

A ghrelin kardiovaszkuláris hatásai

Doktori értekezés

Dr. Sax Balázs

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Kékesi Violetta egyetemi docens, Ph.D.
- Hivatalos bírálók: Dr. Végh Ágnes egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Tóth-Heyn Péter egyetemi adjunktus, Ph.D.
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. de Châtel Rudolf egyetemi tanár, D.Sc.
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szokodi István egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Palik Éva egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2	BEVEZETÉS	7
2.1	A GHRELIN.....	7
2.1.1	A ghrelin termelődése és lebomlása.....	7
2.1.2	Ghrelin receptorok.....	10
2.1.3	A ghrelin növekedésre és proliferációra kifejtett hatásai	13
2.1.4	A ghrelin metabolikus hatásai	14
2.1.5	A ghrelin ép keringésre gyakorolt hatásai	15
2.1.6	A ghrelin hatásai ischaemiás szívbetegségben.....	15
2.1.7	A ghrelin hatásai szívelégtelenségben.....	16
2.1.8	A ghrelin direkt érhatásai	18
2.2	A PERIKARDIÁLIS FLUIDUM.....	21
3	CÉLKITŰZÉSEK	24
4	MÓDSZEREK	25
4.1	HUMÁN PERIKARDIÁLIS VIZSGÁLAT	25
4.1.1	Betegcsoportok és mintavétel.....	25
4.1.2	Biokémiai mérések	27
4.1.3	Echokardiográfia	27
4.2	<i>IN VITRO</i> KORONÁRIA ARTERIOLA VIZSGÁLATOK.....	28
4.2.1	Western blot	28
4.2.2	Immunhisztokémia	29
4.2.3	Izolált koronária arteriolák: preparátum és protokoll.....	29
4.3	SZÍVELÉGTELENSÉG <i>IN VIVO</i> NAGYÁLLATMODELLJE	33
4.3.1	A modell létrehozása	33
4.3.2	Echokardiográfias mérések	33

4.3.3	Biokémiai mérések	34
4.4	STATISZTIKAI ANALÍZIS	35
5	EREDMÉNYEK	36
5.1	HUMÁN PERIKARDIÁLIS VIZSGÁLAT	36
5.1.1	Metabolikus paraméterek	36
5.1.2	Echokardiográfias paraméterek	37
5.1.3	Ghrelinkoncentráció a plazmában és a perikardiális fluidumban	38
5.1.4	A perikardiális és plazma ghrelin koncentrációk korrelációja metabolikus paraméterekkel	40
5.1.5	A perikardiális és plazma ghrelin koncentrációk korrelációja echokardiográfias paraméterekkel	41
5.2	<i>IN VITRO</i> VIZSGÁLATOK.....	42
5.2.1	Az anti-humán GHS-R antitestek validálása kutya szöveteken	42
5.2.2	A GHS-R altípusok lokalizációja a szívben	43
5.2.3	A ghrelin hatásai izolált kutya koronária arteriolán	45
5.3	SZÍVELÉGTÉLEN NAGYÁLLATMODELL EREDMÉNYEI	47
5.3.1	A szívelégtelenség kialakulásának echokardiográfias jelei.....	47
5.3.2	Ghrelin és proANP változása a szívelégtelenség kialakulása során.....	48
5.3.3	A ghrelin és proANP korrelációja echokardiográfias paraméterekkel.....	49
6	MEGBESZÉLÉS.....	51
7	KÖVETKEZTETÉSEK	61
8	ÖSSZEFOGLALÁS	62
9	SUMMARY	63
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	64
11	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	82
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	83

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH	mellékvesekéreg stimuláló hormon
AMPK	adenozin-monofoszfát által aktivált protein kináz
ANP	pitvari nátriuretikus peptid
APT-1	acil-protein thioészteráz 1
Arg	arginin
AV	atrioventrikuláris
bFGF	alap fibroblaszt növekedési faktor
BMI	testtömeg-index (kg/m^2)
BNP	agyi nátriuretikus peptid
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CREB	cAMP-reszponzív elemet kötő fehérje
CRH	kortikotróp serkentő hormon
DAG	diacil-glicerol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EF	ejekciós frakció
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
ERK	extracelluláris jel által szabályozott kináz
ET-1	endotelin-1
FSH	follikulus stimuláló hormon
GH	növekedési hormon
GHR	ghrelin
GHS	növekedési hormon elválasztását serkentő molekula
GHS-R	növekedési hormon elválasztását serkentő receptor
GHS-R1a	növekedési hormon elválasztását serkentő receptor 1a altípus
GHS-R1b	növekedési hormon elválasztását serkentő receptor 1b altípus
Gln	glutamin
GOAT	ghrelin O-aciltranszferáz enzim
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
HOMA-A	homeostatic model assessment A index (más néven HOMA-IR)
HRP	tormaperoxidáz

IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor 1
IP ₃	inozitol-trifoszfát
ISCH	ischaemiás betegcsoport
KIU	kallikrein inhibitor egység
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
Leu	leucin
LH	luteinizáló hormon
LVEDD	bal kamrai végdiasztolés átmérő
LVESD	bal kamrai végszisztolés átmérő
LVM	bal kamrai izomtömeg
Lys	lizin
MAP	artériás középnyomás
mRNS	messenger ribonukleinsav
nKR	normál Krebs-Ringer oldat
NEP	neutrális endopeptidáz
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NTS-R1	neurotenzin receptor 1
NYHA	New York Heart Association klasszifikáció
Phe	fenil-alanin
PKC	foszfokináz C enzim
PLC	foszfolipáz C enzim
PRL	prolaktin
PVFD	polivinil-difluorid
PWT	hátsó fal vastagsága
RIA	radioimmunassay
S.E.M.	az átlag szórása
Ser	szerin aminosav
SGOT	szérum glutamin-aminotranszferáz szint
SRE	szérum reszponzív elem
SWT	szeptumvastagság
TAPSE	tricuspidalis annulus síkjának szisztolés kitérése

TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta
TM	transzmembrán
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
Trp	triptofán
TSH	pajzsmirigy stimuláló hormon
TTX	tetrodotoxin
TXA ₂	tromboxán A ₂
VEGF	érendotél-növekedési faktor
VHD	billentyűbeteg csoport

2 BEVEZETÉS

A szervezet működésének peptiderg szabályozórendszerei – a purinerg és adrenerg mechanizmusok feltérképezésével párhuzamosan – az 1950-es évektől kezdve egyre inkább az élettani és kórélettani kutatások előterébe kerültek. Az elsőként felismert és szintetizált oxitocin és inzulin után számos peptid természetű hormon élettani hatásának feltérképezése megtörtént.

A szív fiziológias működését, kórfolyamatait, szerkezeti átalakulását mai ismereteink szerint egy sor szíveredetű (például a pitvari nátriuretikus peptid), valamint szívben is termelődő, ubikviter peptid – például az agyi nátriuretikus peptid (BNP), az angiotenzin II vagy az endotelin-1 – befolyásolja. A fentiekén túl a közelmúltban több, elsősorban más szervrendszerekben termelődő peptid hormonnól bizonyosodott be, hogy a szív működést is befolyásolja, erre példa a relaxin vagy a ghrelin is.

A jelen dolgozatban foglalt vizsgálatok eredményei a korábban elsősorban gasztrointesztinális hormonnként számon tartott ghrelin szív- és érrendszeri szabályzásban betöltött szerepével kapcsolatos ismereteket kívánják bővíteni.

2.1 A GHRELIN

A ghrelin (GHR) peptid természetű endokrin szabályozó ágens. A hormont 1999-ben fedezte fel Kojima munkacsoportja [1]. Vizsgálataik során az addig árva receptorként nyilvántartott növekedési hormon elválasztását serkentő receptor (GHS-R) endogén ligandjaként azonosították a potens növekedési hormon elválasztó hatással rendelkező ghrelint patkány gyomornyálkahártya-homogenizátumból. A peptidet a proto-indoeurópai nyelv „növekedés” (*ghre*) szótöve után nevezték el ghrelinnek.

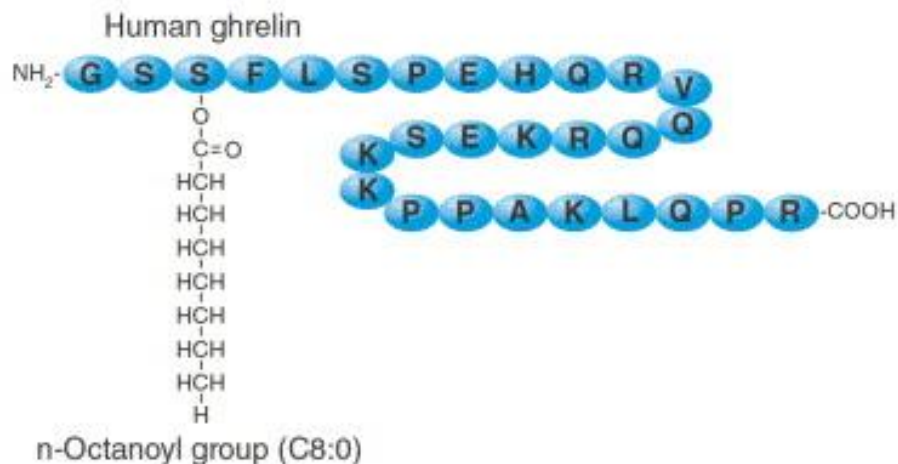
2.1.1 A ghrelin termelődése és lebomlása

A 28 aminosavból álló peptid elsősorban a gyomornyálkahártya X/A típusú oxintikus mirigysejtjeiben termelődik, kisebb részben a gasztrointesztinális rendszer egyéb szakaszai is termelik. A közelmúltban a fentiekén túl számos egyéb szervben és szövetben azonosították a ghrelin mRNS-ét vagy magát a peptidet (1. táblázat). Többek között a tüdő, a hasnyálmirigy, a vese, a máj, a lép, valamint a szívizom, az erek simaizomszöve és endotéliuma is termel ghrelint [2, 3].

A pre-pro-ghrelin gén mRNS-ének a ghrelinen kívül több hasítási terméke is létezik, például a 27 aminosavat tartalmazó dez-Gln¹⁴-ghrelin, amely a ghrelinhez hasonló mértékben aktiválja a ghrelinreceptort [4].

A ghrelin sajátossága, hogy – egyedülként az eddig ismert peptidok között – aktív formájában a harmadik szerin aminosav acilált, egy oktanoil csoportot tartalmaz (1. ábra). A ghrelin receptor másik endogén ligandja, a dez-Gln¹⁴-ghrelin szintén tartalmaz oktanoil csoportot a Ser³ pozícióban. Az n-oktanoilálást a ghrelin O-aciltranszferáz (GOAT) enzim végzi [5]. A GOAT enzim elsősorban a gasztrointesztinális rendszerben (gyomor, duodenum, jejunum, ileum, colon) és a hipofízisben mutatható ki, azonban számos más humán szövetben és szervben is termelődik, például a mellékvesekéregben, vesében, májban, tüdőben is [6]. A GOAT működését negatív visszacsatolásként maga az oktanoilált peptid is gátolhatja [7]. A humán szívizomsejtek nem csak a ghrelint, mindkét ghrelin receptor altípust, hanem a GOAT enzimet is expresszálják, ami a szívizomban működő, autokrin vagy parakrin módon ható, önálló ghrelin rendszer lehetőségét veti fel [2, 6, 8].

Az acilált ghrelin a plazmában gyorsan dezacilálódik, amely folyamatot az acil-protein thioészteráz 1 (APT-1) enzim katalizálja [9]. Az exogén acilált ghrelin féléletideje a plazmában körülbelül 30 perc, ezért a plazmában keringő ghrelin legnagyobb részben dezacilált formában van jelen [10, 11].



Current Opinion in Pharmacology

1. ÁBRA Az aktív ghrelin molekula a 3. szerin aminosavon oktanoil csoporttal. (Forrás: Kojima et al. 2002 [12])

Vizsgált szerv/szövet	Ghrelin mRNS kópia/RNS tömeg	GHS-R1a mRNS kópia/RNS tömeg	GHS-R1b mRNS kópia/RNS tömeg
Gyomor fundus	10^7	-	10^5
Jejunum	10^6	-	1
Duodenum	10^6	-	10^6
Gyomor antrum	5×10^5	-	10^3
Tüdő	10^5	-	10^6
Pancreas	5×10^4	10^4	10^6
Vénafal	5×10^4	-	5×10^2
Epehólyag	5×10^4	-	10^5
Nyirokcsomó	5×10^4	-	10^5
Bal colonfél	5×10^4	-	10^2
Nyelőcső	5×10^4	-	1
Hipofízis	10^4	10^5	10^7
Vese	10^4	-	10^4
Ovárium	10^4	-	10^2
Ileum	5×10^3	-	10^6
Máj	5×10^3	-	10^6
Lép	5×10^3	10^4	10^6
Here	5×10^3	-	10^2
Zsír szövet	10^3	-	50
Placenta	10^2	-	10^6
Mellékvese	10^2	10^3	10^5
Vázizom	50	-	10^2
Pajzsmirigy	10	5×10^4	10^6
Pitvari szívizom	10	-	5×10^4
Kamrai szívizom	10	10^3	10^7
Bőr	1	-	10^7

1. TÁBLÁZAT A ghrelin és a ghrelin receptorok expressziójának előfordulása (Gnanapavan 2002-es ábrái alapján, kerekített értékek [8])

2.1.2 Ghrelin receptorok

A ghrelin a növekedési hormon elválasztását serkentő (GHS-R) receptor endogén ligandja. Jelen ismereteink szerint a ghrelin receptorának két altípusa létezik, mindkettő ugyanazon gén különböző hasítási terméke. A 366 aminosavból álló GHS-R1a altípus hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérjéhez kapcsolt receptor. Ez a klasszikus ghrelin receptor, amely a ghrelin jelenleg ismert legtöbb biológiai hatását közvetíti. A receptor jelentős konstitutív aktivitással rendelkezik, amelyet az inverz agonistája, a D-Arg¹-D-Phe⁵-D-Trp^{7,9}-Leu¹¹-P-anyag gátolni képes [13].

A 298 aminosavból álló növekedési hormon szekretagóg receptor 1b (GHS-R1b) a receptor génjének rövidebb terméke. Öt transzmembrán doménnel rendelkezik, jelátviteli mechanizmusa szintén G-fehérjéhez kapcsolt. Az 1b receptor altípus fiziológiai jelentősége ez idáig nem ismert. Feltételezések szerint heterodimereket képezhet az 1a altípussal, csökkentve ezzel a GHS-R1a konstitutív aktivitását [14].

A két receptoron kívül egyéb receptortípusokról is feltételezik, hogy szerepet játszhatnak a ghrelin hatásainak közvetítésében. Bár közvetlen bizonyíték a ghrelin jelátvitelében betöltött szerepére nincs, egy ghrelin analóggal, a hexarelinnel végzett vizsgálat alapján a koronária perfúziót csökkentő hatást patkány szíven a CD36 scavenger receptor közvetíti [15].

Létezhet ez idáig ismeretlen – a felderített jelátviteli utak alapján akár több – GHS-R altípus is (GHS-Rx) [16]. Ezt támasztják alá azok a vizsgálatok, amelyek alapján a ghrelinnek több hatása is bizonyítottan nem a GHS-R1a receptoron keresztül jön létre. A ghrelin és analógjai antagonizálni képesek az izoproterenol okozta lipolízist patkány zsírszöveteken, illetve gátolják az apoptózist GHS-R1a mRNS-t nem expresszáló patkány szívizom sejtvonalakon is [17, 18]. Izolált tengerimalac és patkány papilláris izmon a ghrelin és analógjai által kifejtett negatív inotróp hatás szintén nem a GHS-R1 receptoron keresztül valósul meg [19, 20]. A ghrelin ismert és feltételezett receptorait a 2. táblázat foglalja össze (Muccioli és munkatársai munkája alapján [14]).

A GHS-R1a receptor széleskörű biológiai hatásaihoz és jelentőségéhez képest viszonylag kevés szervben expresszálódik. Gnanapavan és munkatársai a számos vizsgált szerv közül csak a pancreasban, a hipofízisben, a lépben, a mellékvesében, a pajzsmirigyben és a szívizomban találták meg a receptor mRNS-ét patkányban. Bár a ghrelin számos gasztrointesztinális hatása GHS-R1a receptorfüggő, feltételezhető, hogy

a receptor a központi idegrendszerben közvetíti a hatást, és az ingerület a vegetatív idegrendszeren keresztül továbbítódik a periféria felé.

A GHS-R1b receptor – csak úgy, mint maga a ghrelin – szinte minden szervben expresszálódik, a gasztrointesztinális rendszer számos részén kívül többek között az agyban, a tüdőben, zsírszövetben, valamint a szívizomszövetben és az érsimaizomban is. Amíg a GHS-R1a receptor alacsonyabb kópiaszámban, az ismeretlen funkciójú GHS-R1b a hipofízis és a bőr mellett a vizsgált szövetek közül a legnagyobb kópiaszámban a szívizomban fordul elő (1. táblázat, [8]). Ezen tény jelentősége egyelőre nem ismert, azonban nem zárható ki, hogy a receptor szereppel bírhat a kardiovaszkuláris szabályozásban.

Típus és jellemzők	Ligandok	Jelátvitel
GHS-R1a - 7 TM domén - 366 aminosav - konstitutív aktivitás - homo- és hetero-dimerizáció G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal	Agonisták: - ghrelin, rövid ghrelin-fragmentumok, szintetikus GHS-ek - parciális peptid és non-peptid növekedési hormon elválasztását fokozó hormonok (GHS) Parciális agonista: - adenozin [21, 22] Antagonisták: - D-Lys ³ -GHRP-6 [23] - cortistatin és oktapeptid analógja [24] izoxazol, diaminopirimidin és triazol származékok [25-27] Inverz agonista: - D-Arg ¹ -D-Phe ⁵ -D-Trp ^{7,9} -Leu ¹¹ -P-anyag [13]	G α_p -> Ca ²⁺ , PLC, IP3, DAG, PKC [28, 29] - ERK 1/2, CREB, SRE [13] - K ⁺ -csatorna blokad [30] - cAMP szint növekedése [31] - AMPK indukálta Ca ²⁺ -jel [32], heterodimerizáció GHRH és D1 receptorokkal [33, 34] ismeretlen
GHS-R1b - 5 TM domén - 298 aminosav - heterodimerizáció G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal	Agonista: - neuromedin az NTS-R1 receptorral képzett heterodimer esetén [35]	Heterodimer képzés GHS-R1a és NTS-R1 receptorokkal [35, 36]
GHS-Rx_a ismeretlen	Agonista: - ghrelin - dezacil-ghrelin - szintetikus GHS-ek [17-19, 37, 38]	cAMP/PKA, PI ₃ K/AKT, ERK 1/2 [18, 37, 38]
GHS-Rx_b ismeretlen	Agonista: - dezacil-ghrelin [39-41]	ismeretlen
CD36 - scavenger receptor - B osztályú glikoprotein - 2 TM domén - 471 aminosav	Agonista: - oxidált LDL [42] Agonista vagy antagonisták: - hexarelin (szintetikus GHS) [15, 43]	- oxidált LDL felvétele [42] - ismeretlen egyéb mechanizmus

2. TÁBLÁZAT Összefoglaló ábra a bizonyított és feltételezett ghrelin receptorokról Muccioli és munkatársai táblázata alapján [14]

2.1.3 A ghrelin növekedésre és proliferációra kifejtett hatásai

A ghrelin elsőként felfedezett hatása a növekedési hormon elválasztásának fokozása volt. Mind állatkísérletes, mind egészséges önkénteseken végzett vizsgálatok alapján a szervezetbe bevitt exogén ghrelin szignifikánsan megnöveli a növekedési hormon keringésben mérhető szintjét [44-46]. Takaya és munkatársai által végzett vizsgálatokban az egészséges fiatal férfiaknak beadott ghrelin nem csak a növekedési hormon szérumszintjét emelte meg, de szignifikáns növekedést figyeltek meg az ACTH, kortizol és prolaktin koncentrációjában is, míg a TSH, LH és FSH szintje változatlan maradt. A ghrelin növekedésre gyakorolt hatása már az élet első évében is jelentős: csecsemőktől vett vérmintákban a ghrelinszint szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az életkorral, a testhosszal, testsúllyal és fejkörfogattal [47].

Izolált sejtvonalakon végzett vizsgálatok alapján a ghrelin ugyanakkor számos szövetben a növekedési hormon elválasztásától függetlenül is proliferációt okoz, többek között adipocytá, osteblast, és humán mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtvonalon [48-50]. Emberi hasnyálmirigyből izolált szigetsejteken mind az acilált ghrelin, mind a dezacilált forma proliferációs és antiapoptotikus hatással bír [37]. Egér mioblaszt sejtvonalon a ghrelin serkenti az izomsejtek fejlődését és érését is [51]. Mind a ghrelin, mind a peptid dezacilált formája proliferációs hatással bír *in vitro* gyomordaganat sejteken [52]. A ghrelin a szívben angiogenetikus és szívizomsejteken proliferációs hatással is bír, ennek részleteit a kardiovaszkuláris hatásokról szóló fejezetben ismertetem.

