Válasz Dr. Ferdinandy Péter egyetemi tanár, az MTA doktora, opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Ferdinandy Péter Professzor Úrnak doktori értekezésem pozitív bírálatát és értékes kérdéseit.

Az általános értékelés kapcsán tett megjegyzésekre a következők a válaszaim:

1. megjegyzés

Mi volt az oka, hogy közleményeim közül számosat nem használtam fel a disszertációhoz? Az értekezés megírása során igyekeztem az eredményeket minél koherensebb módon bemutatni. Ennek megfelelően, számos közleményt nem használtam fel, melyek tematikája nem kapcsolódott szervesen az értekezés fő irányához, a szívizom-kontraktilitás regulációjához.

2. megjegyzés

Bírálóm felrója, hogy a disszertációban nem tüntettem fel, hogy mely közlemények születtek itthon illetve külföldön. Az eredeti közlemények szerzőit illetve affiliációjukat megtekintve megállapítható, hogy a közlemények zöme több hazai és külföldi kutatócsoport közös munkája eredményeként született meg. Mentorom, Tóth Miklós, 30 évvel ezelőtt kezdte meg a közös munkát a finn Heikki Ruskoahoval, a németországi Heidelbergben. A Semmelweis Egyetem és a University of Oulu között kialakult együttműködésbe jómagam 20 éve kapcsolódtam be. 1998 és 2003 között posztdoktorként dolgoztam a finnországi University of Oulu-n, ehhez az időszakhoz köthetőek az értekezés I., II., VI., XII., XIV., és XVI. számú publikációi. Pécsre történő hazatérésemet követően is fenntartottuk ezt a fontos kapcsolatot, szenior vendégkutatóként évente 1-2 hónapos tanulmányutakon vettem részt a University of Oulu-n. Az Oulu-Budapest-Pécs háromszögben magyar és finn oldalon elnyert együttes pályázatok (OTKA, ETT, TÁMOP, Academy of Finland's Centre of Excellence, Sigrid Juselius Foundation, Finnish Foundation for Cardiovascular Research, etc) támogatásával folytattuk a közös kutatómunkát, metodikai és műszerfejlesztéseket. Ezen felül PhD-kurzusokat, brainstorming-okat és közös szimpóziumokat tartottunk. Az elmúlt 2 évtized során a University of Oulu-n 6, a Semmelweis Egyetemen 4, a Pécsi Tudományegyetemen 2 PhD értekezés született, melyekhez posztdoktori illetve szenior kutatóként járultam hozzá érdemben. A magyar tudományos élet fejlesztése érdekében végzett munkájáért Heikki Ruskoaho professzort 1996-ban a Semmelweis Egyetem díszdoktorává avatták, 2001 óta tiszteleti tagja a Magyar Tudományos Akadémiának, 2004-ben a Magyar Köztársasági Érdemrend középkeresztjével tüntették ki.

A részletes bírálat során feltett kérdésekre a válaszaim a következőek:

1. kérdés

Opponensem kérdései az AM overexpressziós kísérleteinkre vonatkoztak. Az adenovírus géntranszfer hatékonyságát és lokalizációját X-gal festéssel (5-bromo-4-kloro-3-indoil-13-β-D-galaktopiranozid) demonstráltuk a kontroll, β-galaktozidázt (LacZ) overexpresszáló szíveken (az értekezés 7C-D. ábrája). Az injektálás helyének megfelelően, a bal kamra falában kiterjedt transzmurális X-gal festődést észleltünk, ezzel ellentétben a jobb kamra, a bal illetve jobb pitvar nem festődött. Az általunk használt vektor, az 5-ös szerotípusú adenovírus, nagy hatékonysággal képes megfertőzni a lassú osztódású illetve a nem osztódó, terminálisan differenciálódott sejteket, melyek közé a szívizomsejtek is tartoznak. A fenti vizsgálatainkban nem végeztünk kvantifikációt, ugyanakkor kollaborációs partnerünk azonos vektort használva kimutatta, hogy VEGF-B géntranszfert követően, a szívizomsejtek ≈40%-a fejezte ki a célfehérjét (Serpi és mtsai, 2011), mely összevethető a módszer mások által leírt hatékonyságával (Guzman és mtsai, 1993; Quiñones és mtsai, 1996; Davis és mtsai, 2008). Fontos hangsúlyozni, hogy a teljes bal kamrai szövetminták Northern-blot analízise szerint az AM génexpressziója a géntranszfert követő 3. napon 20.9-szeres ($P<0.001$) növekedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva (az értekezés 7A. ábrája), azaz a bal kamra szintjén megfelelő hatékonysággal működött a génbevitel. További géntranszfer módozatokat nem alkalmaztunk.

