentráció növekedésével a kontrakciós idő progresszív megnyúlása volt megfigyelhető, míg az EMD és a Levo nem befolyásolta ezt a paramétert. Az OM koncentráció növekedésével (0,03 μM , 0,1 μM , 0,3 μM és 1 μM) a kontraktilis válaszok, a kontrakciók és a relaxációk sebességének jelentős fokú lassulása volt megfigyelhető. Az OM-lal és az EMD-vel ellentétben a Levo növelte, mind az összehúzódások, mind a relaxációk kinetikáját. A Ca^{2+} tranziensek időtartamát, az IC Ca^{2+} -tranziensek felfutásainak és lecsengésének kinetikáját egyik gyógyszeres kezelés sem befolyásolta.

4.7.3. Az OM egyedi módon változtatja meg a Ca^{2+} -szarkomerhossz összefüggést

A kontraktilis válaszok és az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek közötti kapcsolat további jellemzése érdekében a SL-t a Ca^{2+} -koncentráció függvényében ábrázoltuk. Ezek a Ca^{2+} -SL összefüggések nem különböztek alacsony koncentrációjú (0,03 μM) OM kezelés előtt és után. 0,1 μM , 0,3 μM vagy 1 μM OM alkalmazását követően azonban a hurokdiagrammok jelentősen és fokozatosan lefelé tolódtak, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás mind a szisztolés, mind a diasztolés intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnál jelen van. 1 μM EMD jelenlétében a Ca^{2+} -SL összefüggés hasonló volt, mint a 0,1 μM OM alkalmazása során. A Ca^{2+} -SL kapcsolat a Levo jelenlétében a rövidebb szisztolés SL-ak felé tolódott, ami a szer szisztolés során kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.

4.7.4. A diasztolés és szisztolés szarkomer dinamika kölcsönhatásainak vizsgálata

A három szer különböző hatásmechanizmusainak szemléltetése érdekében a szisztolés válaszok paramétereit az OM, EMD vagy Levo kezelések során a megfelelő diasztolés SL függvényében fejeztük ki. Ez a megközelítés igazolta az OM és az EMD hatásai közötti hasonlóságokat, különösen, amikor a diasztolés és a szisztolés SL, vagy az összehúzódási időtartamok közötti összefüggéseket elemeztük. A diasztolés SL-FSL összefüggések ugyanakkor az OM és az EMD hatásmechanizmusai közötti különbségekre is felhívták a figyelmet. Az EMD jelentősebb FSL növekedést volt képes kiváltani, mint az OM, és látszólag kisebb diasztolés SL csökkenés árán. A Levo alkalmazása mellett észlelt változatlan diasztolés SL a szer OM-tól és EMD-től eltérő Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.

In vitro vizsgálatainkban enzimatikusan izolált, intakt membránrendszerrel rendelkező kutyából származó szívműködési sejteken számos hasonlóságot és jelentős különbségeket azonosítottunk az OM, az EMD és a Levo kontraktilis funkcióra kifejtett hatásai között. Eredményeink alapján az OM pozitív inotróp hatásának hátterében elsősorban az

összehúzódások idejének megnyúlása, nem pedig a kinetikai paraméterek gyorsulása, vagy a frakcionált SL-rövidülés növekedése áll.

Megállapítottuk, hogy az OM, az EMD és a Levo az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek jelentős változásának hiányában is markáns változásokat idéz elő a szívműködés kontrakciójában és relaxációjában, ami mind a három vegyület esetében arra enged következtetni, hogy valamilyen fokban növelik a szívműködésnek a Ca^{2+} érzékenységet. Ugyanakkor a Ca^{2+} érzékenység fokozódásához vezető mechanizmusok az OM, az EMD és a Levo esetében bizonyos fokban különbözőek, és ennek megfelelően eltérő típusú kontraktilis válaszokat eredményeztek. Mivel a Levo és az EMD is gátolja a PDE3-at, a változatlan intracelluláris Ca^{2+} -szint ezen szerek jelenlétében potenciálisan azzal magyarázható, hogy ezek a szerek az általunk alkalmazott koncentrációkban a többi (PDE3-on kívüli) PDE izoformát kutya szívműködésben nem gátolják.

Az OM alacsony (diasztolés) intracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetén a szívműködés SL-csökkenését idézte elő téringelés hiányában is. A SL-csökkenés mértéke hasonló volt téringelést követően a stimulált szívműködésben mérhető diasztolés SL-hoz, ami arra utal, hogy az aktin-miozin kölcsönhatás OM-függő aktiválásához nem volt szükség Ca^{2+} -ra. Ezek az eredmények összhangban vannak a nyúlból származó szívműködés bazális miozin ATPáz aktivitásának növekedésével OM-kezelést követően, valamint a patkányokból nyert permeabilizált szívműködésnek diasztolés Ca^{2+} szintek mellett létrejövő izometrikus erejének a fokozódásával. Az OM-hez hasonlóan az EMD is csökkentette a nyugalmi SL-t, ami a két, miozinhoz kötődő, azt szelektíven befolyásoló szer hasonló hatásaira utal, míg ez az effektus a vékony filamentumra szelektíven ható Levo esetében eltér. Vizsgálatunkból az is tisztán látható, hogy a diasztolés és szisztolés SL-ok, valamint a kontrakciós időtartamok csökkenése szoros összefüggést mutat a növekvő OM-koncentrációkkal. A diasztolés SL csökkenése felelős azért, hogy magasabb OM-koncentrációk esetében a frakcionált SL-rövidülés nem mutatott jelentős növekedést annak ellenére, hogy a szisztolés szarkomerhosszak jelentősen csökkentek. Eredményeink alapján a frakcionált SL-rövidülés növekedését az OM által kiváltott nyugalmi SL-csökkenés korlátozhatja magasabb OM-koncentrációknál.

Az általunk alkalmazott OM-koncentráció tartományában (0,01-1 μM), mely megfelelt a klinikai tanulmányokban alkalmazott OM-plazmaszinteknek, a nyugalmi SL csökkenését tapasztaltuk. Az OM multicentrikus, placebo kontrolllos, III. fázis klinikai vizsgálatában (GALACTIC-HF) a gyógyszer plazma szintje szerinti dózistitrlási stratégiát alkalmaztak. A cél a legalább 200 ng/ml-es (0,5 μM) plazmakoncentráció elérése és az 1000 ng/ml (2,5 μM) feletti koncentráció elkerülése volt. Fontos megjegyezni, hogy korábbi humán tanulmányok

során a >1200 ng/ml-es (3 μ M) OM-koncentráció (háromszor magasabb, mint az *in vitro* kísérleteinkben általunk alkalmazott maximális koncentráció) esetén a szisztolés időtartam jelentős megnyúlását tapasztalták, mely diasztolé során a koronáriakeringés romlásához, potenciálisan miokardiális iszkémia kialakulásához vezethetett. Az OM állatkísérletekben és humán tanulmányokban egyaránt a SET növekedését okozta. Az első emberen végzett, dóziseszkalációs vizsgálatban az OM dóziszfüggő módon növelte a SET-t, a SV-t, FS-t és a BKEF-t is. A SET megnyújtása a gyógyszer egyik legjelentősebb hatása: a szer alacsony citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció mellett is fenntarthatja a kontrakciót. Annak ellenére, hogy az *in vitro* észlelt erő kifejtés kinetikája lassult, az OM *in vivo* nem befolyásolta az időegység alatt létrejövő nyomásváltozás maximumát ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$), ami arra utal, hogy az OM farmakokinetikai tulajdonságai *in vitro* és *in vivo* némileg eltérőek lehetnek.