2.1.4 A ghrelin metabolikus hatásai

A ghrelin igen potens orexigén peptid. Az exogén ghrelin mind állatkísérletekben, mind egészséges önkénteseken végzett vizsgálatokban fokozta a táplálékfelvételt [53, 54], a gyomorsav-szekrúciót [55], valamint a gasztrointesztinális motilitást [56]. A peptid plazmakoncentrációja étkezések előtt a legmagasabb, és táplálékbevitel után csökkent mutat [57]. A ghrelin negatív korrelációt mutat a testtömeg-indexszel, ami egy idáig közelebről nem tisztázott negatív visszacsatolási szabályzásra utalhat [58]. Különböző okból kialakult cachexiában és anorexia nervosában a ghrelin szint megemelkedik [59-61]. Ugyancsak magas ghrelin szint mérhető az alacsonynövésű, fokozott étvágyal és következményes elhízással járó Prader-Willi szindrómában: a szintén elhízott kontrollcsoporthoz képest is háromszorosan emelkedett ghrelinszintet írtak le, amely még a kontrollcsoport 36 órás éhhomi állapotában mért plazmakoncentrációt is meghaladta [62].

A ghrelin terápiás felhasználásának egyik iránya éppen az orexigén hatás kihasználása lehet: daganatos betegeknél a ghrelin fokozza az étvágyat és a kalóriabevitelt; cachexiás, szívelégtelen betegeknél pedig a szív pumpafunkciójának javításán túl a ghrelin adása javította az izomerőt és növelte a száraz testtömeget [63, 64]. Egy kis esetszámú, anorexia nervosában szenvedő betegeken végzett vizsgálatban a ghrelin csökkentette az epigasztriális diszkomfortot és a székrekedést, javította az étvágyat, és 12-36%-kal növelte a napi energiabevitelt [65].

Másfelől az acilált ghrelin szint mesterséges csökkentése (például ghrelin ellenes antitesttel vagy a GOAT enzim gátlása által) elméletileg a táplálékfelvétel csökkentéséhez, ezáltal az elhízás csökkentéséhez vezethetne. A ghrelin rendszer gátlására irányuló vizsgálatok azonban ez idáig nem eredményezték a várt sikert [66].

A ghrelin jelentős kétirányú kölcsönhatásban áll a szénhidrát-háztartással. A ghrelin megemeli a vércukorszintet [67], és a hasnyálmirigyben stimulálja a glukagon szekrúcióját [68]. Egészséges önkéntesekben az exogén ghrelin csökkenti a glukózinfúzió által kiváltott inzulinszekrúciót [69]. Részben ez a hatás magyarázhatja, hogy a szérum ghrelin szint irodalmi adatok szerint negatív összefüggést mutat az inzulinszinttel felnőtteknél és csecsemőknél egyaránt, valamint pozitívan korrelál az inzulinérzékenységgel [47, 70]. Ugyanakkor egészséges önkéntesekben az intravénásan bevitt inzulin is csökkenti a ghrelin koncentrációt [71].

2.1.5 A ghrelin ép keringésre gyakorolt hatásai

A peptid igen széleskörű, a növekedési hormon elválasztásának serkentésétől független kardiovaszkuláris hatásokkal rendelkezik. Egészséges önkéntesekben a ghrelin intravénás bolusban adva csökkenti a szisztémás vérnyomást, növeli a pulzustérfogatot és a szívindexet a szívfrekvencia szignifikáns változtatása nélkül [46]. A vérnyomáscsökkentő hatás – legalábbis részben – központi idegrendszeri mechanizmuson, a nucleus tractus solitariin keresztül jön létre [72]. Éber nyulakon végzett vizsgálatokban az intravénás ghrelin bolus a renális szimpatikus aktivitás változása nélkül csökkentette a vérnyomást, míg közvetlenül az agykamrába injektált ghrelin mind a vérnyomást, mind a vese szimpatikus beidegzésének aktivitását csökkentette, valamint megnövelte a baroreflex érzékenységét [73]. Mindezen hatások a növekedési hormon elválasztásának serkentésétől független hatásoknak bizonyultak.

2.1.6 A ghrelin hatásai ischaemiás szívbetegségben

A ghrelin számos kardioprotektív hatással is rendelkezik. Ischaemia-reperfúziós kísérletekben és izoproterenol okozta szívizom-ischaemia modellben a ghrelin csökkentette az infarktusméretet, gyulladáscsökkentő hatásokon és a szimpatikus aktivitás csökkentésén keresztül gátolta a korai szívizom-remodellinget [74-77]. Állatkísérletben a bal koronáriarendszer lekötésével létrehozott infarktust követően 30 percen belül adott egyetlen dózis ghrelin képes a mortalitást a felére csökkenteni, a szimpatikus aktivitást akutan és krónikusan is csökkenteni, valamint az ejekciós frakció jelentős romlását megakadályozni [78].

Mind a ghrelin, mind a dezacil-ghrelin a GHS-R1a receptortól független jelátvitellel gátolja a szívizomsejtek és az endotélsejtek apoptózisát [18]. A ghrelin és szintetikus analógja, a hexarelin kardiomiocita sejtvonalon proliferációt serkentő hatással bír, amely szintén független a GHS-R1a receptortól [79]. Mindezen túl a peptid serkenti a patkányszívből izolált mikrovaszkuláris endotélsejtek proliferációját és migrációját, ezáltal *in vitro* kísérletben angiogenezist hozott létre, amely GHS-R1a receptortól függőnek bizonyult [80]. Egy közelmúltban publikált kísérlet eredménye alapján az angiogenetikus hatás *in vivo* is létrejön: posztinfarktusos patkányoknál négy hetes ghrelinkezelést követően az infarktusos és periinfarktusos szívizomzónákban fokozott érképződés, illetve VEGF expresszió észlelhető [81]. A krónikus ghrelinkezelés

posztinfarktusos patkányokban csökkenti a szívizom kamrai ritmuszavarok iránti érzékenységét [82]. Ezen antiaritmiás hatást legvalószínűbben a nervus vagus közvetíti [83].

A ghrelin és GHS-R1a rendszer jelentős kardiovaszkuláris hatásait támasztja alá az a tanulmány, amely a peptid és a receptor genetikai variánsainak összefüggését vizsgálta a szívinfarktus és a koronáriabetegség kialakulási valószínűségével. A ghrelin genetikai variánsai nem, azonban a GHS-R1a receptor egyes SNP variációi növelhetik a kardiovaszkuláris események kockázatát (noha a mutáns receptorok funkcionalitását nem vizsgálták) [84].

A keringő ghrelinszint több tanulmány szerint is megváltozik ischaemiás szívbetegségben. Angiográfiával igazolt koronáriabetegeknél a negatív koronarogrammal rendelkező kontrollokhoz képest szignifikánsan alacsonyabb plazma ghrelinszint mérhető. Akut koronária szindrómával kezelt betegeknél a ghrelinszint még a tünetmentes koronáriabetegekhez képest is alacsonyabb [85]. Hasonló eredményre jutott egy kínai munkacsoport is mind normál szénhidrát-háztartással rendelkező betegek, mind cukorbeteg körében. A ghrelinszint eredményeik szerint nem csak a koronáriabetegség súlyosságával (a legalacsonyabb szint akut szívinfarktusban mérhető), hanem a koronárialézió komplexitásával is negatív korrelációt mutatott [86, 87]. Egy közelmúltban végzett magyar vizsgálat korábban szívizominfarktuson átesett betegeknél a kontrollcsoporthoz képest alacsonyabb szérum ghrelin koncentrációt talált, amely a TNF α -val együtt prediktív értékű lehet az atherosclerosis kialakulásában [88]. A fenti eredmények alapján tehát az alacsony ghrelinszint magasabb kardiovaszkuláris kockázattal járhat együtt.

2.1.7 A ghrelin hatásai szívelégtelenségben

A ghrelin és a szívelégtelenség kapcsolatáról ezidáig kevés adattal rendelkezünk. Terminális szívelégtelenségben szenvedő, szívtranszplantációra kerülő betegek explantált szívéből vett mintákban alacsony ghrelinexpressziót és a GHS-R1a receptor expressziójának jelentős, mintegy kompenzatórikus növekedését írták le egészséges szívű kontrollokhoz képest [89]. Lund és munkacsoportjának eredményei alapján terminális szívelégtelenségben a keringő ghrelin szintje megemelkedik, majd transzplantációt követően normalizálódik, azonban ezt éppen ellentétes táplálékbeviteli

mintázat követi, azaz a magas ghrelinszint ellenére csökkent táplálékfelvétel észlelhető szívelégtelen betegeknél. A jelenség egyik lehetséges oka a szívelégtelenség alatt létrejövő „ghrelinrezisztencia”, és ennek oldódása a szívtranszplantációt követően [90]. Szívelégtelenség koronária ligatúrával kiváltott patkánymodelljében a három hetes ghrelinkezelés növelte a szívindexet, a bal kamrai kontraktilitást és a frakcionális hossz tengelyi rövidülést, valamint javította a szívelégtelenség kialakulásával együtt járó kardiális cachexiát [91].

Szívelégtelen betegekben bolus ghrelin adása a szívfrekvencia növelése nélkül csökkentette a vérnyomást, és emelte a szívindexet és a pulzustérfogatot. Ugyanakkor ezzel párhuzamosan a növekedési hormon szérum szintje szintén jelentősen, 15-szörösére emelkedett, így a fenti változások nem tekinthetők egyértelműen a ghrelin direkt hatásának [92]. Krónikus, három hetes ghrelinkezelés esetén egy kis esetszámú vizsgálatban szívelégtelen betegeknél csökkent a szimpatikus izgalom, enyhén emelkedett az ejakciós frakció és a bal kamrai izomtömeg, valamint csökkent a bal kamrai végdiasztolés térfogat. A ghrelin javította az izomerőt és növelte az izomtömeget [64].

Ugyanakkor kísérletes vizsgálatokban – a humán vizsgálatok eredményeivel ellentétes módon – izolált tengerimalac papilláris izmon mind a ghrelin, mind a dezacil-ghrelin negatív inotróp hatásának mutatkozott. A hatás azonban csak ép endotél mellett jött létre, és indometacinnal gátolható volt, így a hatást valószínűleg nem közvetlenül a ghrelin, hanem a ghrelin hatására az endotél által termelt ciklooxygenáz-metabolit hozza létre [19]. Soares és munkatársai szintén negatív inotróp, valamint negatív luzitrop hatást írtak le normál és hipertrófiás patkányszívűből izolált papilláris izmokon végzett vizsgálatukban. Itt sem a denudáció, sem a ciklooxygenáz gátlása nem befolyásolta a hatást [20]. Az *in vitro* állatkísérletes eredmények alapján felmerül, hogy a fenti *in vivo* és a humán vizsgálatok pozitív eredményeit nem közvetlenül a ghrelin által okozott miokardiális kontraktilitás-fokozódás, hanem egyéb mechanizmusok, például a szimpatikus aktivitás csökkentése hozza létre.

2.1.8 A ghrelin direkt érhatásai

A ghrelin közvetlen érhatásai többirányúak lehetnek, és az ez idáig rendelkezésre álló ismeretek alapján fajonként és érterületenként különbözhetnek. Egy humán vizsgálatban az intraarteriálisan adott ghrelin növelte az alkar véráramlását [93]. Izolált, endotéliumától megfosztott humán artéria mammaria gyűrűkőn a ghrelin képes ellensúlyozni az endotelin-1 potens érszűkítő hatását [3, 94]. Ugyancsak értágító hatás figyelhető meg fenilefrinnel prekontrahált patkány izolált mezenterialis érpályán ghrelin perfúzió esetén, azonban itt a hatás endotéliumtól függőnek bizonyult [95]. Altatott patkányokon bolus ghrelin adása szintén vérnyomásesést eredményezett, amelynek mértéke NOS-gátlás esetén jelentősen növekedett, a Ca-szenzitív K-csatornák gátlószere, apamin és charybdotoxin együttes adása esetén pedig a vérnyomásesés mértéke csökkent. Ez alapján a ghrelin értágító hatásában a Ca-szenzitív K-csatornák szerepet játszhatnak, amelyeket korábbi vizsgálatok eredményei alapján az NO gátolhat, így az értágulat csökkent NO-szinttel járó állapotok, például endotélium-diszfunkció esetén jelentős lehet [96]. A károsodott ereken létrejövő fokozott ghrelinhatást támasztja alá Katugampola és munkatársainak megfigyelése, amely szerint az atherosclerotikus erekben az izotóppal jelölt ghrelin kötődése fokozódik, tehát a ghrelin receptor fokozott expressziója valószínűsíthető [97].

Ugyanakkor a ghrelin más érterületeken a körülményektől függően vazokonstriktor hatást is kifejthet. Grossini és munkatársai eredményei alapján az intrakoronáriásan adott ghrelin *in vivo* sertésmodellben csökkentette a koronáriák véráramlását. A hatás a β_2 adrenerg receptor által kiváltott NO-felszabadulás gátlásán keresztül jött létre [98]. Pemberton és munkacsoportja ugyancsak a koronária érellenállás növekedését tapasztalta ghrelin adását követően Langendorff szerint perfundált izolált patkányszíveken. Spontán tónusú izolált patkány koronária arteriolákon a ghrelin szintén vazokonstriktiót okozott [99]. Egy bolgár munkacsoport több megállapítást is tett a ghrelin érhatásával kapcsolatban. Ők tónusfüggő (endotelin előkezelést igénylő) vazokonstriktiót írtak le izolált humán mezenterialis arteriolákon és tengerimalac vesearteriolákon [100, 101]. A humán ereken a denudálás és tetrodotoxin denerváció csökkentette a hatást. A tengerimalac renális artériaszegmenseken a ghrelin által kiváltott tenziónövekedés Rho-kináz, PLC, és Ca-szenzitív K-csatorna jelátviteli utat igénybe vevő mechanizmusúnak bizonyult. A hatás feltételezésük szerint az endotelin

intracelluláris jelátviteli útjának ghrelin által történő facilitálása vagy egy közelebről nem ismert, endotél eredetű konstriktor mediátor felszabadítása révén jöhet létre. Izolált tengerimalac femorális artéria simaizomsejteken a ghrelin szintén kontrakciót okozott, ami a patch-clamp vizsgálatok alapján $G\alpha_{(i/o)}$ -fehérje által mediált, foszfatidil-inozitol-PLC, foszfatidil-kolin-PLC, PKC és IP_3 -mediált Ca-felszabaduláson keresztül, Ca-szenzitív K-csatornák involválásával jött létre [102]. A ghrelin direkt érh hatásáról szóló eddigi ismereteket a 3. táblázat foglalja össze.

Faj	Modell	Pre-konstriktió	A ghrelin hatása	Mechanizmus	Ref.
patkány <i>in vitro</i>	Langendorff + izolált koronária	-	vazokonstriktió	L-típusú Ca- csatorna, PKC	[99]
patkány <i>in vivo</i>	iv. bólus	-	vazodilatáció (MAP ↓)	Ca-szenzitív K-csatorna	[96]
patkány <i>ex vivo</i>	perfundált mezenteriális érpálya	80 μM fenilefrin	relaxáció	endotéliumtól függő, nem GHS-R1a hatás	[95]
tengeri- malac <i>in vitro</i>	a. renalis érgyűrű	10 nM ET-1	kontrakció	Rho-kináz, PLC, Ca-szenzitív K-csatorna	[101]
tengeri- malac <i>in vitro</i>	a. femoralis simaizomsejt	10 nM ET-1	kontrakció	Gα _(i/o) , PKC, IP ₃ , PLC, Ca-szenzitív K-csatorna	[102]
malac <i>in vivo</i>	intra- koronáriás infúzió	-	vazokonstriktió	β ₂ -okozta NO fel- szabadulás gátlása	[98]
humán <i>in vitro</i>	mezenteriális artéria	5-10 nM ET-1 42 mM KCl	kontrakció	denudálás és TTX- denerváció csökkenti a hatást	[100]
humán <i>in vitro</i>	a. mammaia gyűrűk	10 nM ET-1	relaxáció	endotéliumtól független hatás	[94]
humán <i>in vitro</i>	a. mammaia gyűrűk	10 nM ET-1	relaxáció	endotéliumtól független hatás	[3]
humán <i>in vivo</i>	alkari véráramlás	-	vazodilatáció (áramlás ↑)	NO-független hatás	[93]
humán <i>in vivo</i>	iv. infúzió	-	vazodilatáció (MAP ↓)	GH-független hatás	[46]

3. TÁBLÁZAT A ghrelin direkt érh hatásáról szóló irodalmi eredmények összefoglalása, az esetleges prekonstriktió, valamint a feltételezett hatásmechanizmus feltüntetésével.

2.2 A PERIKARDIÁLIS FLUIDUM

A szívizom közvetlen mikro környezetében, az interstíciumban lejátszódó folyamatok és az ott előforduló biológiai ágensek közvetlen vizsgálatára kevés módszer létezik, különösen humán alanyoknál. A szív interstíciuma közvetlen kommunikációban áll a szívizom intracelluláris terével, így vizsgálata betekintést nyújthat a szívizom homeosztázisába. Kísérletes modellekben epikardiális korongokkal vagy mikrodialízissel értek el eredményeket, azonban humán vizsgálatokban ezek nem kivitelezhetők [103, 104].

A perikardiális folyadék összetételének vizsgálata jó lehetőséget adhat a szívizomban lezajló folyamatok vizsgálatára. A perikardiális térben fiziológias körülmények között körülbelül 20-50 ml folyadék található meg. A fluidum feladataként korábban csak mechanikus lubrikáns funkciót feltételeztek, azonban az elmúlt két évtized vizsgálatai, köztük a néhai Juhász-Nagy Sándor professzor munkacsoportjának eredményei a perikardiális folyadék ennél lényegesen nagyobb lehetséges biológiai szerepét tárták fel. Állatkísérletes és humán vizsgálatok a perikardiális folyadékot a szív negyedik aktív biológiai kompartmentjeként azonosították az intracelluláris, intersticiális és intravaszkuláris folyadékterek mellett, amely részt vehet a szívizom autoregulációs folyamataiban [105].

A perikardiális fluidum eredetét tekintve főként miokardiális transzszudátum [106]. Számos, a szívben is termelődő ágens, például adenin nukleozidokat [107], pitvari és B-típusú nátriuretikus peptidet [108, 109], endotelin-1-et [110, 111] és katekolaminokat [112] a szisztémás plazmában vagy a sinus coronarius vérében mérhetőnél magasabb koncentrációban tartalmaz, ami ezen ágensek magasabb szívizombeli koncentrációjára utal. A plazmáénál magasabb perikardiális koncentrációkhoz hozzájárulhat, hogy egyes anyagok (pl. adenin nukleozidok, pitvari nátriuretikus peptid) féléletideje a perikardiális térben hosszabb a plazmához képest [109, 113]. A féléletidő meghosszabbodását, illetve a csökkent eliminációt az ANP és az endotelin-1 esetén nem a lebontó neutrális endopeptidáz (NEP) enzim csökkent aktivitása okozza: az enzim kutyában a plazmához képest jelentősen nagyobb koncentrációban található meg a perikardiális folyadékban [109]. Bár betegekben a NEP aktivitása a perikardiális folyadékban némileg

alacsonyabbnak bizonyult, az aktivitás nem mutatott összefüggést a perikardális endotelin-1 koncentrációval [114].

Ischaemiás szívbetegségben a perikardiumban akkumulálódó egyes anyagok koncentrációja a normálshoz képest jóval magasabbra emelkedhet. Bypassműtéten áteső koronáriabetegek perikardiális folyadékában az adenzin és inozin koncentrációja kétszerese volt a billentyűbeteg kontrollcsoporthoz képest [115]. Endotelin intrakoronáriás infúziójával kiváltott spasztikus szívizom-ischaemia állatkísérletes modelljében ugyancsak jelentősen emelkednek az adenin nukleozidok perikardiális koncentrációi a szisztémás plazmaszintek szignifikáns változása nélkül [116]. Az endotelin-1 perikardiális koncentrációja ischaemiás szívbetegségben másfélszeresére nő a nonischaemiás szívbetegekhez képest [117].