2. kérdés

Bírálóm következő kérdése arra vonatkozott, hogy szívelégtelenségben a pozitív inotrop hatású kardiokinek vajon a pumpafunkció fenntartásában játszanak-e szerepet, vagy éppen ellenkezőleg, a dekompenzáció kialakulását segítik-e elő. Azon mechanizmusok, mint például a β-adrenerg receptorok (β-AR) izgalma, melyek a szívizom-kontraktilitást csupán aránytalanul magas energiaráfordítás mellett képesek növelni a megfelelő energetikai tartalékok hiányában működő, hanyatló pumpafunkciójú szíven, miokardiális iszkémiára hajlamosítanak, fokozhatják a szívizomsejtek apoptotikus és nekrotikus elhalását, hozzájárulva a szívelégtelenség további progressziójához (Nakayama és mtsai, 2007; Zhang és mtsai, 2010). Az általunk is vizsgált ET-1-ről leírták, hogy *ex vivo* jelentősen javította a kontraktilitás hatásfokát (Takeuchi és mtsai, 2001). Ezzel összefüggésben, az ET-1 szimultán volt képes fokozni a kontrakciós erőt és csökkenteni az aktomiozin ATPáz aktivitást *in vitro*, kiemelendő, hogy a kontrakciók hatásfoka a szarkomerhossz növelésével progresszív módon javult (McClellan és mtsai, 1996). Hipertrófiás szíveken nyert eredményeink szerint, a miokardiális ET-1/ET_A-receptor rendszer aktivációja jelentősen hozzájárul a kamrafunkció fenntartásához akut hemodinamikai terhelés során (az értekezés 55. ábrája). Továbbá, nyomásterhelésnek kitett egerekben, súlyos kamratágulat és pumpafunkció-zavar jön létre, az ET-1-et kódoló gén kondicionális, szívizom-specifikus deléciója esetén (Zhao és mtsai, 2006). Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy számos vizsgálat eredménye arra utalt, hogy az ET-1 jelentős szerepet játszhat a szívelégtelenség kialakulásában és progressziójában. Szívelégtelenség különböző állatmodelljeiben az ET_A- illetve $ET_{A/B}$-receptor-antagonisták csökkentették az endothelium funkciózavarát, előnyös hemodinamikai választ váltottak ki, valamint javították a kamrai remodellációt és a túlélést (Brunner és mtsai, 2006). Ezen megfigyelések alapján komoly várakozás övezte az ET-receptor-antagonisták klinikai tesztelését. Azonban a REACH-1 (Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure), az ENCOR (Enrasentan Cooperative Randomized Evaluation) és a HEAT (Heart Failure Endothelin A Receptor Blockade Trial) randomizált nagy klinikai tanulmányok negatív eredménnyel zárultak, illetve a magas dózisú bosentan és enrasentan ($ET_{A/B}$-receptor-antagonisták) illetve darusentan (ET_A-receptor-antagonista) adminisztrációja során a szívelégtelen betegek egy részénél a tünetek fokozódását tapasztalták (Mylona és Cleland, 1999; Abrahams, 2001; Lüscher és mtsai, 2002; Packer és mtsai, 2005). A kisállat-modelleken tett megfigyelések extrapolálhatósága a humán viszonyokra kérdéses, mégis támpontot nyújthatnak a klinikai tanulmányok során nyert adatok megértéséhez. Hipotézisünk szerint, az ET-receptor-antagonisták a hemodinamikai terhelés függvényében javíthatják illetve ronthatják a kamrafunkciót. Nyugalmi viszonyok között az ET-receptor-antagonisták a perifériás rezisztenciát csökkentve javíthatják a szív teljesítményét. Ugyanakkor, fokozott hemodinamikai igénybevétel esetén a miokardium ET-receptorainak a gátlása csökkentheti a hipertrófiás szívek adaptációs készségét a Frank-Starling-válasz befolyásolása révén (Szokodi és mtsai, 2003).