Nagy OM-koncentráció mellett a szívizomsejtek összehúzódásainak időtartama majdnem hatszorosára nőtt, ami a kontraktilis rendszer elhúzódó aktiválódására utalt. Permeabilizált patkány szívizomsejteken egy korábbi tanulmányunkban megfigyeltük, hogy mind a félmaximális kontrakció eléréséhez szükséges időtartam ($t_{1/2}$), mind pedig az aktin-miozin kereszthidak kinetikáját jellemző sebességi állandó (k_{tr}) jelentősen növekedett. Mindez, összhangban jelen megfigyeléseinkkel, szintén a miozin filamentumok csökkent kinetikájára utalt. Összességében az OM által kiváltott Ca^{2+} érzékenység-fokozódás hozzájárulhat az erősebb, lassabb és elhúzódó összehúzódásokhoz.

Fontos megemlíteni, hogy az OM által kiváltott kontrakciós időtartam-növekedés nem volt azonos az EMD alkalmazása során, mely vélhetően a szerek miozin molekulán lévő eltérő kötőhelyeivel magyarázható. Az OM kapcsolódási pontja a miozin S1 doménjén valószínűleg az aktin-kötő felület és a nukleotid-kötő zseb közelében lévő hasadéokban található. Ez a hely vélhetően ideális támadáspont a szívizomzat miozin motorjának, mind az enzimatis, mind a mechanikai tulajdonságainak allosztérikus modulációjához. Habár EMD kötőhelye nem azonos az OM miozin S1 doménen lévő kötőhelyével, ennek ellenére az EMD adagolása szintén képes növelni a miozin ATPáz aktivitását.

Jelen vizsgálatban az OM hatására az intakt szívizomsejtek relaxációja jelentősen csökkent, különösen nagyobb (0,3 és 1 μ M) koncentrációknál, az EMD és a Levo ugyanakkor azt nem, vagy csak kismértékben korlátozta. Ez összhangban áll korábbi vizsgálatunk eredményével, mely során az OM jelentősen megnyújtotta a permeabilizált patkány szívizomsejtek relaxációját és megnövelte $F_{\text{passzív}}$ -ot. Szívelégtelenségben a szívizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának zavara elsősorban a SR megváltozott működésére vezethető vissza: a SERCA csökkent aktivitásának következtében csökken a citoplazmatikus Ca^{2+} -visszavétel.

Eredményeink alapján a relaxáció már kis OM-koncentrációknál (0,1-0,3 μM) is károsodott, ez a hatás nagy OM-koncentrációnál (1 μM) még kifejezettebbé vált. Szívelégtelenségben az OM-által kiváltott diasztolés diszfunkciót az emelkedett nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint potenciálisan súlyosbíthatja. Mindezzel összhangban, a diasztolés funkció romlását - amelyet az izovolumetrikus relaxáció időállandójának (τ) és a bal kamrai nyomáscsökkenés sebességének (dP/dt_{max}) csökkenése tükröz - korábban kimutatták térfogat-túlterheléssel járó szívelégtelenség patkány modelljében intravénás OM-kezelést követően. Ugyanakkor egészséges önkéntesekben az OM nem rontotta a diasztolés funkciót az utóbbi vizsgálatban alkalmazott koncentrációhoz hasonló plazmakoncentrációban. Az OM esetleges diasztolés diszfunkciót okozó hatását COSMIC-HF tanulmányban is vizsgálták. A post-hoc elemzés során az IVRT növekedése igazolódott az E/A arány, vagy az E-hullám változása nélkül. A GALACTIC-HF-ben a diasztolés funkciót részletesen nem vizsgálták, pedig ez adataink tükrében fontosnak tűnik a szer biztonságos *per os* alkalmazása érdekében HFrEF-ben szenvedő betegekben is.

Annak ellenére, hogy az OM, az EMD és a Levo sem változtatja meg az intracelluláris Ca^{2+} tranzienszt, az egyes szerek különböző módon befolyásolták a Ca^{2+} -SL összefüggést. Az OM magas koncentrációban jelentősen csökkentette a SL-t, ezáltal diasztolés rövidüléshez és ez elhúzódó relaxációhoz vezetett. Az EMD szintén a nyugalmi SL csökkenését eredményezte, de a relaxációs kinetikát nem befolyásolta. Az OM-al és az EMD-vel ellentétben Levo kezelés során ezen káros hatások egyike sem volt megfigyelhető. Az OM mellett tapasztalt jelentős nyugalmi SL-csökkenés párhuzamba állítható a klinikai vizsgálatokban megfigyelt BK-i diasztolés átmérő csökkenéssel. Ez a tényező hatással lehet FS-re magas OM-koncentrációknál és befolyásolhatja a BKEF meghatározását is. Az OM szívműködés nyugalmi SL-ra és relaxációs kinetikájára kifejtett káros hatásai a OM-plazmaszint rendszeres meghatározásának fontosságára és szükségességére hívják fel a figyelmet a szer klinikai alkalmazása során.

4.8. In vivo kísérletek – Danicamtiv

4.8.1. A danicamtiv csökkenti a végszisztolés átmérőt, de nem befolyásolja a végdiasztolés átmérőt

A danicamtiv miokardiális funkcióra kifejtett hatásait echokardiográfiával követtük nyomon altatott patkányokban. 2 mg/kg danicamtiv iv. beadása után a bal kamrai ESD jelentős csökkenését tapasztaltuk, azonban a bal kamrai EDD-t nem változott.

4.8.2. A danicamtiv javítja a bal kamrai kontraktilitást

A releváns bal kamrai kontraktilis paraméterek, beleértve a BKEF-et, a FS-t és a SV-t szignifikánsan javultak a danicamtiv kezelést követően. Emellett a CO is jelentősen nőtt, ami alátámasztja a gyógyszerjelölt pozitív inotróp hatását.

4.8.3. A szisztolé és diasztolé időtartama megváltozik danicamtiv hatására

A danicamtiv szív ciklus különböző időtartamaira kifejtett hatását is megvizsgáltuk, mely során mind a szisztolé időtartama, mind a SET szignifikáns megnyúlását tapasztaltuk. Az echokardiográfiával mért paraméterekből kalkulált diasztolés időtartam szignifikánsan csökkent, amit a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának jelentős csökkenése kísért.

4.8.4. A kontrakció kinetikája jelentősen lassul, azonban a bal kamrai strain paraméterek javulnak a danicamtiv kezelést követően

A danicamtiv hatását a szívizomösszehúzódás dinamikájára strain echokardiográfia segítségével részletesebben is megvizsgáltuk. A BK-i radiális szisztolés csúcssebesség és az összehúzódási sebesség (M-módban mért meredekség) szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. A danicamtiv kezelés hatására azonban, mind a globális longitudinális strain, mind a globális cirkumferenciális strain paraméterek szignifikánsan csökkentek, ami az BK szisztolés funkció javulására utal. A danicamtiv kezelések során kialakult aorta- vagy pulmonális artériás átlag- és csúcssebességekben, illetve átlag- és csúcsgradiensekben nem volt szignifikáns változás.