A dolgozat témájához kapcsolódóan figyelmet érdemel, hogy ischaemiás szívbetegségben és szívelégtelenségben a perikardiális folyadékban egyes növekedési faktorok szintje is megemelkedik. Instabil anginában a fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) szignifikánsan, az érendotél-növekedési faktor (VEGF) tendenciaszerűen emelkedett volt egy kis esetszámú vizsgálatban [118]. Koronáriabetegektől vett perikardiális mintákban az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) koncentrációja megnőtt, míg a plazmában inkább csökkent, valamint a perikardiális IGF-1 koncentráció negatív korrelációt mutatott a bal kamrai ejekciós frakcióval. Mind az IGF-1, mind receptorának expressziója a károsodott szívizomban magasabbnak bizonyult immunhisztokémiai metszeteken nem szívelégtelen kontrollokhoz viszonyítva. Mindez a kardiális IGF-1 rendszer kompenzációs szerepére utal csökkenő pumpafunkció esetén [119]. Egy másik vizsgálatban bypassműtéten áteső ischaemiás szívbetegektől gyűjtött perikardiális fluidumban a bFGF koncentrációja húszszorosa volt a szérumban mérhetőnek, és a perikardiális fluidum növekedést idézett elő patkány szívizomsejt-kultúrán. A növekedés mértéke pozitívan korrelált a betegek bal kamrai izomtömegével, és bFGF és TGF- β ellenes antitestekkel gátolható volt [120].

A perikardiális folyadékban magas koncentrációban előforduló anyagok tehát visszahathatnak a szív működésre. Intraperikardiálisan adott adenin nukleozidok kiváltják a rájuk jellemző kardiális hatásokat, ráadásul az intravénás adásmódhoz képest elnyújtottabban és kisebb szisztémás hatás mellett [113], valamint fokozzák a szívizomban az endotelin-1 felszabadulását, amely a perikardiális endotelin-1 szint

növekedésével követhető nyomon [121]. A perikardiális térbe adott endotelin-1 ugyanakkor fokozza a szívben az adenin nukleozidok képződését [105], és dózistól függően kamrai ritmuszavarokat is okozhat [122].

Ugyancsak állatkísérletes vizsgálatok alapján a perikardiális térbe adott dopamin és noradrenalin emeli a szívfrekvenciát, növeli a kontraktilitást és a szisztémás vérnyomást, valamint megemeli a perikardiális térben mérhető endotelin-1 és adenin nukleozid koncentrációt [123]. A perikardiális atriális nátriuretikus peptid koncentrációja mind az endotelin-1, mind az angiotenzin II perikardiális inkubációja során megemelkedik [124, 125]. A fenti eredmények alapján tehát a perikardiális hatótér komplex kölcsönhatások révén aktívan részt vesz a miokardium szabályozásában.

A perikardiális térbe bevitt bFGF szignifikánsan csökkentette posztinfarktusos malacokon az infarcerált terület vaszkuláris rezisztenciáját, aminek a háttérében angiográfiával is igazolt fokozott kollateralizáció állhat [126, 127].

A ghrelin perikardiális előfordulásával kapcsolatban ez idáig irodalmi adat nincsen. A fenti adatok értelmében a perikardiális ghrelin szint a szisztémás plazmaszinteknél jóval közelebbi becslést adhat a peptid miokardiális koncentrációjáról, illetve a miokardium szabályozási folyamatainak állapotáról.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a ghrelin kardiovaszkuláris szabályozásban betöltött szerepét vizsgálva a peptid direkt koronária hatását, annak receptorfüggését, valamint a ghrelin ischaemiás szívbetegségben és szívelégtelenségben betöltött szerepét kívántam vizsgálni.

A ghrelin kardioprotektív hatásainak ismeretében feltételeztük, hogy ischaemiás szívbetegségben a peptid lokális, szívszöveti koncentrációja megváltozhat. Mivel a miokardiális koncentráció direkt mérése humánban nem lehetséges, célul tűztük ki szív műtétre kerülő krónikus ischaemiás szívbetegek és kontrollként nonischaemiás billentyűbetegek perikardiális folyadékában és szisztémás vérplazmájában az aktív (acilált) és össz-ghrelin koncentráció mérését. Vizsgáltuk a ghrelinszintek, valamint a funkcionális és morfológiai szívparaméterek, antropometriai adatok és metabolikus paraméterek közötti korrelációt.

A bevezetőben vázolt irodalmi adatok alapján a ghrelin direkt érhatása nem tisztázott, a vizsgált fajtól és szervtől, a vizsgált érszakasz érpályán belül elfoglalt helyzetétől (kondukt artéria, nagyerek vagy teljes érrendszerek), valamint az értónustól egyaránt függhet. Tekintettel az egymásnak ellentmondó, részben hiányos irodalmi adatokra, vizsgálni kívántuk a ghrelin receptorok (GHS-R1a és GHS-R1b) jelenlétét a koronária rendszerben és a szívizomban, valamint tisztázni kívántuk a ghrelin intramurális koronária rezisztenciaerek kontraktilis státuszára kifejtett hatását és ezen hatás receptorális mechanizmusát nagyállatból izolált ereken.

A ghrelinkoncentráció szívelégtelenség kialakulása során bekövetkező változásának tanulmányozásához célunk volt egy megbízható, jól reprodukálható nagyállatmodell beállítása. A modellben vizsgálni kívántuk a plazma ghrelin és kontrollként a proANP koncentráció változását, valamint ezek korrelációját a szívelégtelenség kialakulását jellemző echokardiográfiás és laborparaméterekkel.

4 MÓDSZEREK

4.1 HUMÁN PERIKARDIÁLIS VIZSGÁLAT

4.1.1 Betegcsoportok és mintavétel

Vizsgálatunk során ischaemiás szívbetegség miatt elektív koronária bypass műtétre kerülő betegeket (ISCH, n=54), valamint kontrollként negatív koronarogrammal rendelkező (koszorúér-betegség nélküli), billentyűbetegség miatt nyitott szív műtétre kerülő (VHD, n=41) betegeket vontunk be. A billentyűbetegek közül 25 páciens az aortabillentyű betegsége, míg 16 beteg a mitrális billentyű betegsége miatt került műtétre. A betegek demográfiai és antropometrikus adatait a 4. táblázat mutatja. A beválasztásnál kizárási kritérium volt az akut miokardiális infarktus, a gyulladós vagy tumoros megbetegedés, illetve a vese- vagy májbetegség. A perikardiális fluidum és centrális vénás vérminták vétele intraoperatívan történt, legalább 12 órával az utolsó étkezést követően. A betegek tartósan szedett gyógyszereit az 5. táblázat mutatja. A diabéteszben szenvedő betegeknél a preoperatív időszakban az euglikémia fenntartása rövid hatású inzulin adagolásával történt. Ezen betegeknél a mintavétel a legutóbbi inzulin beadása után legalább 6 órával történt.

Paraméter (átlag±SEM)	ISCH (n=54)	VHD (n=41)
Életkor (év)	63±1	66±1
Nem (férfi/nő)	43/11*	15/26
Dohányosok aránya (dohányos/nem dohányos)	14/40	5/36
Alkoholfogyasztók aránya (fogyaszt/nem fogyaszt)	6/48	3/38
Magasvérnyomás-betegség aránya (van/nincs)	47/7*	6/35
Diabetes mellitus aránya (van/nincs)	18/36*	4/37
Testtömeg-index (kg/m ²)	28±1	27±1

4. TÁBLÁZAT Az ischaemiás (ISCH) és billentyűbeteg (VHD) csoport demográfiai és antropometriai adatai. * $p < 0,05$; ISCH vs. VHD (Fisher-féle egzakt teszt)

Gyógyszerek (a gyógyszert szedő betegek százaléka)	ISCH (n=54)	VHD (n=41)	Fisher-féle egzakt teszt
Angiotenzin konverter enzim inhibitor	71	41	p<0,01
Angiotenzin-receptor blokkoló	15	15	p=1,00
Kalciumcsatorna blokkoló	36	20	p=0,11
Béta-receptor blokkoló	82	76	p=0,61
Sztatin	62	39	p<0,05
Diuretikum	16	37	p<0,05
Nitrát	60	10	p<0,01
Digitális	5	7	p=1,00
Orális antidiabetikum vagy inzulin	31	10	p<0,05

5. TÁBLÁZAT A betegek krónikus gyógyszerelése betegcsoportok szerint

A szívsebész a szívműtét során közvetlenül a perikardium megnyitását követően kb. 10 ml fluidumot szívott le a perikardium zsákból. A vérrel szennyezett minták nem kerültek felhasználásra. Ezzel egyidejűleg centrális vénából vérminta levétele is történt preparált (EDTA-t tartalmazó) Vacuette csövekbe. A ghrelin lebomlásának gátlása érdekében minden mintát aprotininnel, egy aspecifikus szerin proteázgátlóval kezeltünk (500 KIU/ml koncentrációban), majd a mintákat 4°C-on, 3000/perc fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk. A plazmát, illetve a perikardiális fluidum esetén a felülúszót 500 µl-es egységekre osztva, Eppendorf csövekben, -80°C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

Minden beteg előzetes tájékoztatást követően írásos beleegyező nyilatkozatot adott a mintavételhez és az adatgyűjtéshez. Az aneszteziológiai és sebészi eljárások az intézeti protokollnak megfelelően történtek, a mintavétel a műtétet vagy annak kimenetelét

semmilyen formában sem befolyásolta. A vizsgálat elvégzését a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézeti Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyezte.

4.1.2 Biokémiai mérések

A levett perikardiális és plazma mintákból aktív (acilált) és össz-ghrelin (acilált és dezacilált forma együtt) meghatározás történt radioimmunassay (RIA) módszerrel, kereskedelmi forgalomban kapható acilált ghrelin (GHRA-88HK) és össz-ghrelin (GHRT-89HK) kitek felhasználásával (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). A plazma inzulinszint mérését hagyományos ELISA technikával végeztük (Biosource Europe, Nivelles, Belgium). A mérések mindenben a gyártó által mellékelt használati utasítások szerint történtek. A további laboratóriumi paraméterek (vércukorszint, összkoleszterin, triglicerid) mérése a Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központjának klinikai laboratóriumában történt laboratóriumi automaták segítségével. Az inzulinrezisztencia mértékét jelző HOMA-A (más néven HOMA-IR) paraméter kiszámítását a következő képlettel végeztük: vércukorszint (mmol/l) x plazma inzulinszint (μIU/ml) / 22,5.

4.1.3 Echokardiográfia

Az echokardiográfias mérések a rutin preoperatív kivizsgálás részeként történtek a Semmelweis Egyetem Kardiológiai Központjában, ugyanazon echokardiográfias készülék segítségével (Toshiba Aplio SSA-770A, Tochigi, Japán). A következő paraméterek mérése történt a vizsgálat keretein belül: bal kamrai végdiasztolés (LVEDD) és végszisztolés (LVESD) átmérő, interventrikuláris szeptumvastagság (SWT) és hátsó falvastagság (PWT), jobb kamrai átmérő a bazális és középső harmad határán (RV), valamint – jobb kamrai funkcionális paraméterként – a tricuspidalis annulus síkjának szisztolés kitérése (TAPSE). A bal kamrai ejekciós frakció (EF) mérése Simpson-módszerrel történt csúcsi négyüregű felvételeken. A bal kamrai izomtömeg (LVM) kiszámítása a Devereux és Reichek által 1977-ben leírt és validált képlet segítségével történt: $LVM=1,04 \times [(LVEDD+PWT+SWT)^3 - LVEDD^3] - 13,6$, ahol az LVM mértékegysége gramm, az átmérők és falvastagságok mértékegysége centiméter [128].

4.2 *IN VITRO* KORONÁRIA ARTERIOLA VIZSGÁLATOK

4.2.1 Western blot

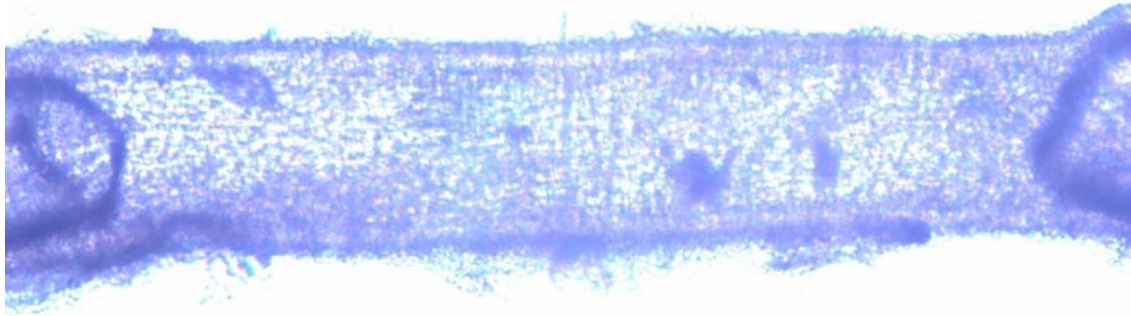
Mivel specifikus kutya ghrelinreceptor antitest nem állt rendelkezésre, az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz humán ghrelinreceptor ellenes antitesteket alkalmaztunk. Az antitestek kutya szívszöveten történő alkalmazhatóságának tisztázása érdekében az anti-GHS-R1a és anti-GHS-R1b antitesteket kutya bal kamrai szövetminta-homogenizátumon validáltuk Western blot módszerrel. A szövetmintából készült teljes fehérje homogenizátumot lizáltuk, denaturáltuk, majd SDS-PAGE grádiensgélben (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) futtattuk standard molekulatömegű markerfehérjékkel párhuzamosan (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) redukív közegben. Az előregyártott NuPAGE Novex Bis Tris géleken a mintákat 200 V-os feszültség alatt 50 percig futtattuk. A fehérjéket ezután polivinil-difluorid (PVDF) membránokra transzferáltuk NuPAGE antioxidáns tartalmú pufferoldatban a redukált fehérjék blottolása és a reoxidáció gátlása céljából. A transzfer 1 órán keresztül alkalmazott 30 V feszültséggel történt. A PVDF membránokat ezután blokkoló pufferben (5%-os zsírszegény tejpor) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosást követően a membránokat 1:2000 arányban hígított, nyúlban termeltetett anti-humán anti-GHS-R1a, illetve anti-GHS-R1b antitestekkel (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk egy éjszakán át óvatos rázás mellett 4°C-on. Ezután a membránokat HRP-vel konjugált, 1:2000 hígításban alkalmazott másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az immunreaktív fehérjecsíkok leolvasása Enhanced Chemiluminescence (ECL Plus) rendszerrel történt (PerkinElmer, Singapore).

4.2.2 Immunhisztokémia

A GHS-R1a és 1b receptorok lokalizációjának vizsgálata a kutya koronária érrendszerben immunhisztokémiai vizsgálattal történt. A bal kamrai szövetmintákat semleges pufferben oldott 4%-os formaldehiddel fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. A szövetblokkokból 5 µm vastagságú metszetek készültek, amelyeket Histoclear (National Diagnostics, Hessele Hull, UK) használatával deparaffináltunk, majd csökkenő alkoholsor (100%, 95% és 70%) segítségével rehidráltunk. A szövetek endogén peroxidáz aktivitását 20 perces 0,6% H₂O₂-t tartalmazó metanol oldatban történő inkubációval blokkoltuk. Az antigénepitopok felfedése céljából a metszeteket mikrohullámú sütőben 25 percig 0,01 mólos pufferolt citrátoldatban (pH 6,0) forraltuk, majd 2%-os normál kecskesavót tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk. A metszeteket ezután 1:400 koncentrációban a Western blot vizsgálatnál is használt anti-GHS-R1a, illetve anti-GHS-R1b antitestekkel együtt inkubáltuk párasító kamrában 2 órán át, szobahőmérsékleten. Ezt követően a metszeteket biotinált másodlagos anti-nyúl kecske antitesttel, majd ABC peroxidáz reagenssel inkubáltuk (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA). A peroxidázt tartalmazó kötőhelyek előhívása folyékony diamino-benzidinnel történt mikroszkóp alatt, szemellenőrzés mellett (Peroxidase-Substratkit DAB, Biologo, Kronshagen, Germany). A negatív kontrollok az elsődleges antitest kihagyásával készültek. Pozitív kontrollként a mindkét receptor altípust ismertető kutya hipotalamusz metszetek szolgáltak.

4.2.3 Izolált koronária arteriolák: preparátum és protokoll

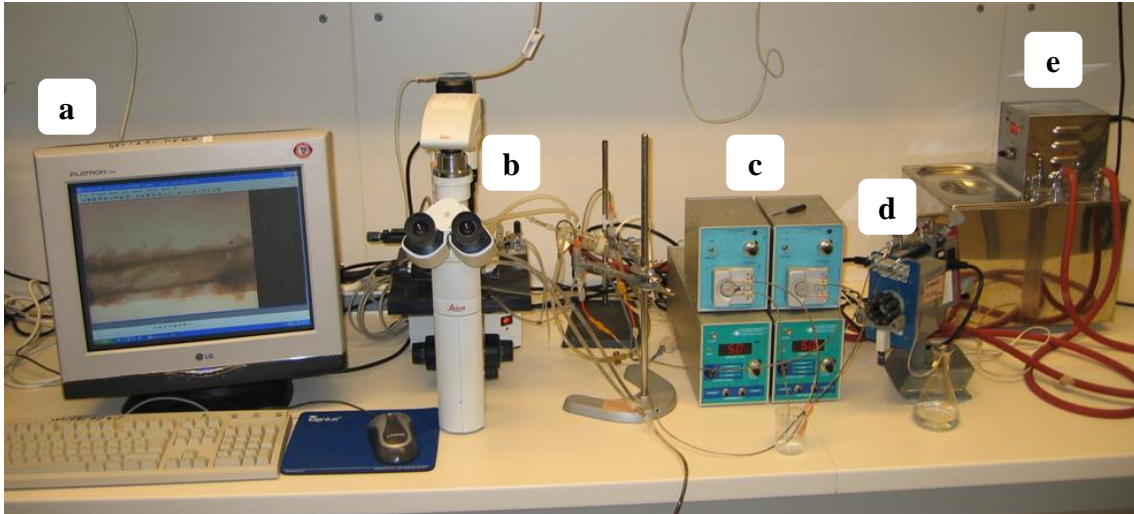
A kutya szívizom szövetmintákat, amelyekből a koronária arteriolák preparálása történt, egyéb kísérletek kontrolljaként felhasznált állatokból nyertük (n=20). Az állatok semmilyen gyógyszeres vagy eszközös előkezelésben nem részesültek, ami a vizsgálataink eredményét befolyásolhatta volna. Az állatokat pentobarbitállal altattuk (30 mg/kg, Nembutal; CEVA), majd művi lélegeztetés mellett mellkasnyitás történt. A szíven egyenárammal kamrafibrillációt hoztunk létre, majd az excísiót követően azonnal kb. 1x1 cm-es szövetmintát vettünk a bal elülső leszálló koszorúér ellátási területéről. A szövetmintát rögtön hideg (4°C) normál Krebs-Ringer oldatba helyeztük (nKR, összetétele mmol/l-ben: 119 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 NaH₂PO₄; 1,17 MgSO₄; 24 NaHCO₃; 2,5 CaCl₂; 5,5 glükóz és 0,0345 etilén-diamin-tetraecetsav [EDTA]).



2. ÁBRA *Izolált, kanülált, 50 Hgmm-es intralumináris nyomás alá helyezett kutya koronária arteriola sztereomikroszkópos képe. Megfigyelhető a műanyag kanülök vége, valamint tisztán látható az ér külső és belső átmérője (kb. 250 μm).*

A szövetmintát közvetlenül ezután jégen szállítottuk a vizsgáló laboratóriumba, ahol hideg oldatban preparáltunk. A vizsgálathoz a bal elülső leszálló koronária másod- vagy harmadrendű, 2-300 μm körüli átmérőjű intramurális ágát használtuk. A preparálás Nádasy és munkatársai módszerei szerint, sztereomikroszkóp alatt, tompán, végig nedves környezetben történt [129]. A kipreparált arteriolák oldalágait lekötöttük, egy kb. 3-6 mm hosszú szegmenst kimetszettünk, majd láng felett húzott üvegkanülbe ragasztott, kb. 150 μm átmérőjű műanyag kanülök segítségével mindkét végükön kanüláltuk. Az ereket 37°C-os, karbogén gázkeverékkel (5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂) buborékolttatott, 7,4-es pH-jú normál Krebs-Ringert tartalmazó, speciálisan kiképzett szervkamrába helyeztük, és mikro-manipulátorokkal natív hosszukra feszítettük (2. ábra).

Szervopumpák (Living Systems, Burlington, VT, USA) segítségével állandó, 50 Hgmm-es intralumináris nyomást hoztunk létre, áramlás az erekben így nem keletkezett. A szervfürdőben lévő ionok és tápanyagok inkubáció alatti állandósága érdekében az oldatot rollerpumpa alkalmazásával folyamatosan cseréltük. A szervfürdő és az oldatok állandó hőmérsékletét termosztát biztosította. Az érátmérő változásait videomikroszkóp segítségével 5 percenként készített fotóval rögzítettük, az átmérőket Leica QWin 3.1 szoftver segítségével mértük le. A kísérleti összeállítást a 3. ábra mutatja.