Energetikai szempontból az AM inotrop hatása is kedvezőnek tűnik. Mérsékelten csökkent szisztolés funkciójú betegeken (EF: 40-50%) a peptid anélkül növelte a bal kamrai kontraktilitást (végszisztolés elastance-t), hogy érdemben fokozta volna a szívizom oxigénfogyasztását (Nagaya és mtsai, 2002). Mivel az AM mind az elő-, mind az utóterhelést csökkentette, a kamrai falfeszülés következményes csökkenése előnyösen befolyásolhatta a szív oxigénigényét. Jelenleg nem ismert, hogy a hemodinamikai hatásain túl, az AM képes-e közvetlenül javítani a kontraktilitás hatásfokát. Krónikus nyomásterhelés hatására, a vad típusú egerekhez viszonyítva, a heterozigota AM génkiütött egerek ($AM^{+/-}$) súlyosabb bal kamrai funkciózavart és kifejezettebb szívhipertrófiát mutattak, amihez magasabb fokú mortalitás társult (Niu és mtsai, 2004). Az endogén kardiokin hiányában megfigyelt maladaptív válasz hátterében számos folyamat károsodása állhat, mivel az AM, a pozitív inotrop effektusa mellett, antiapoptotikus, antihipertrófiás, antifibrotikus, és angiogenezist serkentő hatással is rendelkezik (Nagaya és mtsai, 2005; Szokodi és Ruskoaho, 2008). Mindezek alapján feltételezhető, hogy humán krónikus szívelégtelenségben az AM bal kamrai termelődésének jelentős emelkedésére (Jougasaki és mtsai, 1995) adaptív válaszként tekinthetünk.

Tartós nyomásterhelés állatmodelljeiben a hipertrófiás szívek csökkent apelin expressziót mutatnak (az értekezés 31C. ábrája), míg mások észlelései szerint, szívelégtelenség állapotában mind az apelin, mind az apelinreceptor bal kamrai expressziója downregulálódik (Iwanaga és mtsai, 2006). Az apelin génhiányos egerekben öregedés során (6-12 hónap) a balkamra-funkció jelentősen beszűkült, mely exogén apelin adásával korrigálható volt (Kuba és mtsai, 2007). Fiatalabb korban (3-4 hónapos), amikor az apelin génhiányos egerek pumpafunkciója *in vivo* csak enyhe fokú romlást mutatott, az ezen állatokból izolált szívizomsejtek kontraktilitása már jelentősen csökkent (Charo és mtsai, 2009). Továbbá, a vad típusú egyedekhez képest, az apelin génhiányos

egerekben nyomásterhelés hatására illetve miokardiális infarktust követően súlyosabb fokú szívelégtelenség fejlődött ki (Kuba és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2013). E megfigyelések arra utalnak, hogy az endogén apelin fontos védő szereppel bír a miokardiumban. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a kontraktilitás befolyásolása mellett az apelin, az AM-hoz hasonlóan, egyéb érdemi hatásokkal is rendelkezik patofiziológiás viszonyok között, gátolja az apoptózist és a fibrózist, valamint stimulálja az angiogenezist a szívben (Kuba és mtsai, 2007; Siddiquee és mtsai, 2011; Wang és mtsai, 2013).