4.8.5. A danicamtiv diasztolés diszfunkciót okoz

A danicamtiv hatására a korai (E) transzmitrális beáramlási sebesség szignifikánsan csökkent és a késői (A) transzmitrális beáramlási sebesség pedig jelentősen növekedett. Az E/A arány ennek megfelelően jelentősen csökkent, amely a bal kamrai töltőnyomás emelkedését jelezheti.

A szöveti doppler (TDI) sebességek (azaz a mitrális billentyű szeptumának korai (a') és késői (e') szöveti sebességei) a mitrális E és A hullám sebességéhez hasonlóan változtak. A TDI e'/a' arány változásai tovább erősítik a danicamtiv beadásakor megváltozott mitrális beáramlási mintázatot. Mindazonáltal az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) ezzel egy időben változatlan maradt. Ezen túlmenően a pulmonális véna pitvari reverz áramlási sebességének és az áramlás időtartamának jelentős növekedése volt megfigyelhető, ami a bal kamra diasztolés funkciójának romlását és a bal pitvar kontrakció erősségének fokozódását jelezheti.

In vivo vizsgálataink fókuszában egy eddig kevésbé ismert, új típusú miozin aktivátor, a danicamtiv állt. Eredményeink hozzájárulnak a szer szisztolés és diasztolés funkcióra kifejtett

hatásainak pontosabb megismeréséhez, további vizsgálatok tervezéséhez, mely a hatóanyag klinikai alkalmazása szempontjából is releváns lehet.

A célzott, betegségmódosító terápiák a jelenlegi szívelégtelenség irányelvekben a kardiomiopátiák kezelésére szolgáló új stratégiákként jelennek meg. A mavacamten nevű miozin-inhibitor a szívizomsejtek hiperkontraktilis állapotának befolyásolásával a hipertrófiás kardiomiopátia remodelációját is mérsékelheti. A dilatatív kardiomiopátiára (DCM) azonban a mai napig nincs specifikus terápia. Ez a tény és az OM-lal szerzett tapasztalatok ösztönözték a második miozin-aktivátor, a danicamtiv kifejlesztését és a klinikai kipróbálását.

A direkt miozin-aktivátorok kötőhelye a β -miozin nehézlánc S1-doménjén található a kutya és rágcsáló szívizomzatban egyaránt. Fontos megjegyezni, hogy a szívizomsejtekben a danicamtiv (az OM-hoz hasonlóan) nincs hatással az intracelluláris Ca^{2+} tranziensekre, ami arra utal, hogy kizárólag a fenti hatásmechanizmus felelős a kardiotonikus hatásáért. Ebből következik, hogy a danicamtiv által kiváltott kontraktilis válaszok kutyákban és patkányokban közel hasonlóak lesznek az OM-hoz. Mivel a modern echokardiográfiás technikák kiváló minőségű képalkotást tesznek lehetővé kisemlősökben, méréseinket patkánymodellen hajtottuk végre.

A HFrEF-ben lejátszódó patofiziológiai folyamatok a kontraktilitás jelentős csökkenéséhez vezetnek, ami a pulzustérfogat csökkenésével jár. A pozitív inotróp szereket több évtizede alkalmazzák a pumpafunkció javítása érdekében, mind akut, mind krónikus HFrEF-ben. A hagyományos pozitív inotróp szerek hosszú távon növelik az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, az oxigénfogyasztást és sajnos a mortalitást is. Ezzel szemben a direkt miozin-aktivátorok allosztérikus hatást gyakorolnak a miozin ATPáz-ra, így változatlan intracelluláris Ca^{2+} tranziens esetén több aktin-miozin interakció alakulhat ki, ez a mechanizmus pedig feltehetően elkerüli a fenti mellékhatásokat.

In vivo tanulmányunkban átfogó echokardiográfiás elemzéssel kimutattuk, hogy a danicamtiv jelentős hatást gyakorol, mind a szisztolés, mind a diasztolés funkcióra patkányszívekben. A fenti adatok és a szív S1 miozinján OM és danicamtiv alkalmazásával végzett preklinikai vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy a miozin ATPáz sebességét még diasztolés Ca^{2+} szint mellett is növelik a direkt miozin-aktivátorok.

A bal kamrai kontraktilitást jellemző paraméterek közül danicamtiv hatására jelentősen javult az EF és az FS, továbbá a non-invazívan meghatározott SV, így következményesen a CO is. Ezen kedvező hatások összevethetőek az OM-lal. Ellentétben az OM-lal, amely humán alkalmazás során az EDD-t és az ESD-t is csökkentette, a danicamtiv csak az ESD-t csökkentette, az EDD-t nem befolyásolta jelentős mértékben patkányszívekben. Ezek az

eredmények összhangban vannak a szívelégtelen kutyákon végzett preklinikai adatokkal, és részben egy fázis 2a klinikai vizsgálat eredményeivel is, ahol az EDD kevésbé tűnt érzékenynek a danicamtivra, mint az ESD. Egy nemrégiben humán mesterséges szívizomszöveten a danicamtiv és az OM hatásait összehasonlító vizsgálatban a danicamtiv hatására a szisztolés funkciót jellemző paraméterekben kifejezetten javulás volt megfigyelhető a relaxációhoz képest. A megnövekedett bal kamrai töltőnyomást köztudottan a pitvari kontraktilis funkció növekedése kompenzálja. A danicamtiv esetében ezt a jelenséget jól tükrözte a transzmitrális A-hullám jelentős növekedése, az E-hullám, az E/A arány, valamint a szöveti dopplerrel mért e'/a' arány is jelentős mértékű csökkenése.

A GALACTIC HF vizsgálatban az OM-kezelés hatására a szívfrekvencia kisméretékben csökkent, melyet a javuló kontraktilis funkció következtében létrejövő pozitív hatásokkal hoztak összefüggésbe. *In vivo* kísérleteinkben, hasonlóan az ATOMIC HF, a COSMIC-HF és a danicamtivval végzett fázis IIa vizsgálatokhoz, a szívfrekvencia nem változott. Ahogyan az OM-lal végzett nagy klinikai vizsgálatokban is igazolták, a SET növekedése a miozin-aktivátorok egyik specifikus hatása. Kísérleteink során a változatlan szívfrekvencia mellett megjelenő SET megnyúlása eredményezte a szisztolés időtartam növekedését. Ennek következtében a diasztolés időtartam rövidül, így a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának változása potenciálisan hatással lehet a koronária perfúzióra. Az OM humán fázis II. és III. vizsgálatokban megfigyelt hatásaival ellentétben patkányszívben az izovolumetriás összehúzóási időt (IVCT) és az IVRT-t a danicamtiv nem befolyásolta. A danicamtiv fázis IIa vizsgálatában csak extrém magas dózisok (>3500 ng/ml) esetében figyelték meg az IVRT megnyúlását. A SET növekedése együtt járt a miokardiális teljesítményindex (Tei-index) javulásával.