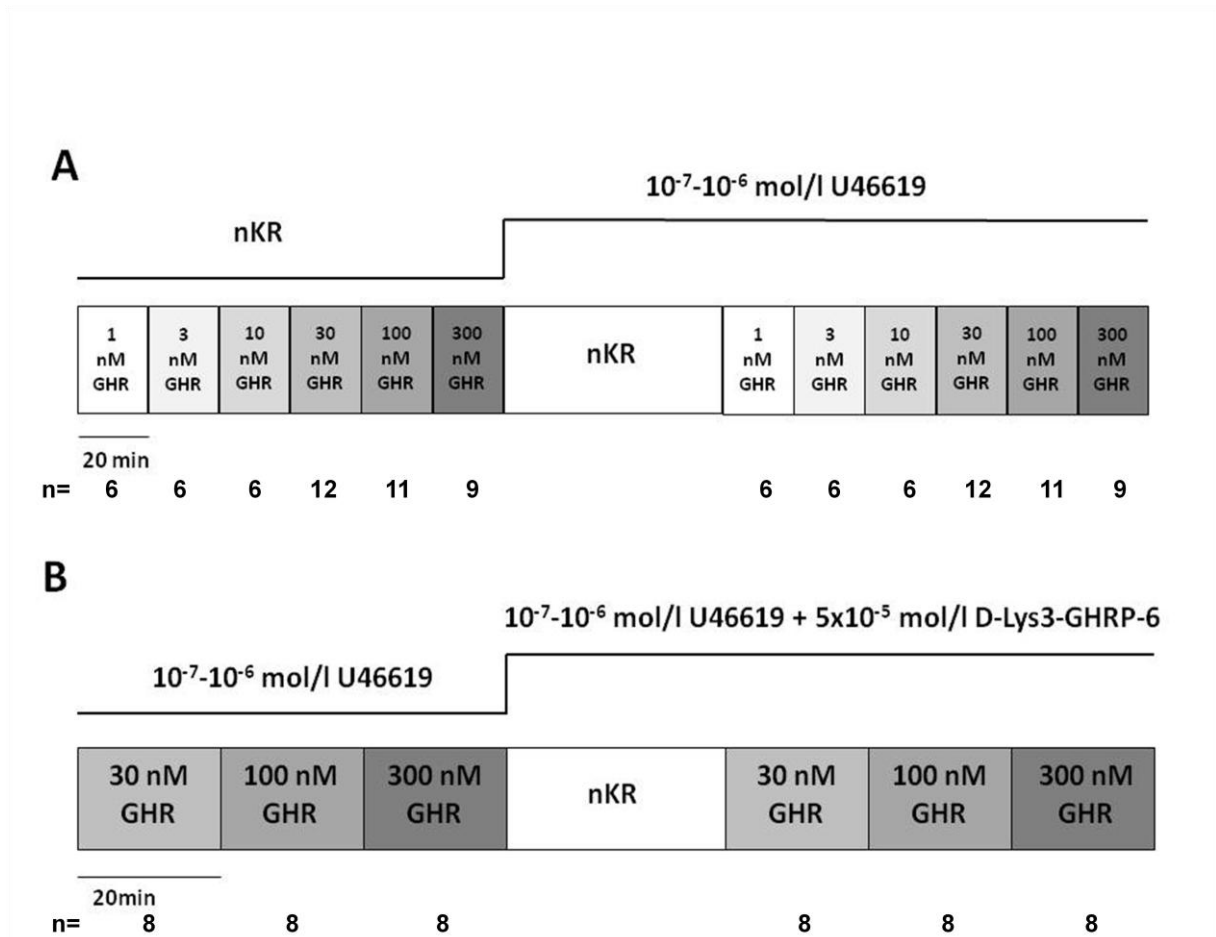
3. ÁBRA Az izolált mikroereknél alkalmazott kísérleti összeállítás. A: arteriola képe a monitoron (Leica Qwin 3.1 szoftver); B: videomikroszkóp és szervfürdő; C: szervpumpák; D: a szervfürdő folyadékcseréjét végző rollerpumpa; E: termosztát.

Harminc perc ekvilibrációs periódust követően az izolált koronária arteriolákon kétféle protokollt hajtottunk végre. Az egyik sorozatban 1, 3, 10, 30, 100 és 300 nmol/l koncentrációban kutya acilált ghrelint (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) keringtettünk a szervfürdőben, koncentrációnként 20 percig (1, 3, 10 nM: n=6; 30, 100 nM n=6-12; koncentrációtól függően). Az ereket ezután a vazokonstriktor hatású U46619 tromboxán analóggal inkubáltuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) körülbelül 25 %-os átmérőcsökkenés eléréséig 10^{-7} - 10^{-6} mol/l koncentrációban. Ezután – a tromboxán analóg folyamatos háttérinfúziója mellett – a szervfürdőbe a prekonstriktiót megelőzően alkalmazott koncentrációjú ghrelinsort infundáltuk ugyanezen ereknél (4/A ábra).

A másik, nyolc eret tartalmazó kísérletsorozatban (n=8) a korábbiakkal egyező prekonstriktiót (10^{-7} - 10^{-6} mol/l U46619) követően a magasabb, 30, 100 és 300 nmol/l ghrelin-koncentrációk hatását vizsgáltuk a GHS-R1a receptor blokádjá előtt és alatt. A specifikus GHS-R1a antagonistá D-Lys³-GHRP-6 peptidet (Bachem, Weil am Rhein, Németország) 50 μ mol/l koncentrációban adtuk a szervfürdőhöz a növekvő koncentrációjú ghrelinnel és a konstans koncentrációjú U46619-cel együtt (4/B ábra).

Minden ér esetén a protokoll végrehajtása után 10^{-5} mol/l acetilkolinnal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) teszteltük az intakt endotélfunkciót.

Az erek spontán tónusát a kísérletek elején, 30 perces normál Krebs-Ringer oldatban történt inkubációt követően mért átmérő és a kísérletek legvégén 30 perc Ca-mentes Krebs-Ringer oldatban történt inkubációt követően mért passzív átmérő különbsége alapján számítottuk.



4. ÁBRA Az izolált koronária arteriolákon végrehajtott mikroangiográfias kísérleti protokoll sematikus ábrája. „A”: Az első sorozatban növekvő ghrelinkoncentrációjú Krebs-Ringer fürdőben inkubáltuk az ereket, majd U46619 tromboxán analóggal történt prekonstrukciót követően megismételtük a növekvő ghrelinkoncentrációjú sorozatot. „B”: U46619 hatásban a három legmagasabb ghrelinkoncentrációval megismételtük a kísérletet GHS-R1a blokádnak előtt és alatt. (nKR: normál Krebs-Ringer oldat; GHR: ghrelin)

4.3 SZÍVELÉGTELENSÉG *IN VIVO* NAGYÁLLATMODELLJE

4.3.1 A modell létrehozása

Nátrium-pentobarbitállal történt anesztéziát (30 mg/kg, Euthasol, AST Beheer B.V., Hollandia), intubálást és gépi lélegeztetést követően lege artis asepsis betartásával Biotronik típusú DDD pacemakert implantáltunk keverék kutyákba (n=13). Mind a pitvari, mind a kamrai elektródát a jobb kamrába pozicionáltuk. Az ébredés után a pacemakert 120/min frekvenciára, DDD üzemmódra programozva és 250 ms-os virtuális atrioventrikuláris időt beállítva 240/min jobb kamrai ingerlést értünk el. Az ingerlést a humán New York Heart Association (NYHA) IV funkcionális stádiumnak megfeleltethető, súlyosan szívelégtelen állapot eléréséig folytattuk (orthopnoe, nagyvérköri dekompenzáció, étvágytalanság, ascites megjelenése). Antibiotikus profilaxison túl az állatok egyéb gyógyszeres kezelésben, így szívelégtelenség elleni kezelésben nem részesültek. A szívelégtelenség kórfejlődését hetente echokardiográfiás vizsgálattal, vénás vérvétellel, fizikális vizsgálattal követtük. A pacemaker működését hetente ellenőriztük. A szívelégtelenség kialakulása után az állatokon akut kísérletet végeztünk, amelynek eredményei nem képezik jelen dolgozat témáját. Az állatokon végzett vizsgálatok mind a helyi, mind az Európai Unió etikai szabályoknak megfeleltek, a kísérletek elvégzéséhez a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével rendelkezünk.

4.3.2 Echokardiográfiás mérések

Az állatokon hetente végeztünk echokardiográfiás vizsgálatot nyugodt környezetben, szedáció nélkül, a vizsgálat idejére kikapcsolt pacemaker mellett. A mérésekhez GE Vivid i hordozható echokardiográfiás készüléket használtunk. Mértük a szívüregi átmérőket (bal kamrai végdiasztolés és végszisztolés átmérő, jobb kamrai végdiasztolés átmérő), falvastagságokat (szeptum és hátsó fal diasztolés átmérő), a mitralis és tricuspidalis regurgitációt, a bal kamrai ejekciós frakciót (Simpson módszer) és a jobb kamrai szisztolés funkcióra utaló tricuspidalis annulus síkjának systolés elmozdulása (TAPSE) paramétert.

4.3.3 Biokémiai mérések

Az EDTA-val és aprotininnal (500 KIU/ml) kezelt vérmintákat közvetlenül a levétel után centrifugáltuk, a plazmát 500 µl-es egységekre osztva, Eppendorf csövekben a mérések elvégzéséig -80°C-on tároltuk. A mintákból aktív ghrelin (humán aktív ghrelin ELISA, EZGRA-88K, Merck Millipore, kutya aktív ghrelin keresztreaktivitás 106%) és proANP (humán proANP 1-98 ELISA, BI-20892, Biomedica; referencia kutyamintára: Toma és munkatársai [124]) koncentrációjának mérése történt standard ELISA módszerrel, a gyártó utasításainak megfelelően.

A levett vérmintákból standard laboratóriumi módszerek segítségével további rutin laboratóriumi mérések is történtek (vérkép, vesefunkció, ionok, májenzimek, bilirubin).

4.4 STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adathalmazokon elsőként normalitás vizsgálatot végeztünk (Shapiro-Wilk W teszt), majd ennek eredménye alapján választottunk paraméteres vagy nonparaméteres tesztet. A humán vizsgálatoknál a mért biokémiai paramétereknél a szélső értékeket (a legkisebb és legnagyobb értékeket) az analízisnél nem vettük figyelembe. Az eredmények elemzésére nonparaméteres teszteket (Mann-Whitney U, Wilcoxon, Spearman tesztek) és Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk.

A koronária arteriola vizsgálatokban az érátmérő-változások összehasonlításához Student-féle párosított t-tesztet használtunk.

A szívelégtelenség nagyállat-modellje adatainak statisztikája párosított Student-féle t-teszttel és Pearson-féle korrelációs teszttel készült.

Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük azokat az eltéréseket, illetve változásokat, amelyeknél a próbák $p < 0,05$ értéket adtak. Az adatokat átlag \pm S.E.M formában adtuk meg. A statisztikai értékeléshez és az ábrázoláshoz Statistica 10 és Microcal Origin 5.0 szoftvereket használtunk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 HUMÁN PERIKARDIÁLIS VIZSGÁLAT

5.1.1 Metabolikus paraméterek

A két betegcsoport metabolikus paramétereit összehasonlítva az ischaemiás szívbetegek szérum össz-koleszterinszintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A szérum trigliceridszint és szénhidrátháztartás paraméterei (plazma glükóz- és inzulinszint, az inzulinrezisztenciát jelző HOMA-A paraméter) nem mutattak különbséget (6. táblázat). Az ischaemiás csoportban szignifikánsan több beteg szedett sztatint (VHD vs. ISCH: 16/41 vs. 35/54; $p < 0,05$).

Paraméter (átlag \pm SEM)	ISCH (n=54)	VHD (n=41)
Össz-koleszterin (mmol/l)	4,4\pm0,2**	5,1 \pm 0,2
Triglicerid (mmol/l)	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
Plazma glükóz (mmol/l)	5,5 \pm 0,2	5,6 \pm 1,2
Plazma inzulin (μ IU/ml)	11,8 \pm 1,9	9,5 \pm 0,6
HOMA-A index	2,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,2

6. TÁBLÁZAT Az ischaemiás (ISCH) és billentyűbeteg (VHD) csoport metabolikus paramétereinek összehasonlítása. ** $p < 0,01$; ISCH vs. VHD (Mann-Whitney teszt)

5.1.2 Echokardiográfiás paraméterek

A betegcsoportok mért és számított echokardiográfiás paramétereit az 7. táblázat tartalmazza. Az ischaemiás betegcsoportban mérsékelten, de szignifikánsan alacsonyabb ejekciós frakciót és nagyobb végszisztolés átmérőt találtunk a billentyűbetegekhez képest. Nem találtunk szignifikáns különbséget a bal kamrai izomtömegben és falvastagságokban, valamint a jobb kamrai morfológiai és funkcionális paraméterekben sem (7. táblázat).

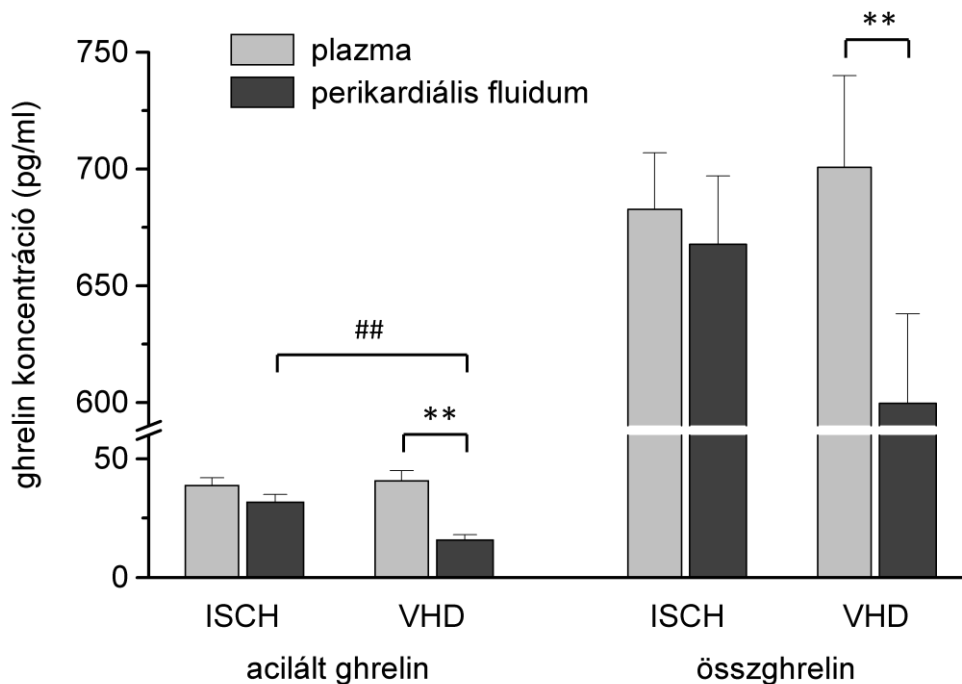
Paraméter (átlag±SEM)	ISCH (n=54)	VHD (n=41)
Ejekciós frakció (%)	55±1**	62±1
Bal kamrai végdiasztolés átmérő (mm)	49±1	47±1
Bal kamrai végszisztolés átmérő (mm)	36±1**	32±1
Szeptum vastagsága (mm)	14±1	15±1
Hátsó fal vastagsága (mm)	12±0	13±1
Bal kamrai izomtömeg (g)	309±21	322±24
Jobb kamrai átmérő (mm)	29±1	32±1
Tricuspidalis annulus síkjának szisztolés kitérése (TAPSE, mm)	26±1	28±10

7. TÁBLÁZAT Az ischaemiás (ISCH) és billentyűbeteg (VHD) csoport echokardiográfiás paramétereinek összehasonlítása. ** $p < 0,01$ ISCH vs. VHD (Mann-Whitney teszt)

5.1.3 Ghrelinkoncentráció a plazmában és a perikardiális fluidumban

Az ischaemiás szívbeteg csoportban a perikardiális aktív (acilált) ghrelin koncentráció szignifikánsan magasabb volt, kétszerese a billentyűbeteg csoportban mérhetőnek (5. ábra). A perikardiális össz-ghrelinszint szintén magasabbnak bizonyult az ischaemiás csoportban, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns. A plazma ghrelin koncentrációkban ugyanakkor nem mutatkozott szignifikáns különbség a betegcsoportok között sem az aktív, sem az össz-ghrelin tekintetében.

Mind a perikardiális, mind a plazmában mért aktív ghrelin koncentrációja több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb volt az össz-ghrelin koncentrációhoz képest mindkét csoportban.

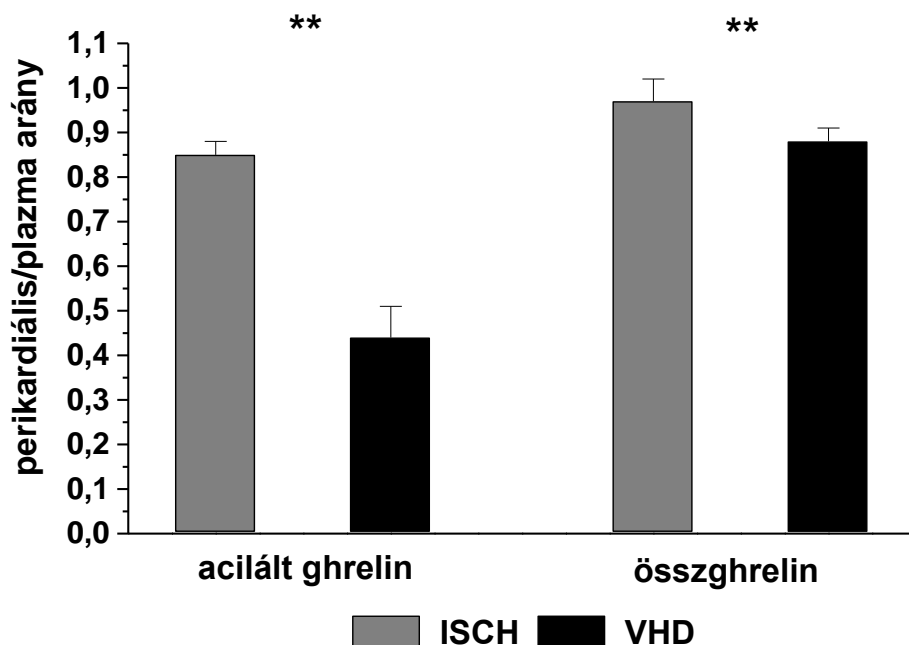


5. ÁBRA Acilált és össz-ghrelin koncentráció a vérplazmában és a perikardiális fluidumban ischaemiás szívbetegek (ISCH) és billentyűbetegek (VHD) csoportjában. ** $p < 0,01$ plazma vs. perikardiális folyadék (Wilcoxon teszt); ## $p < 0,01$ ischaemiás vs. billentyűbetegek (Mann-Whitney teszt)

A billentyűbeteg csoportban a perikardiális aktív és össz-ghrelin szint is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a plazmában mért koncentrációhoz képest, míg az ischaemiás csoportban ilyen különbséget nem láttunk. Ez utóbbi felhívja a figyelmet arra a lehetőségre, hogy ez egyúttal relatív perikardiális aktív és össz-ghrelin többletet jelent ischaemiás szívbetegség esetén.

A billentyűbeteg csoporton belül nem találtunk szignifikáns különbséget az aorta vagy a mitralis billentyű betegsége miatt operált betegek között sem a perikardiális, sem a plazma ghrelin tekintetében (aorta vs. mitralis, perikardiális acilált ghrelin: 15 ± 2 vs. 17 ± 3 , $p=0,27$; perikardiális össz-ghrelin: 613 ± 56 vs. 580 ± 44 , $p=0,76$; plazma acilált ghrelin: 39 ± 5 vs. 45 ± 6 , $p=0,33$; plazma össz-ghrelin: 683 ± 57 vs. 729 ± 47 , $p=0,43$).

A betegeknél az aktív és össz-ghrelin koncentrációból a perikardiális és plazma ghrelinszintre egyaránt ható szisztémás hatásokat kiküszöbölő, a relatív perikardiális többletet jobban mutató perikardiális/plazma arányt számoltunk. Ebben az összevetésben az ischaemiás csoportban már mind az aktív, mind az össz-ghrelin tekintetében szignifikánsan magasabb perikardiális/plazma arányt találtunk, az aktív ghrelin esetén közel kétszeres különbséggel (6. ábra).