3. kérdés

Opponensem következő kérdése arra irányult, hogy az általunk tanulmányozott kardiokinek használhatóak-e biomarkerként a szívelégtelenség klinikai stádiumának illetve prognózisának meghatározásához. Az autokrin/parakrin szintű szabályozási folyamatokban résztvevő peptidekre jellemző, hogy alacsony a plazmakoncentrációjuk, gyors az eliminációjuk, ennélfogva rövid a féléletidejük. E tulajdonságaik miatt korlátozottan használhatóak biomarkerként. Ezzel szemben, ezen kardiokinek lokális aktivitása pontosabban jellemezhető szisztémásan a prekurzoraik egyes stabil fragmentumainak a meghatározása révén, melyek egyenlő mértékben képződnek az érett peptiddel, ugyanakkor biológiailag inaktívak, jelentősen hosszabb a féléletidejük, továbbá kevésbé degradálódnak a biológiai mintákban. Az AM esetén a prekurzor molekula középső régiójának a fragmentuma (MR-proAM, *"midregion proadrenomedullin"*), az ET-1 esetén a prekurzor C-terminális fragmentuma (CT-proET-1, *"C-terminal pro-endothelin-1"*) tűnik ígéretes biomarkernek. Akut szívelégtelenségben az MR-proAM emelkedett plazmaszintje előrejelezte a 30 napos illetve a 90 napos halálozás magasabb kockázatát a MOCA (The Multinational Observational Cohort on Acute Heart Failure) (Lassus és mtsai, 2013) és a BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) tanulmányban (Maisel és mtsai, 2010). A CT-proET-1 magas plazmaszintje szintén a mortalitás független prediktorának adódott egy 12 hónapos utánkövetéses vizsgálat során (Dieplinger és mtsai, 2009). Stabil, krónikus szívelégtelen betegek populációjában az MR-proAM plazmaszintje szoros összefüggést mutatott a betegség klinikai stádiumával (New York Heart Association [NYHA] klasszifikáció). Az MR-proAM és a CT-proET-1 emelkedett plazmaszintje a kardiovaszkuláris eredetű mortalitás független prediktorának bizonyult 12 hónapos (von Haehling és mtsai, 2010, Jankowska és mtsai, 2011) illetve 24 hónapos utánkövetés során (Adlbrecht és mtsai, 2009), valamint, az új biomarkerek képesek voltak tovább javítani az NT-proBNP prognosztikus erejét , mely a szívelégtelenség diagnosztikájának jelenlegi elsőrendű markere az európai és az észak-amerikai irányelvek tükrében (McMurray és mtsai, 2012; Yancy és mtsai, 2013). Hasonló módon, nagy betegpopuláció (n=1237) átlagos 3.9 éves követése során az emelkedett MR-proAM és CT-proET-1 értékek az összhalálozás nagyobb kockázatával társultak a GISSI-HF (GISSI-heart failure) tanulmányban (Masson és mtsai, 2010). Továbbá, a PEACE (Prevention of Events With Angiotensin Converting Enzyme) vizsgálatban, alacsony rizikójú, megtartott balkamra-funkciójú, stabil koronáriabetegek (n=3717) 6 éves követése során az MR-proAM és a CT-proET-1 magas plazmaszintje független módon előrejelezte a kardiovaszkuláris eredetű halál bekövetkeztét illetve a szívelégtelenség kialakulását (Sabatine és mtsai, 2012). Mindez felveti, hogy az új biomarkerek révén olyan komplex predikciós modellek dolgozhatóak ki, melyek segítségével azonosíthatóvá válhatnak a legveszélyeztetettebb betegek, akik esetében a korai intenzív farmakológiai kezelés illetve a non-farmakológiai eszközös terápia javíthatja az életkilátásaikat.

4. kérdés

Bírálóm következő kérdését az apelin sejtek közötti kommunikációt befolyásoló hatása kapcsán tette fel. Patkány, neonatális szívizomsejt-tenyészeten, multielektród-array technika segítségével kimutattuk, hogy az apelin fokozza a szívizomsejtek spontán tüzelési frekvenciáját, vezetési sebességét és csökkenti a mezőpotenciál időtartamát (az értekezés 30. ábrája). Az interkaláris lemezek jelentős apelinreceptor expressziót mutatnak (az értekezés 21. ábrája), felvetve, hogy a peptid lokálisan képes befolyásolni a réskapcsolatok működését. Ennek részletei, mint például a Bíráló által felvetett connexin-43 szerepe, azonban még tisztázásra vár.