Fontos megjegyezni, hogy a strain echokardiográfiát különösen kisállatokban ritkábban alkalmazzák, bár nagyon érzékeny módszer a bal kamra funkció változásainak kimutatására. A szívizom sebesség és a strain TDI-vel is mérhető, bár a speckle tracking 2D-strain-t jobb technikának tartják, mivel a TDI-vel ellentétben a kapott eredmények szögfüggetlenek. Általánosságban elmondható, hogy a 2D-strain segítségével nyert adatok jó korrelációt mutatnak a mágneses rezonanciás képalkotással (MRI), a szívizom deformációjának és térfogatának elemzésének arany standard módszerével. Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a danicamtiv jelentősen csökkenti a szívizom összehúzóási sebességét, amit egy 2D-strain paraméter, a radiális szisztolés csúcssebesség jelentős csökkenése is megerősített. A PLAX-ban nyert M-mód képen az összehúzás felszállására illesztett egyenes meredeksége is csökkent, amely szintén megerősíti, hogy a szívizomösszehúzás kinetikája lassult. Emellett úgy tűnik,

hogy a 2D-strain echokardiográfia érzékenyebb módszer a BK funkció pontos meghatározására, mint az EF klasszikus módszerekkel történő mérése. Kimutatták, hogy a GLS vagy a GCS korábban jelzi szisztolés diszfunkciót még akkor is, ha az EF normál tartományban van. Jelen vizsgálatunkban a danicamtiv BK szisztolés funkcióra gyakorolt hatását nemcsak a standard módszerekkel (EF, FS, SV, CO), hanem 2D-strain echokardiográfiával is értékeltük. A danicamtivval kezelt patkányszívekben szignifikánsan alacsonyabb (negatívabb) GLS és GCS értékeket mértünk, ami tovább erősíti a gyógyszer BK kontraktilitásra gyakorolt pozitív hatását.

Kísérleti eredményeink szívelégtelenségre történő extrapolálhatóságát korlátozhatja az a tény, hogy vizsgálatainkat egészséges állatokon végeztük. Ugyanakkor adataink összhangban vannak a szívelégtelenség kutya-modelljében és a danicamtivval végzett 2a fázisú vizsgálatban megfigyelt eredményekkel.

Összességében elmondható, hogy az OM és a danicamtiv szívre gyakorolt hatásai hasonlóak: mindkét vegyület javítja a bal kamra szisztolés funkcióját, ugyanakkor alkalmazásukkor diasztolés diszfunkció kialakulásával is számolnunk kell. A danicamtiv OM-lal szembeni előnye, hogy nem befolyásolja az IVRT-t és a IVCT-t, valamint nem változtatja meg az EDD-t sem.

A danicamtiv az OM-hez hasonlóan a Ca^{2+} homeosztázis befolyásolása nélkül javítja a BK-i szisztolés funkciót. Vizsgálatunk során pitvari aritmia, malignus kamrai ritmuszavar, vagy vezetési zavar megjelenését nem tapasztaltuk, amely szintén támogatja azt a tényt, hogy a danicamtiv független a konvencionális pozitív inotróp szerekre jellemző mellékhatásoktól. Fontos megjegyezni, hogy kutatócsoportunk egy korábbi *in vivo* vizsgálata során, ahol szintén egészséges patkányokon alkalmaztunk OM-kezelést, egy úgynevezett alternáló elektromechanikus jelenség alakult ki, amelyet a danicamtiv esetében nem tapasztaltunk. Bár a danicamtiv is befolyásolja az BK-i diasztolés funkciót, ez a hatás kevésbé szembetűnő, mint az OM alkalmazásakor. Ez a különbség bizonyos mértékig összefügghet a danicamtiv által kiváltott pitvari kontraktilitás fokozódásával. Ezen kívül a diasztolés diszfunkció osztályhatásként jelenik meg a direkt miozin-aktivátorok alkalmazása során. Eredményeink alapján a danicamtivval kezelt betegeknél nagy figyelmet kell fordítani a bal kamra diasztolés funkciójának rendszeres ellenőrzésére.

5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A bal kamrai szívizomzat felépítése és működése jelentősen eltér HFrEF-ben és HFpEF-ben. A szívizomzat strukturális és funkcionális jellemzőinek összehasonlításakor HFrEF-ben alacsonyabb miofibrilláris sűrűséget és miofilamentális Ca^{2+} érzékenységet, míg ezekhez képest HFpEF-ben a szívizomsejtek hipertrófiáját, a szívizomsejtek nagyobb passzív feszülését (az $F_{\text{passzív}}$ növekedését) és fokozott Ca^{2+} érzékenységét ($p\text{Ca}_{50}$) figyeltük meg. Ezen változások összhangban állnak a szívizomzat csökkent kontraktilitásával HFrEF-ben és magyarázhatják a kamraizomzat kóros relaxációját, illetve tágulékonyságának csökkenését HFpEF-ben. A megfigyelt különbségek alátámasztják a két szívelégtelenség fenotípus klinikai elkülönítését.
2. A miokardális fibrózis, a kóros szívizomsejt passzív feszülés, a glikációs végtermékek (AGEs) lerakódása és az endotél diszfunkció együttesen, de különböző mértékben fordulnak elő diabéteszes HFrEF és HFpEF betegekben. Eredményeink arra utalnak, hogy HFrEF-ben elsősorban a fibrózis és az AGEs lerakódása, míg HFpEF-ben a hipertrófiás szívizomsejtek kórosan emelkedett passzív feszülése játszhat fontos szerepet a kamrai kontraktilitás változásaiban.
3. A β -blokkoló kezelés HFpEF-ben észlelt - HFrEF-től elmaradó - klinikai hatékonysága összefüggésben állhat a szívizomsejtek szívelégtelenség-specifikus remodelációival. Eredményeink szerint, a két szívelégtelenség formában az átépülés máshogy érinti a β -adrenerg jelátviteli útvonalat és a celluláris Ca^{2+} homeosztázist.
4. A merev N2B titin izoforma hipofoszforylációja kiemelt szerepet játszik a szívelégtelen betegek szívizomsejtjeinek kórosan emelkedett passzív feszülésében.
5. A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatására képződő oxidánsok a csökkentik a szívizomsejt aktív erejét, és annak Ca^{2+} érzékenységét, valamint növelik a szívizomsejtek passzív feszülését. Ezek a hatások károsíthatják a bal kamra kontraktilis funkcióját. Az MPO hatásai az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósulnak meg. Az MPO gátlása ígéretes célpont lehet a miokardiális kontraktilis diszfunkció kivédésében emelkedett MPO szinttel járó kardiovaszkuláris kórfolyamatokban.