6. ÁBRA Az acilált és össz-ghrelin koncentrációból számított perikardiális/plazma arány ischaemiás szívbetegekben (ISCH) és billentyűbetegben (VHD). ** $p<0,01$ ISCH vs. VHD (Mann-Whitney próba)

5.1.4 A perikardiális és plazma ghrelin koncentrációk korrelációja metabolikus paraméterekkel

Szignifikáns negatív korreláció mutatkozott a plazma össz-ghrelin és testtömeg-index között (8. táblázat). A plazma inzulin koncentráció és az inzulinrezisztenciára jellemző HOMA-A index negatív korrelációt mutatott mind a plazma, mind a perikardiális össz-ghrelinnel, valamint a perikardiális aktív ghrelin koncentrációval is. A ghrelinszintek és a szérum össz-koleszterin vagy triglicerid szint között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

Összes beteg (n=95)		Testtömeg -index	Össz- koleszterin	Tri- glicerid	Plazma glükóz	Plazma inzulin	HOMA-A index
Plazma acilált ghrelin	R	-0,159	-0,072	0,201	0,018	-0,192	-0,192
	p	0,128	0,496	0,057	0,865	0,071	0,071
Perikardiális acilált ghrelin	R	0,000	-0,090	0,125	-0,006	-0,223	-0,233
	p	0,997	0,419	0,266	0,957	0,047	0,038
Plazma össz-ghrelin	R	-0,223	0,054	0,145	-0,163	-0,288	-0,326
	p	0,030	0,603	0,166	0,115	0,006	0,002
Perikardiális össz-ghrelin	R	0,003	-0,091	0,185	-0,061	-0,371	-0,395
	p	0,973	0,386	0,077	0,557	0,000	0,000

8. TÁBLÁZAT A ghrelin koncentrációk és metabolikus paraméterek közötti összefüggéseket mutató korrelációs mátrix a teljes betegpopuláció figyelembe vételével. A félkövér kiemelés a statisztikailag szignifikáns összefüggéseket mutatja. (R: Spearman korrelációs együttható; p: a szignifikancia szintje)

5.1.5 A perikardiális és plazma ghrelin koncentrációk korrelációja echokardiográfiás paraméterekkel

A perikardiális és plazma aktív és össz-ghrelin koncentrációjának korrelációját az echokardiográfiás morfológiai és funkciós paraméterekkel Spearman-teszt alkalmazásával vizsgáltuk a teljes betegpopuláción (9. táblázat). A perikardiális aktív és össz-ghrelin koncentráció szignifikáns negatív korrelációt mutatott a bal kamrai hátsó fal vastagsággal (PWT). A bal kamrai hátsó fal és az interventrikuláris szeptum vastagságát, valamint a bal kamrai végdiasztolés átmérőt magába foglaló Devereux-Reichek képlet alkalmazásával számított bal kamrai izomtömeg negatív korrelációt mutatott a plazma össz-ghrelin koncentrációval. A bal kamrai ejekciós frakció, a bal kamrai átmérők és a jobb kamrai paraméterek (a jobb kamrai átmérő és a TAPSE) nem mutattak szignifikáns összefüggést a ghrelinszintekkel.

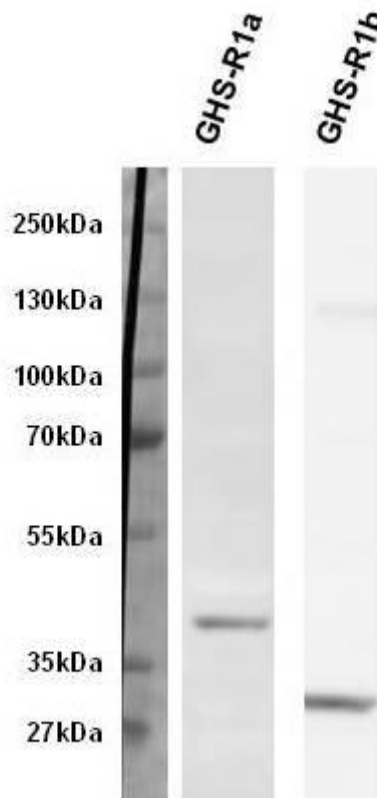
Összes beteg (n=95)		EF	EDD	ESD	SWT	PWT	LVM	RV	TAPSE
Plazma acilált ghrelin	R	-0,048	0,000	-0,002	-0,133	-0,252	-0,119	0,160	0,198
	p	0,198	0,999	0,984	0,307	0,060	0,381	0,205	0,239
Perikardiális acilált ghrelin	R	-0,163	0,029	0,074	-0,097	-0,306	-0,146	0,053	-0,005
	p	0,169	0,795	0,511	0,487	0,032	0,316	0,688	0,978
Plazma össz-ghrelin	R	0,050	-0,089	-0,082	-0,143	-0,243	-0,275	0,075	0,107
	p	0,658	0,393	0,433	0,271	0,069	0,038	0,554	0,530
Perikardiális össz-ghrelin	R	-0,070	-0,022	0,029	-0,173	-0,354	-0,249	0,007	0,253
	p	0,533	0,833	0,781	0,181	0,007	0,061	0,953	0,129

9. TÁBLÁZAT A ghrelin koncentrációk és echokardiográfiás paraméterek közötti összefüggéseket mutató korrelációs mátrix a teljes betegpopuláció figyelembe vételével. A félkövér kiemelés a statisztikailag szignifikáns összefüggéseket mutatja. (R: Spearman korrelációs együttható; p: a szignifikancia szintje; EF: ejekciós frakció; EDD: bal kamrai végdiasztolés átmérő; ESD: bal kamrai végszisztolés átmérő; SWT: szeptumvastagság; PWT: hátsó fal vastagsága; LVM: bal kamrai izomtömeg; RV: jobb kamrai átmérő; TAPSE: tricuspidalis billentyű síkjának kitérése szisztolében)

5.2 IN VITRO VIZSGÁLATOK

5.2.1 Az anti-humán GHS-R antitestek validálása kutya szöveteken

A kutya bal kamrai szövetminta lizátumok western blot vizsgálata nyúlban termelt anti-humán GHS-R1a és GHS-R1b antitestekkel megerősítette, hogy az antitestek szelektíven kötődnek a megfelelő GHS-R1a és GHS-R1b receptorokhoz kutyában is, egyben kimutatta a receptorok jelenlétét a vizsgált bal kamrai szövetmintákban (7. ábra). A GHS-R1a antitest körülbelül 41 kDa molekulásúlynál, a GHS-R1b antitest körülbelül 32 kDa-nál, egy-egy csíkban festette meg a gélt. Ez a National Center for Biotechnology Information adatbázisa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) alapján megfelel a humán GHS-R1a (NP_940799.1) és GHS-R1b (NP_004113.1) receptorok molekulatömegének.



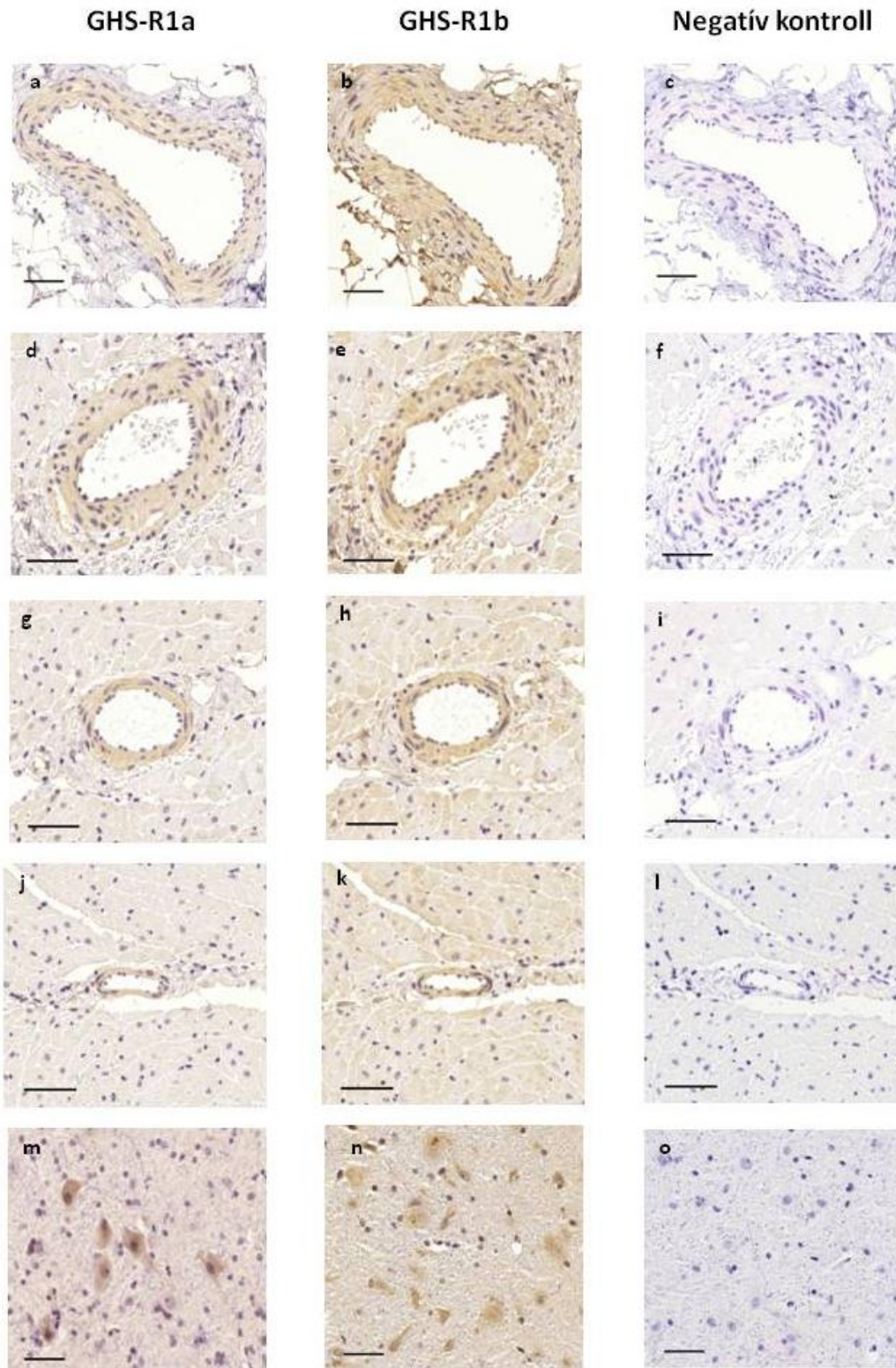
7. ÁBRA A nyúlban termeltetett anti-humán GHS-R1a és 1b antitestek validálása kutya bal kamrai lizátumon western blot módszerrel. Az antitestek a humán receptoroknak megfelelő molekulatömegű csíknál festették meg a gélt.

5.2.2 A GHS-R altípusok lokalizációja a szívben

A növekedési hormon elválasztását serkentő receptor (ghrelinreceptor) 1a és 1b altípusának elhelyezkedését a kutyaszívben immunhisztokémiával vizsgáltuk egymás melletti metszeteken (8. ábra). Pozitív kontrollként az ismert mindkét receptor altípust expresszáló hypothalamus metszetek szolgáltak. Itt GHS-R1a és GHS-R1b pozitív neuronok is ábrázolódtak (8/m és n ábra). A másodlagos antitest nonspecifikus kötődését az elsődleges antitest kihagyásával készült negatív kontroll hypothalamus és szívizommetszeteken zártuk ki (jobb oldali oszlop a 8. ábrán).

A kutya szívizommetszetek GHS-R1a festődését a 8. ábra bal oldali oszlopában ábrázoltuk. A bal kamrai metszeteken a szívizom enyhe GHS-R1a immunpozitivitást mutat. Az ábra első sorában ábrázolt epikardiális és különböző átmérőjű intramurális artériák falában kifejezett ghrelin receptor immunpozitivitás észlelhető.

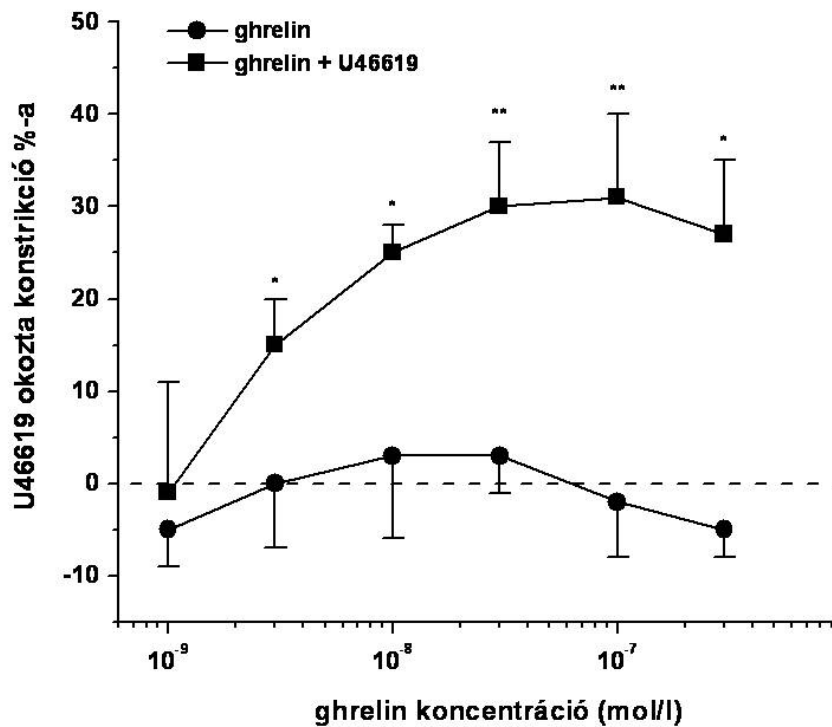
A metszetek GHS-R1b immunfestését az ábra középső oszlopában ábrázoltuk. A miokardiális GHS-R1b immunpozitivitás az 1a receptor altípusénál jóval kifejezettebbnek bizonyult. A GHS-R1a-hoz hasonlóan az 1b receptor is jelentős immunpozitivitást mutatott mind az epikardiális artériák, mind az intramurális arteriolák falában.



8. ÁBRA Mindkét ghrelin receptor altípus jelentős immunpozitivitást mutat a kutyaszívek epikardiális (a–c) és különböző átmérőjű intramurális (d–l) koronáriáinak falában, szomszédos metszeten. A miokardiális immunpozitivitás kifejezettebb GHS-R1b esetén. Pozitív kontroll: immunpozitív neuronok kutya hypothalamusban (m–n). Negatív kontroll: elsődleges antitest kihagyása (jobb oszlop). A csíkok 50 μm -t jelölnek.

5.2.3 A ghrelin hatásai izolált kutya koronária arteriolán

Az izolált és kanülált arteriolák belső átmérőjének átlaga $219 \pm 18 \mu\text{m}$ volt 50 Hgmm-es nyomáson. Az erek ezen az intralumináris nyomáson csupán alacsony spontán tónussal rendelkeztek: teljesen relaxált állapotban, Ca-mentes oldatban mért átmérőhöz képest $-5 \pm 5\%$ -os csökkenés volt észlelhető normál Krebs-Ringer oldatban. A ghrelin önmagában nem okozott szignifikáns átmérőváltozást spontán tónusú ereken. Ugyanakkor a thromboxánanalóg U46619-el történt prekonstriktiót követően a ghrelin az arteriolák dóziszfüggő konstriktióját okozta. Az U46619 önmagában $-25 \pm 2\%$ átmérőcsökkenést hozott létre ($n=20$; $p<0,01$). A ghrelin 3 és 100 nmol/l koncentrációtartományon belül az U46619 hatásához képest további $31 \pm 9\%$ konstriktiót okozott (9. ábra).

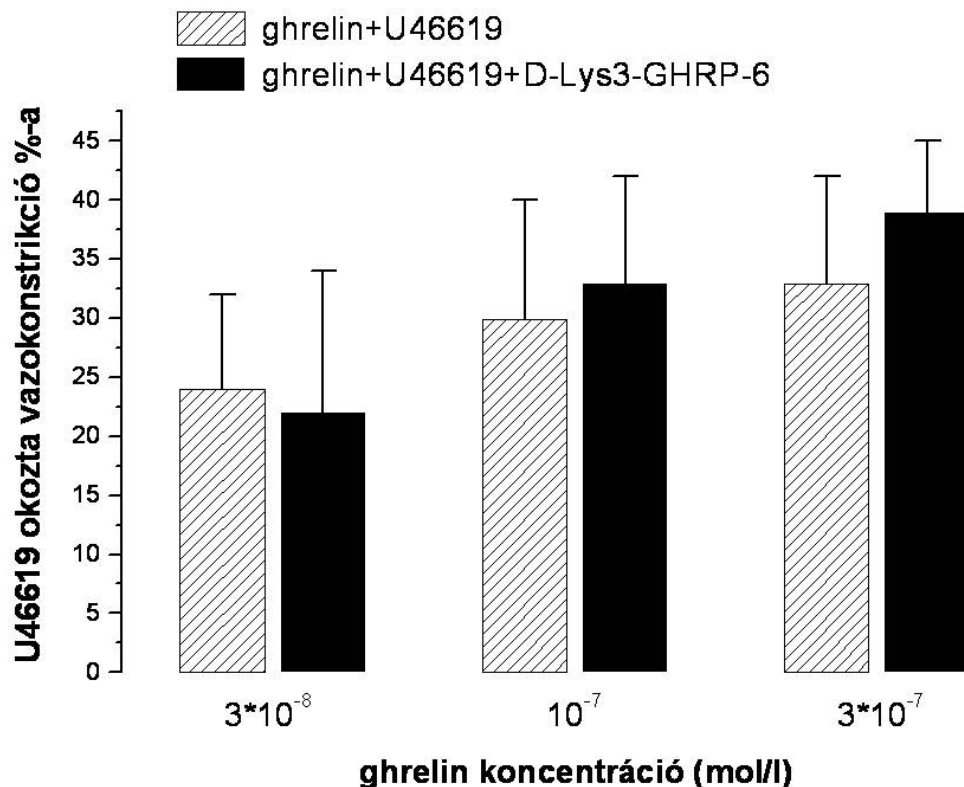


9. ÁBRA Ghrelin által kiváltott érátmérő-változások kutya koronária arteriolán spontán és megemelt értónus mellett. A ghrelin által kiváltott konstriktió a thromboxánanalóg U46619 (10^{-7} - 10^{-6} mol/l) által kiváltott átmérőcsökkenés százalékában került ábrázolásra. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ megemelt vs. spontán értónus; Student-féle párosított t-teszt; $n=6$ 1-10 nmol/l és $n=9-12$ 30-300 nmol/l koncentrációjú ghrelin esetén)

További kísérletekben a GHS-R1a receptor 50 $\mu\text{mol/L}$ D-Lys³-GHRP-6 adásával kiváltott blokádja nem gátolta a ghrelin által létrehozott vazokonstriktiót prekontrahált koronária arteriolákon. A megemelt tónusú ereken nem volt szignifikáns különbség a 30-300 nM ghrelin által kiváltott konstriktió mértékében GHS-R1a blokád előtt és alatt (10. ábra).

A D-Lys³-GHRP-6 érdekes módon – bár statisztikailag nem volt szignifikáns (n=8; p=0,15) – önmagában is vazokonstriktiót hozott létre (maximum az U46619 hatásának 26 \pm 16%-a).

A kísérletek végén 10 $\mu\text{mol/l}$ acetilkolin adására létrejött szignifikáns vazodilatáció alapján minden vizsgált arteriola intakt endotélfunkcióval rendelkezett a kísérletek során (+28 \pm 5% átmérőváltozás, n=20; p<0,01).



10. ÁBRA A GHS-R1a antagonistá D-Lys³-GHRP-6 (50 $\mu\text{mol/l}$) hatása a ghrelin által kiváltott vazokonstriktióra megemelt tónusú kutya koronária arteriolákon (U46619, 10^{-7} - 10^{-6} mol/l). A ghrelin által kiváltott konstriktió a thromboxán analóg U46619 (10^{-7} - 10^{-6} mol/l) által kiváltott átmérőcsökkenés százalékában került ábrázolásra. (n=8, n.s.)