5. kérdés

Mely sejtekben, mely NAD(P)H-oxidáz izoformák által termelt ROS aktiválhatja az ERK1/2-t és járulhat hozzá az ET-1 pozitív inotrop hatásához? A NAD(P)H-oxidáz (Nox) fehérjecsalád 7

tagja közül a szívben döntően a Nox2 és a Nox4 expresszálódik. Kimutatták, hogy a miokardiumot felépítő fő sejttípusok, így a szívizomsejtek, fibroblasztok, endothelsejtek, valamint a vaszkuláris simaizomsejtek mindkét izoformát kifejezik. Ugyanakkor, ezen izoformák markáns különbséget mutatnak a felépítésüket, aktivációjuk módját, szerepüket, intracelluláris lokalizációjukat, és a termelt ROS molekulákat tekintve. A Nox2 fehérje aktivitását akutan számos G-proteinhez kapcsolt receptor agonista (angiotenzin II, ET-1, α-AR agonisták, etc), biomechanikai erők, és metabolikus faktorok (glükóz) képesek fokozni. Stimuláció hatására a citoszólban található alegységek ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, és Rac1) a sejtmembránban lévő Nox2 fehérjéhez kapcsolódnak, serkentve a szuperoxid termelését. Ezzel szemben a Nox4 regulációja döntően az enzim expressziójának szintjén történik. A Nox4-et a mitokondrium, az endoplazmás retikulum és a sejtmag membránjában írták le, az enzim döntően hidrogén-peroxidot termel (Geiszt, 2006; Burgoyne és mtsai, 2012). Kísérleteinkben arra az alapvető kérdésre kerestünk választ, hogy intakt szíven az endogén ROS, mint jelátvivő, szerepet játszik-e a kontraktilitás akut regulációjában. A kapott válaszaink természetszerűleg további kérdéseket generálnak, melyek közül számos nyitott még. Ily módon, nem ismert, hogy az ET-1 hatására mely sejttípusban fokozódik a ROS produkció. A Nox izoformákat tekintve, számos adat utal arra, hogy az ET-1 a Nox2 fehérjét aktiválja. (1) Valószínűtlen, hogy a 10 perces ET-1 infúzió befolyásolta volna a Nox4 expresszióját, az akut válasz a Nox2 mellett szól. (2) A ROS detektálására használt módszer - a dihidroetidium etidiummá történő ROS-függő oxidációja - a szuperoxid termelésről ad alapvetően felvilágosítást (Sovershaev és mtsai, 2006), a Nox4-függő hidrogén-peroxid produkció kimutatására nem alkalmas. (3) Az általunk használt NAD(P)H-oxidáz gátló apocynin a citoszólban található $p47^{phox}$ és $p67^{phox}$ alegységek transzlokációját akadályozza meg (Stolk és mtsai, 1994), mely folyamat nem játszik szerepet a Nox4 aktivációjában.

6. kérdés

Bírálóm következő felvetése arra vonatkozott, hogy az általunk vizsgált kardiokinek miként hathatnak vajon a kontraktilitásra szívelégtelenségben, az arra jellemző társbetegségek jelenlétében. A transzlációs kutatások egyik fő gyengesége, hogy jelenleg a kísérletes eredmények túlzottan “steril” körülmények között születnek. Egészséges, fiatal állatokban hozunk létre szívinfarktust, vagy váltunk ki hipertóniát, azonban csak nagyritkán kombináljuk ezeket az állapotokat, még ritkábban alakítunk ki olyan modelleket, amikor a kísérleti egyedek diabéteszesek és/vagy hiperlipidémiások is párhuzamosan. Nincs tudomásom arról, hogy az általunk vizsgált kardiokinek kontraktilitásra gyakorolt közvetlen hatását ilyen komplex modellekben tanulmányozták volna, a jövőben tervezzük munkánk ilyen irányú kiterjesztését. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az első humán klinikai vizsgálatok során, változatos etiológiájú krónikus szívelégtelen betegekben, a jelenleg elérhető optimális gyógyszeres kezelés mellett, az AM illetve az apelin akut intravénás infúziója kedvező hemodinamikai változásokat hozott létre, melyek összevethetőek voltak az egészséges kontrollok esetében nyert válaszokkal (Nagaya és mtsai, 2000; Japp és mtsai, 2010; Barnes és mtsai, 2013). Ezen kis esetszámú klinikai tanulmányok eredményei arra engednek következtetni, hogy a valós életben, a fent említettet társbetegségek valószínűsíthető jelenlétében, ezen kardiokinek hatása megtartott.

7. kérdés

Opponensem utolsó kérdése megegyezett az általános értékelése kapcsán tett 2. megjegyzésével, melyre fent igyekeztem kielégítő választ adni.