6. Az akut stressz hatására jelentős mértékben növekszik a szérumban a progeszteronszint, mind nem ovariectomizált, mind ovariectomizált nőstény patkányokban. Az ösztrogén hiányában a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) foszforilációja által növekedhet a bal kamrai izolált szívműködő sejtek Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása. A szérumban a progeszteron szint növekedésével párhuzamosan csökken a miofilamentális rendszer Ca^{2+} érzékenysége.
7. Omecamtiv mecarbil (OM) hatására az *in vitro* követett szívműködő sejt kontrakciók a szisztolés funkció javulását tükrözik, mely változatlan Ca^{2+} tranziensek mellett, a szisztolés szarkomerhossz csökkenésének és jelentős részben a kontrakciók elnyúlásának köszönhető. Nagyobb OM koncentrációk hatására a diasztolés szarkomerhosszak jelentős csökkenése, a kontrakciók kinetikai paramétereinek lassulása és a kontrakció idejének szignifikáns növekedése figyelhető meg. Az észlelt változások az OM alkalmazásakor diasztolés diszfunkció kialakulásához vezethetnek.
8. Danicamtiv hatására az *in vivo* meghatározott bal kamrai kontraktilitás és szisztolés funkció jelentős mértékben javul, a kontrakciók kinetikája azonban jelentősen lassul. A szisztolés időtartamának megnyúlása következtében a diasztolés időtartama lerövidül, amely miokardiális iszkémia kialakulásához vezethet a szer alkalmazása során.

A miozin aktivátorok (OM és danicamtiv) esetén felmerülő potenciális diasztolés funkció romlás korlátozhatja ezen új gyógyszercsoport klinikai alkalmazhatóságát.

6. A KUTATÁSI EREDMÉNYEK TUDOMÁNYOS ÉS TÁRSADALMI HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI, A KUTATÁS JELENTŐSÉGE

Kísérleti eredményeink hozzájárulhatnak a szívelégtelenség eltérő klinikai formáiban a szívizomzatban végbemenő strukturális, funkcionális, biokémiai és molekuláris változások pontosabb megértéséhez. A bal kamra szisztolés és diasztolés funkciójának romlásáért felelős patofiziológiai és molekuláris folyamatok alaposabb megismerése potenciálisan terápiás jelentőséggel bírhat korszerűbb szívelégtelenség kezelési stratégiák kidolgozásában. *In vitro* és *in vivo* kísérleteink eredményei elősegíthetik a miozin aktivátorok klinikai alkalmazásának optimalizálását.

7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

(A közlemények felsorolása tematikusan, az értekezésben felhasznált sorrendnek megfelelően történt.)

1. van Heerebeek L, **Borbély A**, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ: Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 113 (16), 1966-1973, 2006. IF: 10,94 Független citáció: 497
2. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, **Borbély A**, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ: Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 117 (1), 43-51, 2008. IF: 14,595 Független citáció: 548
3. Hamdani N, Paulus WJ, van Heerebeek L, **Borbély A**, Boontje NM, Zuidwijk MJ, Bronzwaer JGF, Simonides WS, Niessen HWM, Stienen GJM, van der Velden J: Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur. Heart J*. 30 (15), 1863-1872, 2009. IF: 9,8 Független citáció: 36
4. **Borbély A**, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Édes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JGF, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJM, Paulus WJ: Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ. Res*. 104 (6), 780-786, 2009. IF: 9,214 Független citáció: 225
5. Kalász J, Pásztorné Tóth E, Fagyas M, Balogh Á, Tóth A, Csató V, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med*. 84, 116-127, 2015. IF: 5,784 Független citáció: 11
6. Kalász J, Pásztorné Tóth E, Bódi B, Fagyas M, Tóth A, Bhattoa H, Vári S, Balog M, Blažetić S, Heffer M, Papp Z, **Borbély A**: Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats. *Croat. Med. J*. 55 (3), 239-249, 2014. IF: 1,305 Független citáció: 11
7. Ráduly A, Tóth A, Sárkány F, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Csanádi Z, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Omecamtiv mecarbil augments cardiomyocyte contractile activity both at resting and systolic Ca^{2+} levels. *ESC Heart Failure*. 10 (2), 1326-1335, 2023. IF: 3,2 Független citáció: 4
8. Ráduly A, Sárkány F, Kovács M, Bernát B, Juhász B, Szilvássy Z, Pórszász R, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Csanádi Z, Édes I, Tóth A, Papp Z, Priksz D, **Borbély A**: The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci*. 24 (1), 446, 2023. IF: 4,9 Független citáció: 8

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 59,738 (CIT: 1340)

7.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények

1. Kaheinen P, Pollesello P, Hertelendi Z, **Borbély A**, Szilágyi S, Édes I, Nissinen E, Haikala H, Papp Z: Positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca^{2+} -sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition.. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 98 (1), 74-78, 2006. IF: 1,788 Független citáció: 23

2. Velden J, Narolska N, Lamberts R, Boontje N, **Borbély A**, Zaremba R, Bronzwaer J, Papp Z, Jaquet K, Paulus W, Stienen G: Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 69 (4), 876-887, 2006. IF: 5,826 Független citáció: 53
3. Paulus W, Tschöpe C, Sanderson J, Rusconi C, Flachskampf F, Rademakers F, Marino P, Smiseth O, De Keulenaer G, Leite-Moreira A, **Borbély A**, Édes I, Handoko M, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser A, Brutsaert D: How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart. J.* 28 (20), 2539-2550, 2007. IF: 7,924 Független citáció: 2138
4. Papp Z, **Borbély A**, Édes I: Változások a szív kontraktilis fehérjéinek szerkezetében diasztolés szívelégtelenség során. *LAM.* 17 (6-7), 441-445, 2007. IF: - Független citáció: -
5. Édes I, Czuriga D, Csányi G, Chlopicki S, Recchia F, **Borbély A**, Galajda Z, Édes I, Velden J, Stienen G, Papp Z: Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1), R20-R29, 2007. IF: 3,661 Független citáció: 33
6. Heerebeek L, Hamdani N, Handoko M, Falcao-Pires I, Musters R, Kupreishvili K, Ijsselmuiden A, Schalkwijk C, Bronzwaer J, Diamant M, **Borbély A**, Velden J, Stienen G, Laarman G, Niessen H, Paulus W: Response to Letter Regarding Article, "Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart: Importance of Fibrosis, Advanced Glycation End Products, and Myocyte Resting Tension". *Circulation.* 117 e484, 2008. IF: - Független citáció: 37
7. Hertelendi Z, Tóth A, **Borbély A**, Galajda Z, Velden J, Stienen G, Édes I, Papp Z: Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signal.* 10 (7), 1175-1184, 2008. IF: 6,19 Független citáció: 40
8. Hamdani N, de Waard M, Messer A, Boontje N, Kooij V, Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker D, **Borbély A**, Papp Z, Paulus W, Stienen G, Marston S, Velden J: Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 29 (6-8), 189-201, 2008. IF: 2 Független citáció: 47
9. Hertelendi Z, Tóth A, **Borbély A**, Galajda Z, Édes I, Tótsaki Á, Papp Z: The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 13 (8B), 2200-2209, 2009. IF: 5,228 Független citáció: 3
10. **Borbély A**, Heerebeek L, Paulus W: Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ. Res.* 104 (1), 12-14, 2009. IF: 9,214 Független citáció: 27
11. Molnár A, **Borbély A**, Czuriga D, Mányiné Siket I, Szilágyi S, Hertelendi Z, Pásztorné Tóth E, Balogh Á, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Édes I, Tóth A: Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284 (2), 1031-1039, 2009. IF: 5,328 Független citáció: 10
12. **Borbély A**, Papp Z, Édes I, Paulus W: Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep.* 61 (1), 139-145, 2009. IF: 2,086 Független citáció: 46
13. Hamdani N, Paulus W, Heerebeek L, **Borbély A**, Boontje N, Zuidwijk M, Bronzwaer J, Simonides W, Niessen H, Stienen G, Velden J: Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur. Heart J.* 30 (15), 1863-1872, 2009. IF: 9,8 Független citáció: 36