5.3 SZÍVELÉGTÉLEN NAGYÁLLATMODELL EREDMÉNYEI

5.3.1 A szívelégtelenség kialakulásának echokardiográfias jelei

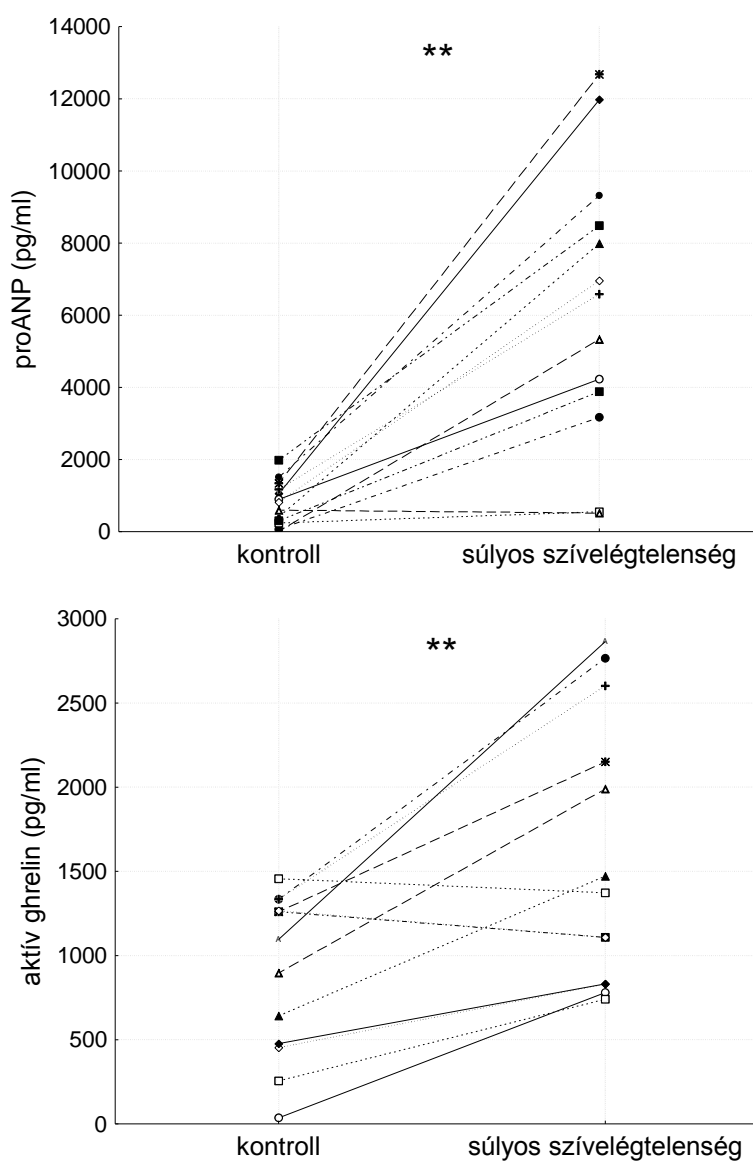
A tartós magas frekvenciájú jobb kamrai ingerlés mellett az állatoknál a humán NYHA IV stádiumnak megfeleltethető szívelégtelenség 22 ± 4 nap alatt alakult ki. A 240/perces jobb kamrai ingerlés mellett a beültetést megelőző állapothoz képest súlyos szívelégtelenségben az ejekciós frakció szignifikáns csökkenése, a mitralis regurgitatio növekedése, a bal kamrai üregméretek növekedése, valamint enyhe fokú jobb kamrai tágulat is kialakult. A vesefunkció (elsősorban az urea növekedésén keresztül) szintén szignifikáns romlást mutatott a beültetést megelőző állapothoz képest. A májfunkció (SGOT) nem változott szignifikánsan.

	kontroll	súlyos szívelégtelenség
EF (%)	62±3	22±3 **
LVEDD (mm)	37±1	44±1 **
LVESD (mm)	25±1	37±1 **
MI foka	0,1±0,1	2,8±0,2 **
RV (mm)	20±1	26±2 **
Kreatinin (umol/l)	62±4	79±6 *
Urea (mmol/l)	2,6±0,3	5,9±0,3 *
SGOT (U/l)	22±2	31±5

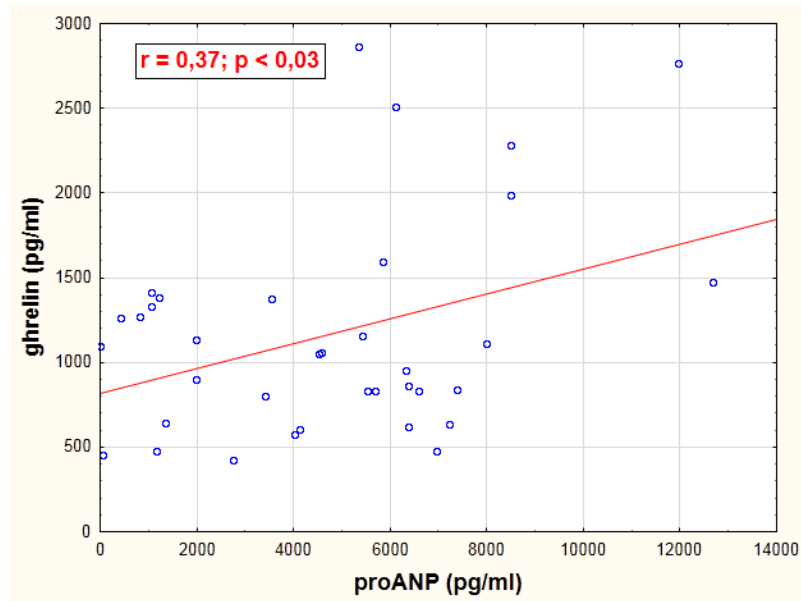
10. TÁBLÁZAT Echokardiográfias paraméterek, valamint a vese- és májfunkció változása a szívelégtelenség kialakulása alatt a szívelégtelenség gyors jobb kamrai ingerléssel kiváltott nagyállat (kutya) modelljében (átlag±SEM, * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ vs. kontroll; Student-féle párosított t-teszt, $n=13$).

5.3.2 Ghrelin és proANP változása a szívelégtelenség kialakulása során

Az állatoktól hetente levett vérmintákból proANP és acilált ghrelin meghatározást végeztünk (11. ábra). A proANP szint a súlyos szívelégtelenség elérésekor a beültetést megelőző állapothoz képest közel tízszeresére nőtt (6284 ± 1067 vs. 801 ± 167 pg/ml; $p < 0,01$). A ghrelin koncentráció esetében a súlyos szívelégtelenség kialakulásakor a kiindulási értékhez viszonyítva közel kétszeres növekedést mértünk (1586 ± 220 vs. 905 ± 132 pg/ml; $p < 0,01$). Az összes biokémiai eredmény vizsgálatokor a ghrelin és a proANP plazmakoncentráció között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk (12. ábra).



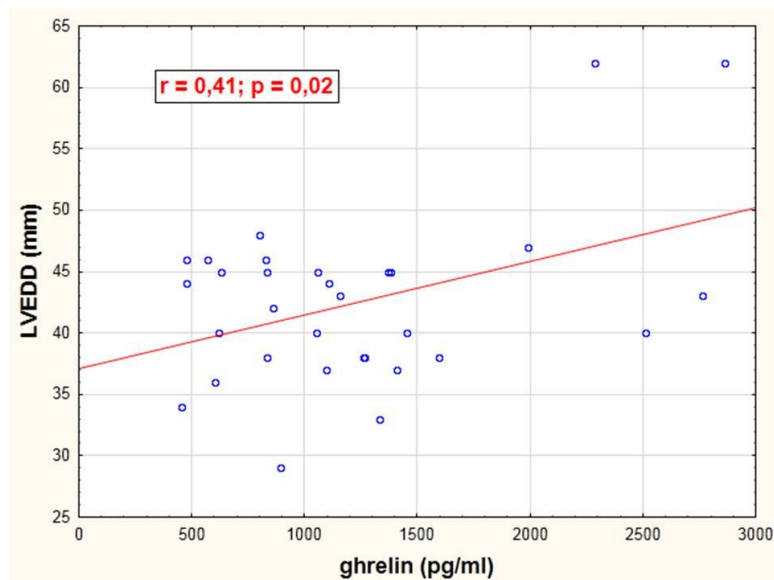
11. ÁBRA A proANP és ghrelin plazmakoncentrációjának változása állatonként a szívelégtelenség rapid jobb kamrai ingerléssel létrehozott modelljében (** $p < 0,01$ vs. kontroll; $n=13$).



12. ÁBRA A ghrelin és a proANP plazmakoncentrációjának összefüggése a szívelégtelenség kialakulása során.

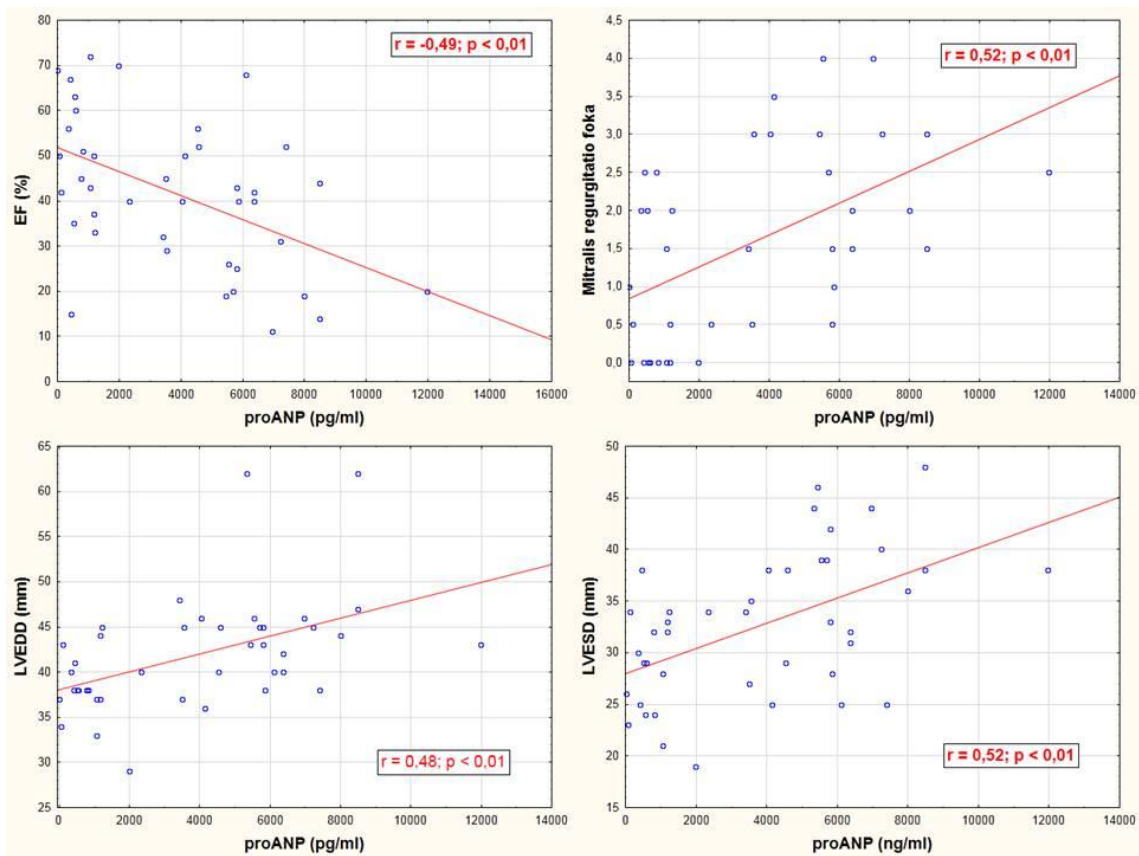
5.3.3 A ghrelin és proANP korrelációja echokardiográfias paraméterekkel

A plazma ghrelinkoncentráció a vizsgált echokardiográfias paraméterek közül a bal kamrai végdiasztolés átmérővel mutatott szignifikáns pozitív korrelációt ($r=0,41$; $p<0,02$; 13. ábra).



13. ÁBRA A ghrelin plazmakoncentráció és a bal kamrai végdiasztolés átmérő korrelációja a szívelégtelenség kialakulása során kutya modellben ($n=13$).

A szívelégtelenség kialakulása során megemelkedett proANP koncentráció negatív korrelációt mutatott az ejekciós frakcióval ($r=-0,49$; $p<0,01$), illetve pozitív korrelációt a mitrális regurgitáció fokával ($r=0,52$; $p<0,01$), valamint a bal kamrai végdiasztolés (LVEDD) és végszisztolés (LVESD) átmérővel (14. ábra). A vizsgált laborparaméterek, illetve a jobb kamrai paraméterek nem mutattak szignifikáns összefüggést sem a proANP, sem a ghrelin plazmaszintjének változásával.



14. ÁBRA A proANP koncentrációk korrelációja az ejekciós frakcióval (EF), a mitrális regurgitáció fokával, valamint a bal kamrai végdiasztolés (LVEDD) és végszisztolés (LVESD) átmérőkkel a szívelégtelenség kialakulása során kutya modellben ($n=13$).

6 MEGBESZÉLÉS

A dolgozatban ismertetett humán és állatkísérletes vizsgálatokkal a ghrelin kardiovaszkuláris szerepének eddig kevésbé tisztázott fejezeteihez kívántunk új eredményeket szolgáltatni. A humán perikardiális vizsgálatban az irodalomban először írtuk le mind az acilált, mind a dez-acil ghrelinforma jelenlétét a plazmáéhoz hasonló koncentrációban humán perikardiális folyadékban. Kimutattuk, hogy ischaemiás szívbetegségben mind az acilált ghrelin, mind az össz-ghrelin koncentrációja magasabb a nem ischaemiás (billentyűbeteg) csoporthoz képest a perikardiális folyadékban, ami a peptid fokozott miokardiális termelődésére utalhat krónikus szívizom-ischaemiában.

A korábban csak mechanikus kenőanyagként azonosított perikardiális folyadékról a közelmúlt vizsgálatai jóval árnyaltabb képet festenek. A perikardiális tér biológiailag aktív kompartment, amely kommunikál és egyensúlyt tart fent a szívizom interstíciumával, valamint a szív intracelluláris és intravaszkuláris folyadéktereivel. Miokardiális transzszudátumként a perikardiális folyadék szívizom eredetű endogén ágenseket akumulál, amelyek koncentrációja sok esetben jelentősen (akár többszörösen) meghaladja ezen ágensek szisztémás vérplazmában mérhető szintjét [111, 115, 117]. Kiemelendő, hogy ezek között több növekedési faktor is magas lokális koncentrációban van jelen, és ezáltal a perikardiális folyadék szívizom sejtvonalon proliferáció indukciójára képes [118, 120].

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy szívizomsejtek egyaránt expresszálják az elsősorban a gasztrointesztinális rendszerben termelődő ghrelin mRNS-ét, a ghrelin receptorok mRNS-ét, valamint az acilálásért felelős GOAT enzimet is, ami lokális, szívizombeli ghrelin rendszer jelenlétére, a termelődő ghrelin potenciális autokrin/parakrin hatásaira utal [2, 6, 8]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a peptid a perikardiális folyadékban is jelen lehet.

A ghrelin széleskörű kardioprotektív hatásokkal rendelkezik, többek között csökkenti az infarktus méretét, gátolja a szívizom remodellálódását, serkenti a miokardiális angiogenezist, csökkenti a szimpatikus aktivitást és a károsodott szívizom kamrai tachyarrhythmiák iránti fogékonyságát [74, 76, 77, 80, 82]. A kardioprotektív hatások ismeretében magunk a miokardiális ghrelin termelődését vizsgáltuk krónikus szívizom-ischaemiában szenvedő betegek és kontrollként billentyűbetegség miatt szívműtétre kerülő betegek perikardiális folyadékának vizsgálatán keresztül.

Eredményeink alapján az ischaemiás szívbetegek perikardiális fluidumában az acilált (aktív) ghrelin a billentyűbetegeknél kétszeresen nagyobb koncentrációban van jelen, míg a szisztémás vérplazmában szignifikáns különbség a betegcsoportok között nem mérhető. Ez tehát relatív perikardiális aktív ghrelin többletet jelent ischaemiás szívbetegek esetén. Az össz-ghrelin koncentráció (acilált és dezacil ghrelin összesen) nem mutatott szignifikáns különbséget sem a plazmában, sem a perikardiális folyadékban. Az acilált ghrelin mind a perikardiális folyadékban, mind a plazmában - irodalmi adatokhoz hasonlóan - a dez-acilált formához képest több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban fordult elő [11].

A szisztémásan keringő ghrelin mennyiségét számos faktor befolyásolja, amelyek a miokardiális ghrelintermelésre hipotetikusán szintén hatással lehetnek. A perikardiális ghrelinkoncentrációra ható szisztémás faktorok eliminálása érdekében a betegek aktív és össz-ghrelin koncentrációjából perikardiális/plazma arányt számoltunk. Az ischaemiás csoportban mind az aktív, mind az önmagában nem különböző össz-ghrelin tekintetében szignifikánsan magasabb perikardiális/plazma arányt találtunk, az aktív ghrelin esetén közel kétszeres különbséggel. Ez meglátásunk szerint arra utal, hogy a szív ghrelintermelésének szabályozása - legalábbis részben - független lehet a szisztémás ghrelinprodukción befolyásoló hatásoktól.

A magasabb perikardiális ghrelinszint ellenére az ischaemiás betegek plazmájában a kontrollcsoportéhoz képest enyhén, nem szignifikánsan alacsonyabb - más kutatócsoportok eredményeivel összehasonlítva kevésbé csökkent [85, 86] - acilált és össz-ghrelin koncentrációt mértünk. Abe és munkatársai eredményei szerint IGF-1 esetén hasonlóan ellenkező irányú változás észlelhető csökkent bal kamra funkcióval rendelkező betegek plazmájában és perikardiális folyadékában: a perikardiális IGF-1 szint magasabb, míg a plazma IGF-1 koncentráció a normál ejekciós frakciójú kontrollcsoportéhoz képest csökkent. Következtetésük szerint ez a kardiális IGF-1 rendszer működésének kompenzatórikus fokozódására utal csökkenő pumpafunkció esetén [119]. Mindezeket összevetve eredményeinkkel, a megnőtt aktív ghrelinszint a perikardiális folyadékban a krónikusan ischaemiás, de megtartott pumpafunkciójú szívizom lokális önvédelmi mechanizmusának fokozódására utalhat. Más vizsgálatok és saját állatkísérletes eredmények alapján a perikardiális fluidumban található ágensek képesek visszahatni a szívizom működésére [105, 113, 121]. A megnövekedett

perikardiális ghrelin koncentráció tehát képes lehet protektív hatásait kifejteni a miokardiumra.

A vizsgálatban összefüggéseket kerestünk a betegek kardiális és metabolikus paramétereit, valamint a perikardiális és plazma ghrelinszintek között. Az ischaemiás betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb szérumszintű össz-koleszterinszintet találtunk, amely ezen csoport jóval gyakoribb sztatinszedési gyakoriságával lehet összefüggésben. Ezen betegcsoportban gyakoribb volt a hipertónia és a cukorbetegség előfordulása is. Ugyanakkor nem találtunk különbséget a trigliceridszint és szénhidrát-háztartás paramétereit tekintetében, amelynek hátterében a diabéteszes betegek hatásos glikémiás kontrollja állhat.

A plazma össz-ghrelinszint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a testtömeg-indexszel és az inzulinrezisztenciával, amelyek jól ismert összefüggések az irodalomból [70, 130]. Ugyanakkor a perikardiális acilált és össz-ghrelinszint szintén negatív összefüggést mutatott a plazma inzulinszinttel és az inzulinrezisztenciát jelző HOMA-A indexszel. Ezen összefüggések a perikardiális ghrelin (részben) szisztémás eredetűre vagy az inzulin lokális, szívbeli ghrelinprodukcióna kifejtett szabályozó szerepére utalhatnak. Mivel a testtömeg-index nem mutatott összefüggést a perikardiális ghrelinszintekkel, ezért a perikardiális ghrelin kizárólagosan szisztémás eredetű valószínűtlen, és az inzulin lokális szabályozó szerepe a valószínűbb.

Az echokardiográfiás adatok szerint az ischaemiás betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb ejekciós frakció és nagyobb bal kamrai végdiasztolés átmérő mérhető a billentyűbetegekhez képest. Ugyanakkor ezen paraméterek mindkét csoportban még a normál tartományba estek. Nem találtunk különbséget a bal kamrai falvastagságok és izomtömeg, valamint a jobb kamrai átmérő vagy funkció (TAPSE) tekintetében.

Mivel az aortabillentyű szűkülete szubendokardiális ischaemiát okozhat, ezért megvizsgáltuk a billentyűbeteg csoporton belül a betegség típusának hatását a ghrelinszintekre. Nem mutatkozott szignifikáns különbség az aorta és mitralis billentyűbetegsége miatt operált betegek között sem a perikardiális, sem a plazma ghrelinkoncentrációk tekintetében.

A perikardiális ghrelin koncentrációk szignifikáns negatív korrelációt mutattak a végdiasztolés bal kamrai hátsó fal vastagsággal, ami a bal kamrai szabadfal szerepét támasztja alá a perikardiális ghrelin termelésében. Irodalmi adatok szerint az elégtelen

pumpafunkciójú szívizomban csökken a ghrelin expressziója [89]. A hipertrófiás, remodellálódott szívizomban feltételezésünk szerint ghrelin termelésének hasonló csökkenése lehetséges, ami magyarázhatja a hátsófal vastagsága és a perikardiális aktív és össz-ghrelinszint között észlelt negatív összefüggést.