Végezetül még egyszer köszönöm Ferdinandy Péter Professzor Úr bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

2014. 07. 22.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Szokodi István
doktorjelölt

Referenciák

Abrahams W. Progress in clinical trials: ENCOR. *Clin Cardiol*. 2001; 24: 481-3.

Adlbrecht C, Hulsmann M, Strunk G, Berger R, Mortl D, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Jakowitsch J, Maurer G, Lang IM, Pacher R. Prognostic value of plasma midregional pro-adrenomedullin and C-terminal-pro-endothelin-1 in chronic heart failure outpatients. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11: 361-6.

Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ, Veitch S, Jeong H, White A, Cruden NL, Huson L, Japp AG, Newby DE. Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2013; 6: 482-91.

Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2006; 111: 508-31.

Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res*. 2012; 111: 1091-1106.

Charo DN, Ho M, Fajardo G, Kawana M, Kundu RK, Sheikh AY, Finsterbach TP, Leeper NJ, Ernst KV, Chen MM, Ho YD, Chun HJ, Bernstein D, Ashley EA, Quertermous T. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1904-13.

Davis J, Westfall MV, Townsend D, Blankinship M, Herron TJ, Guerrero-Serna G, Wang W, Devaney E, Metzger JM. Designing heart performance by gene transfer. *Physiol Rev*. 2008; 88: 1567-651.

Dieplinger B, Gegenhuber A, Struck J, Poelz W, Langsteger W, Haltmayer M, Mueller T. Chromogranin A and C-terminal endothelin-1 precursor fragment add independent prognostic information to amino-terminal proBNP in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Chim Acta*. 2009; 400: 91-6.

Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*. 2006; 71: 289-99.

Guzman RJ, Lemarchand P, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res*. 1993; 73: 1202-7.

Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41: 798-806.

Jankowska EA, Filippatos GS, von Haehling S, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Cicoira M, Schefold JC, Rozentryt P, Ponikowska B, Doehner W, Banasiak W, Hartmann O, Struck J, Bergmann A, Anker SD, Ponikowski P. Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PLoS One*. 2011; 6: e14506.

Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, Newby DE. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2010; 121: 1818-27.

Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation*. 1995; 92: 286-9.

Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Liebbrandt A, Makovic M, Scwaighofer J, Beetz N, Musialek R, Neely G, Komnenovic V, Kolm U, Metzler B, Ricci R, Hara H, Meixner A, Nghiem M, Chen X,Dawood F, Wong KM, Sarao R, Cukerman E, Kimura A, Hein L, Thalhammer J, Liu PP, Penninger JM. Impaired heart contractility in apelin gene deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res*. 2007; 101: e32-42.

Lassus J, Gayat E, Mueller C, Peacock WF, Spinar J, Harjola VP, van Kimmenade R, Pathak A, Mueller T, Disomma S, Metra M, Pascual-Figal D, Laribi S, Logeart D, Nouira S, Sato N, Potocki M, Parenica J, Collet C, Cohen-Solal A, Januzzi JL Jr, Mebazaa A; GREAT-Network. Incremental value of biomarkers to clinical variables for mortality prediction in acutely decompensated heart failure: The Multinational Observational Cohort on Acute Heart Failure (MOCA) study. *Int J Cardiol*. 2013; 168: 2186-94.

Lüscher TF, Enseleit F, Pacher R, Mitrovic V, Schulze MR, Willenbrock R, Dietz R, Rousson V, Hürlimann D, Philipp S, Notter T, Noll G, Ruschitzka F. Hemodynamic and neurohumoral effects of selective endothelin A (ET_A) receptor blockade in chronic heart failure: the Heart Failure ET_A Receptor Blockade Trial (HEAT). *Circulation*. 2002; 106: 2666-72.

Maisel A, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Landsberg JW, Ponikowski P, Mockel M, Hogan C, Wu AH, Richards M, Clopton P, Filippatos GS, Di Somma S, Anand I, Ng L, Daniels LB, Neath SX, Christenson R, Potocki M, McCord J, Terracciano G, Kremastinos D, Hartmann O, von Haehling S, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-region pro-hormone markers for diagnosis and prognosis in acute dyspnea: results from the BACH (Biomarkers in Acute Heart Failure) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55: 2062-76.