14. **Borbély A**, Édes I, Papp Z: Cukorbetegség és szívizom összehúzódási zavar: pathogenezis és kezelési lehetőségek az új alapkutatási eredmények tükrében. *Diabetol. Hung.* 19 (1), 7-16, 2010. IF: - Független citáció: -
15. Czuriga I, Czuriga D, **Borbély A**: Diastolés szívelégtelenség = Diastolic heart failure. *Orvosképzés.* 85 (1), 49-54, 2010. IF: - Független citáció: -
16. Hamdani N, **Borbély A**, Veenstra S, Kooij V, Vrydag W, Zaremba R, Remedios C, Niessen H, Michel M, Paulus W, Stienen G, Velden J: More severe cellular phenotype in human idiopathic dilated cardiomyopathy compared to ischemic heart disease. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 31 (4), 289-301, 2010. IF: 1,933 Független citáció: 16
17. Falcao-Pires I, Hamdani N, **Borbély A**, Gavina C, Schalkwijk C, Velden J, Heerebeek L, Stienen G, Niessen H, Leite-Moreira A, Paulus W: Diabetes Mellitus Worsens Diastolic Left Ventricular Dysfunction in Aortic Stenosis Through Altered Myocardial Structure and Cardiomyocyte Stiffness. *Circulation.* 124 (10), 1151-1159, 2011. IF: 14,739 Független citáció: 148
18. Czuriga D, Paulus W, Czuriga I, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Cellular mechanisms for diastolic dysfunction in the human heart. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2532-2538, 2012. IF: 2,69 Független citáció: 14
19. Papp Z, Czuriga D, Balogh L, Balogh Á, **Borbély A**: How cardiomyocytes make the heart old. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2515-2521, 2012. IF: 2,69 Független citáció: 9
20. **Borbély A**, Dimitrow P: Editorial: cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to novel therapeutical implications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2433-2434, 2012. IF: - Független citáció: -
21. Czuriga I, **Borbély A**, Czuriga D, Papp Z, Édes I: Szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval (diasztolés szívelégtelenség). *Orvosi Hetilap.* 153 (51), 2030-2040, 2012. IF: - Független citáció: 4
22. **Borbély A**, Édes I: Apixaban: a legújabb orális antikoaguláns Magyarországon pitvarfibrillációban szenvedő betegek kezelésére. *LAM.* 23 181-187, 2013. IF: - Független citáció: -
23. Papp Z, Velden J, **Borbély A**, Édes I, Stienen G: Altered myocardial force generation in end-stage human heart failure. *ESC Heart Failure.* 1 (2), 160-165, 2014. IF: - Független citáció: 7
24. Papp Z, **Borbély A**, Walter J: CrossTalk opposing view: the late sodium current is not an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). *J. Physiol.-London.* 592 (3), 415-417, 2014. IF: - Független citáció: 5
25. Papp Z, **Borbély A**, Paulus W: Rebuttal from Zoltán Papp, Attila Borbély and Walter J. Paulus. *J. Physiol.-London.* 592 (3), 421-422, 2014. IF: - Független citáció: -
26. Balog M, Miljanović M, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Viljetić B, **Borbély A**, Papp Z, Blazeković R, Vári S, Fagyas M, Heffer M: Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modifies sexual hormone and leptin receptors. *Croat. Med. J.* 56 (2), 104-113, 2015. IF: 1,483 Független citáció: 11
27. Uri K, Fagyas M, Kertész A, **Borbély A**, Jenei C, Bene O, Csanádi Z, Paulus W, Édes I, Papp Z, Tóth A, Lizanecz E: Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development. *J. Renin-Angio-Aldo S.* 17 (4), 1-11, 2016. IF: 1,396 Független citáció: 86
28. Pitha J, Králová L, Hubáček J, Sekerková A, Lánská V, Adámková V, Dorobantu M, Nicolescu R, Steiner R, Ivić V, **Borbély A**, Papp Z, Vári S: Smoking impairs and circulating stem cells favour the protective effect of the T allele of the connexin37 gene in ischemic heart disease: a multinational study. *Atherosclerosis.* 244 73-78, 2016. IF: 4,239 Független citáció: 5
29. Nyolczas N, Heltai K, **Borbély A**, Habon T, Járai Z, Sziliczei E, Stadler P, Faludi R, Herczeg B, Papp E, Lakatos F, Nagy K, Katona A, Kovács I, Tomcsányi J, Nagy