A bal kamrai izomtömeg és a plazma össz-ghrelin koncentráció között ugyancsak negatív korrelációt találtunk. Mivel a bal kamrai izomtömeg és a testtömeg-index között pozitív korreláció áll fenn ($r=0,41$; $p<0,01$), a bal kamrai izomtömeg és a plazma össz-ghrelin közötti összefüggés vélhetően ezen – az irodalomban már leírt [130] – összefüggés következménye.

Összefoglalva tehát az ischaemiás betegcsoportban szignifikánsan magasabb perikardiális aktív ghrelin szintet találtunk a kontroll billentyűbetegekhez képest. Az echokardiográfiás és metabolikus paraméterekkel talált korrelációk alapján elmondható, hogy a lokális miokardiális ghrelinképződést az inzulinrezisztencia és a szívhipertrófia negatívan befolyásolhatja. Az eredmények a krónikusan ischaemiás szívizom fokozott ghrelintermelésére, ezáltal a peptidnek az ischaemiás szívizom autokrin és parakrin önvédelmi mechanizmusában betöltött fontos szerepére utalhatnak.

A szívizom által is termelt ghrelin lokális szívbéli szerepének ismeretében a peptid – az irodalmi adatok alapján eddig csak részlegesen ismert – direkt érhatását vizsgáltuk izolált koronária rezisztencia ereken. Mivel kutya specifikus antitestek nem álltak rendelkezésre, nyúlban termeltetett anti-humán GHS-R1a és 1b antitesteket használtunk a ghrelinreceptorok lokalizációjára kutyaszív mintákon. Western blot vizsgálattal validáltuk a humán antitestek szelektivitását kutya receptorokhoz, egyben igazoltuk azok jelenlétét a kutya szívizom mintában.

Az immunhisztokémiai festés során a miokardium enyhe immunpozitivitást mutatott a GHS-R1a antitestekre, míg markánsabb immunpozitivitás mutatkozott GHS-R1b festést követően. Eredményünket alátámasztja Gnanapavan és munkatársai közlése, mely szerint a szervezetben számos szövetben expresszálandó GHS-R1b mRNS-e a vizsgált humán szövetek között a második legnagyobb kópiaszámban a miokardiumban található meg. A GHS-R1a mRNS-e négy nagyságrenddel alacsonyabb kópiaszámban található meg a szívizomban az 1b receptorénál [8]. Ugyanakkor mindkét receptor antitestjével jelentős pozitívitást találtunk a koronária erek falában. A koszorúerek fala markánsan

festődött mindkét receptor antitestével az erek méretétől és az artériás rendszeren betöltött funkciójától függetlenül.

A GHS-R1b receptor szívben észlelt excesszív jelenlétének fiziológiai jelentősége nem ismert. Korábbi vizsgálatok szerint a receptor egyáltalán nem köti a ghrelint, azonban a közelmúlt eredményei alapján GHS-R1a-t nem, csak GHS-R1b-t expresszáló leukoblaszt sejtvonalon lehetséges autokrin ghrelinhatás [131]. A GHS-R1b ezen kívül heterodimereket képezhet a GHS-R1a receptorokkal, csökkentve azok konstitutív aktivitását [132]. A GHS-R1b által közvetített ghrelinhatások azonosítására további vizsgálatok szükségesek, ezek egyelőre specifikus GHS-R1b blokkoló szer hiányában nehezen megvalósíthatók.

Az izolált erekkel végzett vizsgálataink során a ghrelin a csak kis spontán tónussal rendelkező koronária arteriolákon nem váltott ki hatást. Ugyanakkor az U46619 tromboxán analóggal megnövelt (a fiziológiához közelebb álló) értónus mellett a ghrelin dóziszfüggő módon vazokonstriktiót volt képes kiváltani. A prekonstriktió szükségességét magyarázhatja, hogy az izolált, ezáltal denervált erek tónusa *in vivo* tónusuknál alacsonyabb, ezért sem dilatátor, sem konstriktor hatások nem tudhatnak az élőben tapasztaltnál hasonló mértékben felépülni. Eredményeinkhez hasonlóan egy másik munkacsoport is a ghrelin prekonstriktiótól függő vazokonstriktor hatását írta le humán mezenterialis és tengerimalac renális és femorális erekben. Vizsgálataikban a ghrelin önmagában nem váltott ki vaszkuláris választ, endotelin-1 előkezelésre volt szükség a peptid hatásának potenciózására [100-102]. A jelenség magyarázataként a ghrelinreceptor és az endotelin A receptor kölcsönhatását feltételezik az érsimaizomban intracellulárisan, másodlagos messenger szinten, a PLC, Rho-kináz, IP₃ által mediált Ca-felszabadulás útvonalon. Korábbi vizsgálatok alapján a GHS-R1a más G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal, például tromboxán A₂ (TXA₂) receptorral heterodimerizálódhat, és ezáltal módosulhat a receptor aktivitása [132, 133]. Eredményeink lehetséges magyarázata lehet tehát egy esetleges intracelluláris kölcsönhatás az U46619 által aktivált TXA₂ receptor és a ghrelin hatását közvetítő, eddig közelebbről nem azonosított receptor között. A ghrelin által okozott vazokonstriktió mérsékelt foka is ezen modulációs hatást valószínűsíti. A ghrelin ezen kívül – ez idáig közelebbről nem meghatározott – endotél eredetű kontraktilis

mediátorok felszabadulását is képes serkenteni [101]. Kísérleteinkben az arteriolák minden esetben ép endotéllel rendelkeztek, így ez utóbbi lehetőség sem zárható ki.

A ghrelin érszűkítő hatásának receptorális mechanizmusát a GHS-1a receptor gátlószerével, a D-Lys³-GHRP-6-tal vizsgáltuk. A gátlószeret meglehetősen magas dózisban, 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban adtuk a szervfürdőhöz, amely korábbi vizsgálatokban képes volt a ghrelin hatásának gátlására [134]. A magas koncentrációt az indokolta, hogy izolált éren nem rendelkezünk a gátlás hatékonyságát igazolni képes módszerrel (mint például szisztémás adás esetén a növekedési hormon elválasztásának mérése). Más vizsgálatokban az általunk alkalmazottnál alacsonyabb D-Lys³-GHRP-6 koncentráció is képes volt a ghrelin hatásának gátlására [135].

Érdekes módon maga az antagonist is képes volt enyhe konstriktiót okozni a megemelt tónusú ereken. Bár ez a hatás nem volt szignifikáns, az U46619 és a blokkoló szer együttes adása után 30 perces ekvilibrációs periódust iktattunk a protokollba. A ghrelin adása csak a stabil értónus kialakulása után történt. A D-Lys³-GHRP-6 simaizomkontrakciót okozó hatását más szerzők is leírták izolált patkány és csirke gasztrointesztinális izomcsíkokon [23, 134]. Kimutatták azt is, hogy az antagonist vérnyomásemelkedést és a szívfrekvencia fokozódását képes előidézni éber patkányokon [136]. A gasztrointesztinális izomcsíkokon észlelt konstriktor hatás a szerzők szerint az 5-HT_{2B} szerotonin receptor közvetítésével jön létre. Mivel ezen receptorok az érrendszerben is megtalálhatók, a vazokonstriktor hatás hátterében is hasonló mechanizmus feltételezhető.

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a ghrelin vazokonstriktor hatása nem a GHS-R1a receptoron keresztül jön létre. Eredményünk összhangban van számos korábbi, GHS-R1a knock-out egereken és receptor blokkolószerekkel végzett vizsgálat eredményével, amelyekben a ghrelinhatások hátterében GHS-R1a receptortól független hatásokat írtak le. Mindezek a GHS-R1-től különböző ghrelinreceptorok létezését valószínűsítették. Példa erre többek között a ghrelin lipolízist gátló hatása [17], izolált tengerimalac papilláris izmokon leírt negatív inotróp hatása [19, 20] és antiapoptotikus hatása [18], amelyek mind a GHS-R1a-tól különböző receptorokon keresztül jön létre. Érdekes módon a peptid patkány izolált mezenterális érpályán észlelt vazodilatátor hatása szintén GHS-R1a receptortól függetlennek bizonyult (bár itt az alkalmazott D-Lys³-GHRP-6 koncentrációja lényegesen alacsonyabb volt az általunk alkalmazottnál) [95].

A GHS-R1a receptor koronáriaerek falában kimutatott jelenléte ellenére eredményeink alapján tehát nem ez a ghrelin receptor közvetíti a peptid konstriktor hatását. A GHS-R1b receptor altípus excesszív jelenléte a miokardiumban és a koszorúerek falában felvetheti ezen receptor közreműködését az érhatás kiváltásában, azonban ennek kísérletes vizsgálata speciális gátlószer hiányában nem történhetett meg. A ghrelin vazokonstriktor hatásának közvetítésében több más receptor közreműködése is feltételezhető. Ilyen például a CD36 scavenger receptor, amely Bodart és munkatársainak vizsgálata alapján egy szintetikus ghrelinanalóg, a hexarelin koszorúérellenállás-növelő hatását közvetíti Langendorff szerint perfundált izolált patkányszíven [15]. Eddig nem ismert GHS-R altípus jelenléte szintén feltételezhető a kísérletes adatok metaanalízisével. Az ezzel kapcsolatos ismereteket a 2. táblázat foglalja össze.

Izolált ereken végzett vizsgálatunk elsődleges célja a ghrelin koronária rezisztenciaerekre kifejtett hatásának karakterizálása volt. A kutyából izolált koronária ereken tapasztalt konstriktor hatás hasonló a más munkacsoportok által patkány és malac koszorúereken tapasztalt ghrelinhatáshoz [98, 99]. Más szervekben és érterületeken a ghrelin direkt érhatása azonban továbbra is ellentmondásos, hiszen a különböző fajon és érterületen, különböző peptid dózissal végzett vizsgálatok eltérő eredményekre vezettek. Megemelt értónus mellett például izoláltan perfundált, *ex vivo* mezenteriális érterületen patkányokban vazodilatációt, míg izolált humán mezenteriális ereken *in vitro* vazokonstriktációt okozott a ghrelin [95, 100]. A perifériás keringési hatások tekintetében ugyancsak eltérések észlelhetők: a peptid humán brachiális artériába adva vazodilatációt, míg tengerimalac izolált femorális artérián dóziszfüggő módon vazokonstriktációt okoz [93, 102].

Izolált koszorúéren végzett kísérleteinkből levonható következtetések alapján megállapítható, hogy a GHS-R1a és GHS-R1b receptorok jelen vannak a szívizomban, valamint epikardiális artériák és intramurális arteriolák falában egyaránt kutya szívmintákon. A ghrelin nem váltott ki hatást spontán tónusú ereken, de megemelt értónus mellett dóziszfüggő módon konstriktációt hozott létre kutya intramurális koronária rezisztenciaereken. Ezen tónusfüggő hatást a GHS-R1a receptorblokádnem befolyásolta. Korábbi vizsgálatok eredményével összevetve ez tehát a GHS-R1a receptortól különböző, aktív ghrelinreceptor jelenlétét valószínűsíti koszorúereken.

A ghrelin vazokonstriktor hatás élettani jelentőségére a kísérletek nem adnak választ. A vizsgálatokat egészséges állatokból izolált ereken hajtottuk végre, így atheroszklerotikus ereken vagy ischaemiás körülmények között létrejövő érválaszokkal kapcsolatban következtetést nem tudunk levonni. Ugyanakkor a tónusfüggő vazokonstrikciónak lehet élettani szerepe az ischaemiás szívizom egyenlőtlen vérellátási viszonyainak szabályozásában. Az ischaemiás területet ellátó kollaterális erek mérettartománya a vizsgálatban tanulmányozott arteriolák tartományába esik, ezért feltételezhető, hogy a ghrelin által okozott enyhe-mérsékelt vazokonstrikciónak is részt vehet ezen erek tónusának finomhangolásában, és csökkentheti az áramlási viszonyok egyenlőtlenségeit, különösen az ischaemiás terület széli zónájában. Az itt található erek egyes tónusának homogenizálása által létrejövő homogénebb vérellátási mintázat csökkentheti a károsodott szívizom területét és az aritmogenitást.

A szívelégtelenség kóréletana és a kialakulásának monitorozására alkalmas biomarkerek kutatása igen aktuális téma az irodalomban. A nátriuretikus peptideken túl a közelmúltban számos – elsősorban nem kardiális eredetű – regulátor peptid bizonyult a szívelégtelenség kórfolyamatainak követésére alkalmas biomarkernek. A ghrelin kardioprotektív és orexigén hatásait tekintve szerepet játszhat a szívelégtelenség és az ezt kísérő kardiális cachexia ellensúlyozásában. Az irodalmi adatok szerint terminális szívelégtelenségben egyfajta ghrelinrezisztencia alakul ki, a keringő ghrelin koncentrációjának és a GHS-R1a receptor expressziójának növekedésével [89, 90]. Szívelégtelenségben az exogén ghrelinbevitel javítja a szívfunkciót, csökkenti a szimpatikus tónust, növeli az izomerőt és képes a kardiális cachexia csökkentésére [64, 91, 92]. A fenti jótékony hatások legalább részben a növekedési hormon elválasztásának serkentésén alapulhatnak, ugyanis az eddig közölt kisszámú kísérletes vizsgálatban a ghrelin izolált papilláris izmon negatív inotróp hatást fejtett ki [19, 20].

A peptid lehetséges biomarker szerepét vizsgálva, a szívelégtelenség kialakulása során bekövetkező változásának tanulmányozásához célunk volt egy megbízható, reprodukálható nagyállatmodell beállítása.

Az irodalomban ismert modellek közül a viszonylag kis műtéti megterhelés és könnyű programozhatóság miatt a gyors jobb kamrai ingerlés kutyamodelljét választottuk. A saját protokoll szerint DDD típusú pacemakert implantáltunk az állatokba, mindkét elektródot a jobb kamrában rögzítve. Az AV-idő megfelelő beállításával így egyenletes,

gyors kamrai ingerlés érhető el. A 240/min frekvenciájú ingerlés mellett a humán NYHA IV stádiumnak megfeleltethető szívelégtelenség körülbelül három hét alatt alakult ki az állatoknál. A pacemaker beültetésekor és ezt követően hetente elvégzett echokardiográfiás vizsgálat minden esetben a bal kamrai ejekciós frakció jelentős csökkenését, a bal és jobb kamrai végdiasztolés átmérő, valamint a mitralis és tricuspidalis regurgitatio szignifikáns növekedését írta le.

A csökkenő szívfunkcióval párhuzamosan a kezdődő célszervkárosodás jelei, a beszűkülő vesefunkció és a májenzimek enyhe emelkedése is megjelent. A beállított nagyállat modell tehát reprodukálhatónak és alkalmasnak bizonyult a krónikus szívelégtelenség modellezésére.

Az így kialakított modellben vizsgálni kívántuk a plazma ghrelin és kontrollként a szívelégtelenség ismert és validált biomarkere, a proANP koncentráció változását, valamint ezek korrelációját a szívelégtelenség kialakulását jellemző echokardiográfiás és laborparaméterekkel. Mind a ghrelin, mind a proANP szintje megemelkedett a szívelégtelenség kialakulása során. A proANP szint esetében a súlyos szívelégtelenség elérésekor a beültetést megelőző kontroll mintához képest tízszeres növekedést találtunk. Az aktív ghrelin koncentráció esetében a NYHA IV-nek megfeleltethető, súlyosan szívelégtelen stádium kialakulásakor a kiindulási értékhez képest közel kétszeres növekedést mértünk. A két peptid közötti összefüggést vizsgálva az összes mintában az aktív ghrelin és a proANP plazmakoncentrációja között mérsékelt erősségű ($r=0,37$), de szignifikáns pozitív korrelációt találtunk.

Megvizsgáltuk a két peptid plazmakoncentrációjának összefüggését az echokardiográfiás és laborparaméterekkel. A ghrelin a vizsgált paraméterek közül a bal kamrai végdiasztolés átmérővel mutatott szignifikáns pozitív korrelációt, míg a proANP koncentráció negatív korrelációt mutatott az ejekciós frakcióval, illetve pozitív korrelációt a mitralis regurgitatio fokával, valamint a bal kamrai végdiasztolés és végszisztolés átmérővel.

Eredményeink alapján tehát a gyors jobb kamrai ingerléssel kiváltott krónikus szívelégtelenség kutyákban alkalmas modell lehet a kórkép biomarkereinek vizsgálatára. A plazma ghrelinkoncentrációjának emelkedése a szívelégtelenség funkcionális stádiumának függvényében, valamint szignifikáns korrelációja a plazma proANP koncentrációval és a bal kamrai tágulattal felveti a peptid lehetséges biomarker

szerepét a szívelégtelenség kialakulása során. A ghrelin, mint szívelégtelenség biomarker diagnosztikus, illetve prediktív értékének meghatározásához további kísérletes és humán vizsgálatok elvégzése szükséges.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattuk, hogy a humán perikardiális folyadékban mind az acilált, mind a dez-acil ghrelinforma a plazmában mérhetőhöz hasonló mennyiségben van jelen.
2. Ischaemiás szívbetegségben az aktív ghrelin perikardiális koncentrációja magasabb a non-ischaemiás, billentyűbeteg csoporthoz képest, ami a peptid fokozott miokardiális termelődésére utal krónikus szívizom-ischaemiában.
3. A perikardiális acilált ghrelin koncentrációját az inzulinrezisztencia és a szívhipertrofia negatívan befolyásolja szívbetegekben.
4. Igazoltuk, hogy a GHS-R1a és GHS-R1b ghrelin receptorok jelen vannak mind a szívizomban, mind a koronária arteriolák falában kutya mintákban.
5. A ghrelin farmakológiai dózisa megemelt értónus mellett dózisfüggő érszűkítő hatást váltanak ki izolált kutya koronária arteriolákon, amely nem a GHS-R1a ghrelin receptoron keresztül jön létre.
6. A plazma ghrelinkoncentráció szignifikáns megemelkedése a szívelégtelenség kialakulása során, valamint korrelációja a proANP plazmaszintjével a szívelégtelenség gyors jobb kamrai ingerléssel létrehozott kutyamodelljében felveti a peptid lehetséges biomarker szerepét.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban foglalt vizsgálatok a ghrelin, egy elsősorban a gyomorban termelődő, peptid hormon kardiovaszkuláris szabályozásban betöltött szerepének kevésbé tisztázott fejezeteihez kívánnak eredményeket szolgáltatni. A ghrelin szerteágazó hatásokkal, köztük kardioaktív hatásokkal rendelkezik. Mind a peptid, mind receptorai, illetve az aktivitáshoz szükséges acilálásért felelős enzim megtalálható a szívben, így lokálisan működő ghrelin rendszer létezése feltételezhető. A ghrelin szívizom-ischaemiában betöltött szerepét vizsgálandó lokális (perikardiális) és szisztémás (plazma) ghrelin koncentrációt mértünk szív műtetre kerülő ischaemiás szívbetegknél és kontrollként billentyűbetegknél. Mivel a perikardiális fluidum eredetét tekintve főként miokardiális transzszudátum, a perikardiális folyadékban mérhető ágensek koncentrációja jól tükrözheti azok miokardiális szintjét. A krónikus szívizom-ischaemiában szenvedő betegek perikardiális mintáiban az aktív ghrelin szintje szignifikánsan magasabb volt a kontrollokhoz képest. A betegek perikardiális ghrelin koncentrációját negatívan befolyásolta a bal kamrai hypertrophia és az inzulinrezisztencia.

A ghrelin direkt érhatására vonatkozó ismeretek ellentmondásosak: fajtól, érterülettől, értónustól függően értágító vagy érszűkítő hatás egyaránt leírásra került. Immunhisztokémiával mindkét ghrelinreceptor (GHS-R 1a és 1b) jelenlétét igazoltuk a szívizomban és a koronáriák falában kutya szívizom-mintákban. Izolált kutya koronária arteriolákon végzett mikroarteriográfia eredményei alapján a ghrelin megemelt értónus mellett koronária konstriktor hatással bír, amelyet nem a GHS-R1a közvetít.