Masson S, Latini R, Carbonieri E, Moretti L, Rossi MG, Ciricugno S, Milani V, Marchioli R, Struck J, Bergmann A, Maggioni AP, Tognoni G, Tavazzi L; GISSI-HF Investigators. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Eur J Heart Fail*. 2010; 12: 338-47.

McClellan G, Weisberg A, Winegrad S. Effect of endothelin-1 on actomysin ATPase activity: implications for the efficiency of contraction. *Circ Res*. 1996; 78: 1044-50.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012; 33: 1787-847.

Mylona P, Cleland JG. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure: Cardio-net Editorial Team. *Eur J Heart Fail*. 1999; 1: 197-200.

Nagaya N, Goto Y, Satoh T, Sumida H, Kojima S, Miyatake K, Kangawa K. Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39: 754-60.

Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura K. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: R1432-7.

Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2000; 101: 498-503.

Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkentin JD. Ca^{2+}- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. J Clin Invest. 2007; 117: 2431-44.

Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation*. 2004; 109: 1789-94.

Packer M, McMurray J, Massie BM, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Rizzon P, Soler J, Swedberg K, Anderson S, Demets DL. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: results of a pilot study. *J Card Fail*. 2005; 11: 12-20.

Quiñones MJ, Leor J, Kloner RA, Ito M, Patterson M, Witke WF, Kedes L. Avoidance of immune response prolongs expression of genes delivered to the adult rat myocardium by replication-defective adenovirus. *Circulation*. 1996; 94: 1394-401.

Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Omland T, Sloan S, Jarolim P, Solomon SD, Pfeffer MA, Braunwald E. Evaluation of multiple biomarkers of cardiovascular stress for risk prediction and guiding medical therapy in patients with stable coronary disease. *Circulation*. 2012; 125: 233-40.

Serpi R, Tolonen AM, Huusko J, Rysä J, Tenhunen O, Ylä-Herttuala S, Ruskoaho H. Vascular endothelial growth factor-B gene transfer prevents angiotensin II-induced diastolic dysfunction via proliferation and capillary dilatation in rats. *Cardiovasc Res*. 2011; 89: 204-13.

Siddiquee K, Hampton J, Khan S, Zadory D, Gleaves L, Vaughan DE, Smith LH. Apelin protects against angiotensin II-induced cardiovascular fibrosis and decreases plasminogen activator inhibitor type-1 production. *J Hypertens*. 2011; 29: 724-31.

Sovershaev MA, Egorina EM, Andreasen TV, Jonassen AK, Ytrehus K. Preconditioning by 17beta-estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H1554-62.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1994; 11: 95-102.

Szokodi I, Piuhola J, Ruskoaho H. Endothelin receptor blockade and exacerbation of heart failure. *Circulation*. 2003; 107: e211.

Szokodi I, Ruskoaho H. Adrenomedullin. In: Cardiovascular hormone systems: from molecular mechanisms to novel therapeutics, ed. Bader M, Wiley-VCHVerlag Gmbh, Weinheim, Germany, 2008, 168-91.

Takeuchi Y, Kihara Y, Inagaki K, Yoneda T, Sasayama S. Endothelin-1 has a unique oxygen-saving effect by increasing contractile efficiency in the isolated rat heart. *Circulation*. 2001; 103: 1557-63.

von Haehling S, Filippatos GS, Papassotiriou J, Cicoira M, Jankowska EA, Doehner W, Rozentryt P, Vassanelli C, Struck J, Banasiak W, Ponikowski P, Kremastinos D, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-regional pro-adrenomedullin as a novel predictor of mortality in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2010; 12: 484-91.

Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyeyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandalam V, Penninger JM, Kassiri Z, Vederas JC, Murray AG, Oudit GY. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000249.

WRITING COMMITTEE MEMBERS, Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013; 128: e240-327.

Zhang H, Chen X, Gao E, MacDonnell SM, Wang W, Kolpakov M, Nakayama H, Zhang X, Jaleel N, Harris DM, Li Y, Tang M, Berretta R, Leri A, Kajstura J, Sabri A, Koch WJ, Molkentin JD, Houser SR. Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circ Res*. 2010; 107: 800-9.

Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation*. 2006; 114: 830-7.