- A, Sepp R: Magyar Szívelégtelenség Regiszter 2015?2016:Kezdeti eredmények. *Orv. hetil.* 158 (3), 94-100, 2017. IF: 0,322 Független citáció: 6
30. Pözl G, Altenberger J, Baholli L, Beltrán P, **Borbély A**, Comin-Colet J, Delgado J, Fedele F, Fontana A, Fruhwald F, Giamouzis G, Giannakoulas G, Garcia-González M, Gustafsson F, Kaikkonen K, Kivikko M, Kubica J, von Lewinski D, Löfman I, Malfatto G, Manito N, Martínez-Sellés M, Masip J, Merkely B, Morandi F, Mølgaard H, Oliva F, Pantev E, Papp Z, Perna G, Pfister R, Piazza V, Bover R, Rangel-Sousa D, Recio-Mayoral A, Reinecke A, Rieth A, Sarapohja T, Schmidt G, Seidel M, Störk S, Vrtovec B, Wikström G, Yerly P, Pollesello P: Repetitive use of levosimendan in advanced heart failure: need for stronger evidence in a field in dire need of a useful therapy. *Int. J. Cardiol.* 243 389-395, 2017. IF: 4,034 Független citáció: 15
 31. **Borbély A**, Clemens M, Jenei C, Daragó A, Erdei N, Hertelendi Z, Fülöp T, Csanádi Z, Édes I: Szívtranszplantáció vagy abláció?: tachycardia-indukálta cardiomyopathia. *Cardiol. Hung.* 47 125-131, 2017. IF: - Független citáció: -
 32. Nagy V, **Borbély A**, Kohút S, Mohay S, Eke N, Andrassy G, Borbola J, Édes I: Koenzim-Q10: evidenciákon alapuló alkalmazások Magyarországon. *Cardiol. Hung.* 48 211-218, 2018. IF: - Független citáció: -
 33. Szegedi A, P. Szabó R, Pethő Á, Kertész A, Maros T, **Borbély A**, Édes I, Csanádi Z: Peritoneális dialízis, mint "bridge" terápia a szívtranszplantációig. *Cardiol. Hung.* 48 184-186, 2018. IF: - Független citáció: 1
 34. Oliva F, Comin-Colet J, Fedele F, Fruhwald F, Gustafsson F, Kivikko M, **Borbély A**, Pözl G, Tschöpe C: Repetitive levosimendan treatment in the management of advanced heart failure. *Eur. Heart J. Suppl.* 20 (suppl.), I11-I20, 2018. IF: 1,321 Független citáció: 17
 35. Kurczina A, Kracsó B, Balogh L, Rác Á, Vágó H, Clemens M, Csanádi Z, **Borbély A**: Non-compact cardiomyopathia, avagy a baljós trabekuláltság. *Cardiol. Hung.* 49 (2), 65-70, 2019. IF: - Független citáció: -
 36. Ráduly A, Kothalawala E, **Borbély A**: Előrelépés a szívelégtelenség kezelésében. *Háziorv. Továbbk. Szle.* 25 797-802, 2020. IF: - Független citáció: -
 37. Sárkány F, Ráduly A, **Borbély A**: Az intravénás vaspótlás jelentősége krónikus szisztolés szívelégtelenségben. *Orvostovábbk. szle.* 28 (3), 41-46, 2021. IF: - Független citáció: -
 38. Dauw J, Lelonek M, Zegri-Reiriz I, Paredes-Paucar C, Zara C, George V, Cobo-Marcos M, Knappe D, Shchekochikhin D, Lekhakul A, Klincheva M, Frea S, Miró Ò, Barker D, **Borbély A**, Nasr S, Doghmi N, Espriella R, Singh J, Bovolo V, Fialho I, Ross N, Heuvel M, Benkouar R, Findeisen H, Alhaddad I, Al Balbissi K, Barge-Caballero G, Ghazi A, Bruckers L, Martens P, Mullens W: Rationale and Design of the Efficacy of a Standardized Diuretic Protocol in Acute Heart Failure Study. *ESC Heart Failure.* 8 (6), 4685-4692, 2021. IF: 3,612 Független citáció: 17
 39. Jenei C, Kádár R, Balogh L, **Borbély A**, Györy F, Péter A, Daragó A, Csanádi Z: Role of 3D echocardiography-determined atrial volumes in distinguishing between pre-capillary and post-capillary pulmonary hypertension. *ESC Heart Failure.* 8 (5), 3975-3983, 2021. IF: 3,612 Független citáció: 5
 40. Ráduly A, Tóth A, Papp Z, **Borbély A**: Új lehetőség a szisztolés szívelégtelenség (HFrEF) kezelésében: omecamtiv-mecarbil. *Cardiol. Hung.* 51 (2), 118-124, 2021. IF: - Független citáció: 1
 41. Sepp R, Hategan L, Csányi B, Borbás J, Tringer A, Pálkás E, Nagy V, Takács H, Latinovics D, Nyolczas N, Pálkás A, Faludi R, Rábai M, Szabó G, Czuriga D, Balogh L, Halmosi R, **Borbély A**, Habon T, Hegedűs Z, Nagy I: The Genetic Architecture of Hypertrophic Cardiomyopathy in Hungary: analysis of 242 Patients with a Panel of 98 enes. *Diagnostics.* 12 (5), 1-12, 2022. IF: 3,6 Független citáció: 7

42. Fagyas M, Nagy B, Ráduly A, Mányiné Siket I, Mártha L, Erdősi G, Sipka S, Enyedi E, Szabó A, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, **Borbély A**, Szabó T, Balla J, Balla G, Bai P, Bácsi A, Tóth A: The majority of severe COVID-19 patients develop anti-cardiac autoantibodies. *GeroScience*. 44 2347-2360, 2022. IF: 5,6 Független citáció: 20
43. Ráduly A, Sárkány F, Kovács M, Juhász B, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Édes I, Csanádi Z, Tóth A, Papp Z, Priksz D, **Borbély A**: A kardiális miozinaktivátorok klinikai alkalmazhatósága a preklinikai vizsgálatok tükrében. *Cardiol. Hung*. 53 (5), 476-483, 2023. IF: - Független citáció: -
44. Papp Z, Sárkány F, Ráduly A, Pásztor D, Máté B, Tóth A, **Borbély A**: Mi az eredményesebb stratégia: a miozin aktivációja vagy gátlása? *Cardiol. Hung*. 53 (4), 331-336, 2023. IF: - Független citáció: 1
45. Papp Z, Pollesello P, **Borbély A**: Recognizing early signs in the translational phase is essential for drug development in cardiovascular medicine. *ESC Heart Failure*. 10 (4), 2147-2149, 2023. IF: - Független citáció: -
46. Szabó K, Tóth A, Nagy L, Rácz V, Pólik Z, Hódosi K, Nagy A, Barta J, **Borbély A**, Csanádi Z: Add-on Sacubitril/Valsartan Therapy Induces Left Ventricular Remodeling in Non-responders to Cardiac Resynchronization Therapy to a Similar Extent as in Heart Failure Patients Without Resynchronization. *Cardiol Ther*. 13 (1), 149-161, 2024. IF: 3 Független citáció: -
47. Tóth E, Fagyas M, Nagy B, Mányiné Siket I, Szőke B, Mártha L, Mahdi M, Erdősi G, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, **Borbély A**, Szabó T, Balla J, Balla G, Bácsi A, Szekanecz Z, Bai P, Tóth A: Distinct subsets of anti-pulmonary autoantibodies correlate with disease severity and survival in severe COVID-19 patients. *GeroScience*. 46 (2), 1561-1574, 2024. IF: 5,3 Független citáció: -
48. Solymossi B, Muk B, Sepp R, Habon T, **Borbély A**, Heltai K, Majoros Z, Járαι Z, Vágány D, Szatmári Á, Sziliczei E, Bánfi-Bacsárdi F, Nyolczas N: Incidence and predictors of heart failure with improved ejection fraction category in a HFrEF patient population. *ESC Heart Failure*. 11 (2), 783-794, 2024. IF: 3,2 (2023) Független citáció: 4
49. Dauw J, Charaya K, Lelonek M, Zegri-Reiriz I, Nasr S, Paredes-Paucar C, **Borbély A**, Erdal F, Benkouar R, Cobo-Marcos M, Barge-Caballero G, George V, Zara C, Ross N, Barker D, Lekhakul A, Frea S, Ghazi A, Knappe D, Doghmi N, Klincheva M, Fialho I, Bovolo V, Findeisen H, Alhaddad I, Galluzzo A, Espriella R, Tabbalat R, Miró Ò, Singh J, Nijst P, Dupont M, Martens P, Mullens W: Protocolized Natriuresis-Guided Decongestion Improves Diuretic Response: the Multicenter ENACT-HF Study. *Circ: Heart Failure*. 17 1-10, 2024. IF: 7,8 (2024) Független citáció: 29
50. Ráduly A, Sárkány F, Kurczina A, Csanádi Z, Papp Z, **Borbély A**: Az intravénás vaspótlás jelentősége csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenségben. *Cardiol. Hung*. 54, 200-205, 2024. IF: - Független citáció: -
51. Szabó K, Tóth A, **Borbély A**, Csanádi Z, Nagy L: A kardiális reszinkronizációs kezelésre adott válasz újraértelmezése és a terápiás hatékonyság javításának lehetősége *Cardiol. Hung*. 54, 227-233, 2024. IF: - Független citáció: -
52. Ráduly A, Nagy L, Bódi B, Papp Z, **Borbély A**: Biomarkers in heart failure: Traditional and emerging indicators for prognosis. *ESC Heart Failure*. doi: 10.1002/ehf2.15168. Online ahead of print. (Editorial) (2025)

A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények impakt faktora: 129,616 (CIT: 2921)

A PhD fokozat megszerzését követő összes közlemény impakt faktora: 189,354 (CIT: 4261)

7.3. A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények

1. Papp Z, Velden J, **Borbély A**, Édes I, Stienen G: Effects of Ca²⁺-sensitizers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 25 (3), 219-224, 2004. IF: 1,721 Független citáció: 9
2. **Borbély A**, Tóth A, Édes I, Virág L, Papp GJ, Varró A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z: Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc. Res.* 67 (2), 225-233, 2005. IF: 5,283 Független citáció: 68
3. **Borbély A**, Velden J, Papp Z, Bronzwaer J, Édes I, Stienen G, Paulus W: Cardiomyocyte Stiffness in Diastolic Heart Failure. *Circulation.* 111 (6), 774-781, 2005. IF: 11,632 Független citáció: 409
4. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tósaki Á, **Borbély A**, Édes I, Papp Z: Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46 (3), 369-376, 2005. IF: 1,313 Független citáció: 32

A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények impakt faktora: 19,949 (CIT: 518)

Valamennyi közlemény összesített impakt faktora: 209,303 (CIT: 4779)

(A hivatkozások (CIT) mindig független hivatkozásokat jelölnek.)

7.4. Könyvfejezetek

1. **Borbély A**, Habon T, Édes I: Idült pangásos szívelégtelenség In: Tulassay, Z (szerk.) Klinikai belgyógyászat Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2017) 839 pp. 159-163
2. **Borbély A**, Barta J, Kertész A és mtsai: III.2. Szívelégtelenség gyógyszeres kezelése In: Csanádi, Z és Czuriga, D (szerk.) A szív és a verőerek betegségei, Debreceni Egyetem Kiadó (2019) pp. 129-143
3. Barta J, **Borbély A**, Hertelendi Z, Gergely Sz: III.3. Szívizombetegségek In: Csanádi, Z és Czuriga, D (szerk.) A szív és a verőerek betegségei, Debreceni Egyetem Kiadó (2019) pp. 143-151
4. **A Borbély**, J Barta, A Kertész et al: III.2. Pharmacotherapy in heart failure In: Cardiovascular Diseases Edited by Z Csanádi and D Czuriga, Debreceni Egyetem Kiadó (2020) pp. 130-145
5. J Barta, **A Borbély**, Z Hertelendi, Sz Gergely. III.3 Cardiomyopathies In: Cardiovascular Diseases Edited by Z Csanádi and D Czuriga, Debreceni Egyetem Kiadó (2020) pp.145-153
6. **Borbély A**, Nyolczas N: Meghatározása és formái In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 519-519
7. **Borbély A**, Nyolczas N: Gyakoriság In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 519-520
8. **Borbély A**, Nyolczas N: Kóreredet In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 520-522
9. **Borbély A**, Nyolczas N: Kórlefolyás In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 525-526
10. **Borbély A**, Nyolczas N: Kórjóslat In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 532-533.

8. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Borbély Attila tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2025.02.21)
MTA V. Orvosi Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikkek²	<u>59</u>			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		<u>32</u>	<u>4451</u>	<u>5119</u>
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		<u>8</u>	<u>4</u>	<u>4</u>
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		<u>3</u>	<u>61</u>	<u>87</u>
összefoglaló közlemény		<u>13</u>	<u>122</u>	<u>154</u>
rövid közlemény		<u>3</u>	<u>65</u>	<u>84</u>
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	<u>9</u>			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet		<u>9</u>	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		<u>9</u>	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)		<u>59</u>	<u>4703</u>	<u>5448</u>
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	<u>68</u>		<u>4703</u>	<u>5448</u>
V. További tudományos művek	<u>5</u>			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikket is		<u>3</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		<u>2</u>	0	<u>1</u>
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	<u>1</u>		0	<u>1</u>
Összes hivatkozás¹			<u>4708</u>	<u>5456</u>
Hirsch index⁶	<u>23</u>			
g index⁶	<u>49</u>			
Speciális tudománymetriai adatok	Szám		Összes hivatkozás	
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>8</u>		<u>935</u>	
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>15</u>		<u>65</u>	
A tudományos fokozat (PhD 2005) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	<u>55</u>		<u>4838</u>	
Az utolsó 10 év (2015-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	<u>29</u>		<u>304</u>	
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	<u>2343</u>		42,94%	
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben			<u>112</u>	
Jelentés, guideline	0		0	
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0		0	

Megjegyzések:

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Édes Istvánnak és Prof. Dr. Csanádi Zoltánnak a Kardiológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének a lehetőséget, hogy már orvostanhallgatóként bekapcsolódhattam az intézetben folyó kutatómunkába. Nagyon köszönöm mindazt a kivételes és önzetlen támogatást, mellyel a klinikai munka mellett is lehetővé tették kutatásaim folytatását.

Mérhetetlen hálával és köszönettel tartozom PhD témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Zoltánnak, a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, aki bizalmával, folyamatos, töretlen biztatásával és emberi példamutatásával kutatómunkámhoz az ösztönzést és a kiemelkedő színvonalú szakmai háttérrel biztosította, és akinek támogatását és barátságát a mai napig élvezhetem. Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Tóth Attilának jószándékú iránymutatásáért, türelméért és a kísérletek során nyújtott hasznos gyakorlati tanácsaiért. Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden jelenlegi és korábbi munkatársának, legfőképpen PhD hallgatóimnak, Kalász Juditnak és Dr. Ráduly Arnold Péternek kitartó munkájukért, önzetlen segítségükért, mellyel nagymértékben hozzájárultak a fent ismertetett kutatási eredmények létrejöttéhez. Hálásan köszönöm Pászterné Tóth Enikő, Mátyiné Siket Ivetta, Pólik Zsófia és Dr. Fagyas Miklós segítségét a kísérletek elvégzésében.

Az amszterdami VU medical center Élettani Intézetében PhD hallgatóként, majd vendégkutatóként töltött közel két év alatt Prof. Dr. Walter J. Paulus, Prof. Dr. Ger J.M. Stienen és Prof. Dr. Jolanda van der Velden szakmai irányítása alatt dolgozhattam. Bizalmuk, segítőkészségük, emberségük, gyakorlatiasságuk, tisztánlátásuk sokszor volt segítségemre, melyért hálás köszönettel tartozom. Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Nazha Hamdaninak, Loek van Heerebeeknek és Ines Falcao-Piresnek munkámhoz nyújtott segítségüket.

Hálásan köszönöm kollegáimnak, a Kardiológiai Intézet valamennyi munkatársának a munkámhoz nyújtott szakmai és gyakorlati támogatást.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családom, szüleim, gyermekeim és legfőképpen Feleségem segítségét, támogatását, megértését, szeretetét, végtelen türelmét, a nyugodt családi háttér biztosítását, mely szavakkal nehezen kifejezhető és nélkülözhetetlen volt ezen munka létrejöttéhez.