A közelmúltban számos, elsősorban nem kardiális eredetű szabályozó peptid, így a ghrelin is a szívelégtelenség lehetséges biomarkereként került azonosításra. Ennek vizsgálatára a krónikus szívelégtelenség nagyállat modelljét állítottuk be gyors jobb kamrai ingerléssel. Az állatoknál 22 ± 4 nap alatt súlyosan csökkent bal kamra funkció és bal kamrai tágulat, valamint növekvő mitrális regurgitáció alakult ki, amelyek jól korreláltak a plazma proANP szinttel. A ghrelin plazmaszintje szignifikánsan megemelkedett a szívelégtelenség kialakulása során, és pozitívan korrelált a proANP koncentrációval és a bal kamrai tágulattal. Eredményeink alapján a rapid kamrai ingerléssel létrehozott modell alkalmas a szívelégtelenség biomarkereinek vizsgálatára. A ghrelin koncentráció emelkedése és korrelációja a proANP-vel és echokardiográfias paraméterekkel felveti a ghrelin lehetséges új biomarker szerepét szívelégtelenségben.

9 SUMMARY

The studies involved in the dissertation all aimed to clarify unclear issues of the cardiovascular effects of ghrelin, a regulatory peptide of primarily gastrointestinal origin with multiple functions including cardioprotective effects. The peptide, its receptors and the activating octanoyl acyl transfer enzyme (GOAT) are all produced in the myocardium referring to a locally acting ghrelin system in the heart. To assess the role of ghrelin in myocardial ischemia we aimed to measure local myocardial (pericardial) and plasma ghrelin levels of patients with ischemic and non-ischemic valvular heart disease. Pericardial fluid has been proven to be a biologically active compartment of the heart that communicates with the myocardial interstitium. Thus, pericardial level of certain agents may reflect their myocardial concentration well. Pericardial active ghrelin levels were found to be significantly higher in patients with chronic myocardial ischemia. According to our results, pericardial ghrelin content is negatively influenced by left ventricular hypertrophy and insulin resistance.

As contradictory data are available on the vascular actions of ghrelin in different organs and species, we aimed to characterize the direct effect of the peptide on canine coronaries. Presence of GHS-R 1a and 1b subtypes in canine myocardial samples and coronary arterioles was confirmed with immunohistochemistry. Microarteriography study on isolated canine coronary arterioles showed that ghrelin is able to induce significant constriction on vessels with elevated vascular tone. This vasoconstrictor effect is not mediated by GHS-R1a.

Recently, several regulatory peptides - primarily of non-cardiac origin - including ghrelin were suggested to be potential biomarkers of heart failure. We established a large animal model of chronic heart failure in dogs with rapid right ventricular pacing. Heart failure with seriously impaired left ventricular function, dilation of left ventricle and increasing mitral regurgitation developed after 22 ± 4 days of pacing. The above changes showed significant correlation with plasma proANP level. Plasma level of ghrelin significantly increased during the development of heart failure and was found to be positively correlated with proANP level and with left ventricular dilation. These results suggest the possible use of ghrelin as a novel biomarker of heart failure.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-60.
2. Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. (2004) Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 62: 481-8.
3. Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP. (2006) Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res*, 69: 227-35.
4. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. (2000) Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275: 21995-2000.
5. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132: 387-96.
6. Lim CT, Kola B, Grossman A, Korbonits M. (2011) The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr J*, 58: 707-10.
7. Yang J, Zhao TJ, Goldstein JL, Brown MS. (2008) Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10750-5.
8. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2988.

9. Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori Y, Sugimoto H. (2010) Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology*, 151: 4765-75.
10. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*, 143: 1353-61.
11. Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR. (2005) Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 2205-11.
12. Kojima M, Kangawa K. (2002) Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol*, 2: 665-8.
13. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol*, 17: 2201-10.
14. Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. (2007) Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology*, 86: 147-64.
15. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90: 844-849.
16. Leite-Moreira AF, Rocha-Sousa A, Henriques-Coelho T. (2008) Cardiac, skeletal, and smooth muscle regulation by ghrelin. *Vitam Horm*, 77: 207-38.

17. Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. (2004) Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*, 498: 27-35.
18. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A. (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*, 159: 1029-37.
19. Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. (2003) Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*, 476: 87-95.
20. Soares JB, Rocha-Sousa A, Castro-Chaves P, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF. (2006) Inotropic and lusitropic effects of ghrelin and their modulation by the endocardial endothelium, NO, prostaglandins, GHS-R1a and KCa channels. *27*: 1616-23.
21. Tullin S, Hansen BS, Ankersen M, Moller J, Von Cappelen KA, Thim L. (2000) Adenosine is an agonist of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 141: 3397-402.
22. Carreira MC, Camina JP, Smith RG, Casanueva FF. (2004) Agonist-specific coupling of growth hormone secretagogue receptor type 1a to different intracellular signaling systems. Role of adenosine. *Neuroendocrinology*, 79: 13-25.
23. Depoortere I, Thijs T, Peeters T. (2006) The contractile effect of the ghrelin receptor antagonist, D-Lys3-GHRP-6, in rat fundic strips is mediated through 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol*, 537: 160-5.

24. Sibilgia V, Muccioli G, Deghenghi R, Pagani F, De Luca V, Rapetti D, Locatelli V, Netti C. (2006) Evidence for a role of the GHS-R1a receptors in ghrelin inhibition of gastric acid secretion in the rat. *J Neuroendocrinol*, 18: 122-8.
25. Serby MD, Zhao H, Szczepankiewicz BG, Kosogof C, Xin Z, Liu B, Liu M, Nelson LT, Kaszubska W, Falls HD, Schaefer V, Bush EN, Shapiro R, Droz BA, Knourek-Segel VE, Fey TA, Brune ME, Beno DW, Turner TM, Collins CA, Jacobson PB, Sham HL, and Liu G. (2006) 2,4-diaminopyrimidine derivatives as potent growth hormone secretagogue receptor antagonists. *J Med Chem*, 49: 2568-78.
26. Xin Z, Zhao H, Serby MD, Liu B, Schaefer VG, Falls DH, Kaszubska W, Collins CA, Sham HL, Liu G. (2005) Synthesis and structure-activity relationships of isoxazole carboxamides as growth hormone secretagogue receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 15: 1201-4.
27. Demange L, Boeglin D, Moulin A, Mousseaux D, Ryan J, Berge G, Gagne D, Heitz A, Perrissoud D, Locatelli V, Torsello A, Galleyrand JC, Fehrentz JA, Martinez J. (2007) Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. *J Med Chem*, 50: 1939-57.
28. Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ, Jr., Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev*, 18: 621-45.
29. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, and Van der Ploeg LH. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273: 974-7.

30. Han XF, Zhu YL, Hernandez M, Keating DJ, Chen C. (2005) Ghrelin reduces voltage-gated potassium currents in GH3 cells via cyclic GMP pathways. *Endocrine*, 28: 217-24.
31. Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*, 52: 948-56.
32. Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. (2008) Ghrelin raises [Ca²⁺]_i via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 366: 388-92.
33. Cunha SR, Mayo KE. (2002) Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogues potentiate GH-releasing hormone (GHRH)-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in cells expressing transfected GHRH and GH secretagogue receptors. *Endocrinology*, 143: 4570-82.
34. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. (2006) Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol*, 20: 1772-85.
35. Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S, Ito T, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. (2006) The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res*, 66: 9408-19.
36. Chu KM, Chow KB, Leung PK, Lau PN, Chan CB, Cheng CH, Wise H. (2007) Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 752-64.

37. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. (2007) Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology*, 148: 512-29.
38. Delhanty PJ, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP. (2006) Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol*, 188: 37-47.
39. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ. (2005) Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 1055-60.
40. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. (2006) Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 147: 2306-14.
41. Gauna C, Delhanty PJ, van Aken MO, Janssen JA, Themmen AP, Hofland LJ, Culler M, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. (2006) Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 251: 103-11.
42. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108: 785-91.

43. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H. (2005) EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *Faseb J*, 19: 1869-71.
44. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 4908-11.
45. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. (2000) Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 477-80.
46. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: R1483-7.
47. Savino F, Grassino EC, Fissore MF, Guidi C, Liguori SA, Silvestro L, Oggero R, Miniero R. (2006) Ghrelin, motilin, insulin concentration in healthy infants in the first months of life: relation to fasting time and anthropometry. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65: 158-62.
48. Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. (2004) Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides*, 25: 1269-77.
49. Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS. (2004) The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 18: 2291-301.

50. Maccarinelli G, Sibilia V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. (2005) Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol*, 184: 249-56.
51. Zhang W, Zhao L, Mulholland MW. (2007) Ghrelin stimulates myocyte development. *Cell Physiol Biochem*, 20: 659-64.
52. Tian PY, Fan XM. (2012) The proliferative effects of ghrelin on human gastric cancer AGS cells. *J Dig Dis*, 13: 453-8.
53. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5992.
54. Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, Frost G, Ghatei MA, Small C, Bloom SR. (2005) Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)*, 29: 1130-6.
55. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. (2001) Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 904-7.
56. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2000) Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 905-8.
57. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50: 1714-9.
58. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50: 707-9.

59. Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N. (2003) Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*, 9: 774-8.
60. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 145: 669-73.
61. DeBoer MD. (2011) Ghrelin and cachexia: will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? *Mol Cell Endocrinol*, 340: 97-105.
62. DelParigi A, Tschop M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni PA. (2002) High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 5461-4.
63. Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR. (2004) Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2832-6.
64. Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. (2004) Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 110: 3674-9.
65. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. (2009) Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J*, 56: 1119-28.
66. Allas S, Abribat T. (2013) Clinical perspectives for ghrelin-derived therapeutic products. *Endocr Dev*, 25: 157-66.

67. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. (2001) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5083-6.
68. Chuang JC, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, Zigman JM. (2011) Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol*, 25: 1600-11.
69. Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschop MH, D'Alessio D. (2010) Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*, 59: 2145-51.
70. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. (2003) Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5747-52.
71. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. (2002) Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3997-4000.
72. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M. (2004) Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*, 43: 977-82.
73. Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, Abe I, Iida M. (2002) Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension*, 40: 694-9.
74. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C. (2004) Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43: 165-170.

75. Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. (2003) Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. *Basic Res Cardiol*, 98: 401-5.
76. Huang CX, Yuan MJ, Huang H, Wu G, Liu Y, Yu SB, Li HT, Wang T. (2009) Ghrelin inhibits post-infarct myocardial remodeling and improves cardiac function through anti-inflammation effect. *Peptides*, 30: 2286-91.
77. Soeki T, Kishimoto I, Schwenke DO, Tokudome T, Horio T, Yoshida M, Hosoda H, Kangawa K. (2008) Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H426-32.
78. Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Cragg PA, Shirai M, Kangawa K. (2012) One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction. *Endocrinology*, 153: 2436-43.
79. Pettersson I, Muccioli G, Granata R, Deghenghi R, Ghigo E, Ohlsson C, Isgaard J. (2002) Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J Endocrinol*, 175: 201-9.
80. Wang L, Chen Q, Li G, Ke D. (2012) Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Peptides*, 33: 92-100.
81. Yuan MJ, He H, Hu HY, Li Q, Hong J, Huang CX. (2012) Myocardial angiogenesis after chronic ghrelin treatment in a rat myocardial infarction model. *Regul Pept*, 179: 39-42.
82. Yuan MJ, Huang H, Tang YH, Wu G, Gu YW, Chen YJ, Huang CX. (2011) Effects of ghrelin on Cx43 regulation and electrical remodeling after myocardial infarction in rats. *Peptides*, 32: 2357-61.

83. Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Nakanishi M, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. (2012) Ghrelin prevents incidence of malignant arrhythmia after acute myocardial infarction through vagal afferent nerves. *Endocrinology*, 153: 3426-34.
84. Baessler A, Fischer M, Mayer B, Koehler M, Wiedmann S, Stark K, Doering A, Erdmann J, Riegger G, Schunkert H, Kwitek AE, Hengstenberg C. (2007) Epistatic interaction between haplotypes of the ghrelin ligand and receptor genes influence susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease. *Hum Mol Genet*, 16: 887-99.
85. Kadoglou NP, Lampropoulos S, Kapelouzou A, Gkontopoulos A, Theofilogiannakos EK, Fotiadis G, Kottas G. (2010) Serum levels of apelin and ghrelin in patients with acute coronary syndromes and established coronary artery disease--KOZANI STUDY. *Transl Res*, 155: 238-46.
86. Zhang M, Fang W, Yuan F, Qu X, Liu H, Chen H, Yu Y, Zheng Z, Shen Y. (2011) Plasma ghrelin levels are closely associated with stenosis severity and morphology of angiographically-detected coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 151: 122-3.
87. Zhang M, Fang WY, Yuan F, Qu XK, Liu H, Xu YJ, Chen H, Yu YF, Shen Y, Zheng ZC. (2012) Plasma ghrelin levels are closely associated with severity and morphology of angiographically-detected coronary atherosclerosis in Chinese patients with diabetes mellitus. *Acta Pharmacol Sin*.
88. Voros K, Prohaszka Z, Kaszas E, Alliquander A, Terebesy A, Horvath F, Janik L, Sima A, Forrai J, Cseh K, Kalabay L. (2012) Serum ghrelin level and TNF-alpha/ghrelin ratio in patients with previous myocardial infarction. *Arch Med Res*, 43: 548-54.
89. Beiras-Fernandez A, Kreth S, Weis F, Ledderose C, Pottinger T, Dieguez C, Beiras A, Reichart B. (2010) Altered myocardial expression of ghrelin and its receptor (GHSR-1a) in patients with severe heart failure. *Peptides*, 31: 2222-8.

90. Lund LH, Williams JJ, Freda P, LaManca JJ, LeJemtel TH, Mancini DM. (2009) Ghrelin resistance occurs in severe heart failure and resolves after heart transplantation. *Eur J Heart Fail*, 11: 789-94.
91. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. (2001) Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*, 104: 1430-5.
92. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 104: 5854-9.
93. Okumura H, Nagaya N, Enomoto M, Nakagawa E, Oya H, Kangawa K. (2002) Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39: 779-83.
94. Wiley KE, Davenport AP. (2002) Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: Ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol*, 136: 1146-1152.
95. Moazed B, Quest D, Gopalakrishnan V. (2009) Des-acyl ghrelin fragments evoke endothelium-dependent vasodilatation of rat mesenteric vascular bed via activation of potassium channels. *Eur J Pharmacol*, 604: 79-86.
96. Shinde UA, Desai KM, Yu C, Gopalakrishnan V. (2005) Nitric oxide synthase inhibition exaggerates the hypotensive response to ghrelin: role of calcium-activated potassium channels. *J Hypertens*, 23: 779-84.
97. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. (2001) [125I-His9]-Ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 134: 143-149.
98. Grossini E, Molinari C, Mary DASG, Ghigo E, Bona G, Vacca G. (2007) Intracoronary ghrelin infusion decreases coronary blood flow in anesthetized pigs. *Endocrinology*, 148: 806-812.

99. Pemberton CJ, Tokola H, Bagi Z, Koller A, Pontinen J, Ola A, Vuolteenaho O, Szokodi I, Ruskoaho H. (2004) Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H1522-9.
100. Dimitrova DZ. (2006) Contractile effect of ghrelin on isolated human mesenteric arteries. *CR Acad Bulg Sci*, 59: 853-858.
101. Dimitrova DZ, Mihov DN, Wang R, Hristov KL, Rizov LI, Bolton TB, Duridanova DB. (2007) Contractile effect of ghrelin on isolated guinea-pig renal arteries. *Vascul Pharmacol*, 47: 31-40.
102. Mladenov MI, Hristov KL, Dimitrova DZ, Schubert R, Lubomirov LT, Gjorgoski IK, Duridanova DB, Gagov HS. (2008) Ghrelin signalling in guinea-pig femoral artery smooth muscle cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 194: 195-206.
103. Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM, Jr. (1990) Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. *Am J Physiol*, 258: H1642-9.
104. Tietjan CS, Tribble CG, Gidday JM, Phillips CL, Belardinelli L, Rubio R, Berne RM. (1990) Interstitial adenosine in guinea pig hearts: an index obtained by epicardial disks. *Am J Physiol*, 259: H1471-6.
105. Zima E, Kekesi V, Nagy A, Losonczy L, Toma I, Soos P, Barat E, Huszar E, Merkely B, Horkay F, Juhasz-Nagy A. (2002) Endothelin-1-induced elevations in purine metabolite concentrations -- autoregulatory protection in the canine pericardium? *Clin Sci (Lond)*, 103 Suppl 48: 202S-205S.
106. Gibson AT, Segal MB. (1978) A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. *J Physiol*, 277: 367-77.
107. Driver AG, Kukoly CA, Spence PA, Chitwood WR, Jr., Mustafa SJ. (1995) Pericardial fluid adenosine in ischemic and valvular heart disease. *Chest*, 107: 346-51.

108. Klemola R, Laine M, Weckstrom M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Huttunen P, Leppaluoto J. (1995) High concentrations of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in rat pericardial fluid and their reduction by reserpine in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 352: 331-6.
109. Szokodi I, Horkay F, Kiss P, Selmecci L, Merkely B, Kekesi V, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. (1997) Characterization and stimuli for production of pericardial fluid atrial natriuretic peptide in dogs. *Life Sci*, 61: 1349-59.
110. Horkay F, Laine M, Szokodi I, Leppaluoto J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. (1995) Human pericardial fluid contains the highest amount of endothelin-1 of all mammalian biologic fluids thus far tested. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26: S502-4.
111. Horkay F, Szokodi I, Selmecci L, Merkely B, Kekesi V, Vecsey T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. (1998) Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life Sci*, 62: 267-74.
112. Klemola R, Huttunen P, Laine M, Weckstrom M, Hirvonen J. (1999) Catecholamines in pericardial fluid of normotensive, spontaneously hypertensive and reserpine-treated rats. *Acta Physiol Scand*, 165: 293-7.
113. Nagy A, Sax B, Entz L, Jr., Barat E, Toma I, Becker D, Merkely B, Kekesi V. (2009) Comparison of elimination and cardiovascular effects of adenine nucleosides administered intrapericardially or intravenously in anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54: 341-7.
114. Turbucz P, Kiss P, Horkay F, Szokodi I, deChatel R, Selmecci L, Juhasz-Nagy A, Karadi I, Toth M. (1998) High pericardial fluid levels of endothelin are not caused by altered neutral endopeptidase activity in cardiac patients. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31: S287-9.

115. Fazekas L, Horkay F, Kekesi V, Huszar E, Barat E, Fazekas R, Szabo T, Juhasz-Nagy A, Naszlady A. (1999) Enhanced accumulation of pericardial fluid adenosine and inosine in patients with coronary artery disease. *Life Sci*, 65: 1005-12.
116. Kekesi V, Zima E, Barat E, Huszar E, Nagy A, Losonczi L, Merkely B, Horkay F, Juhasz-Nagy A. (2002) Pericardial concentrations of adenosine, inosine and hypoxanthine in an experimental canine model of spastic ischaemia. *Clin Sci (Lond)*, 103: S198-201.
117. Namiki A, Kubota T, Fukazawa M, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, Ebine K, Yamaguchi T. (2003) Endothelin-1 concentrations in pericardial fluid are more elevated in patients with ischemic heart disease than in patients with nonischemic heart disease. *Jpn Heart J*, 44: 633-44.
118. Fujita M, Ikemoto M, Kishishita M, Otani H, Nohara R, Tanaka T, Tamaki S, Yamazato A, Sasayama S. (1996) Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation*, 94: 610-3.
119. Abe N, Matsunaga T, Kameda K, Tomita H, Fujiwara T, Ishizaka H, Hanada H, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, Okumura K. (2006) Increased level of pericardial insulin-like growth factor-1 in patients with left ventricular dysfunction and advanced heart failure. *J Am Coll Card*, 48: 1387-95.
120. Corda S, Mebazaa A, Gandolfini MP, Fitting C, Marotte F, Peynet J, Charlemagne D, Cavaillon JM, Payen D, Rappaport L, Samuel JL. (1997) Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 81: 679-87.
121. Nagy A, Toma I, Rusvai M, Barat E, Huszar E, Juhasz-Nagy A, Kekesi V. (2004) Intrapericardial adenine nucleosides induce elevation of endothelin-1 concentration in the pericardial space of the dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44(S1): S227-30.

122. Szokodi I, Horkay F, Merkely B, Solti F, Geller L, Kiss P, Selmecci L, Kekesi V, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. (1998) Intrapericardial infusion of endothelin-1 induces ventricular arrhythmias in dogs. *Cardiovasc Res*, 38: 356-64.
123. Kekesi V, Toma I, Nagy A, Rusvai M, Barat E, Huszar E, Juhasz-Nagy A. (2004) Cardiovascular responses to catecholamines and interactions with endothelin-1 and adenine nucleosides in the pericardium of the dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S234-8.
124. Toma I, Sax B, Nagy A, Entz L, Jr., Rusvai M, Juhasz-Nagy A, Kekesi V. (2006) Intrapericardial angiotensin II stimulates endothelin-1 and atrial natriuretic peptide formation of the in situ dog heart. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231: 847-51.
125. Toma I, Nagy A, Janosi C, Rusvai M, Juhasz-Nagy A, Kekesi V. (2004) Effects of intrapericardially administered endothelin-1 on pericardial natriuretic peptide concentrations of the in situ dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44: S231-3.
126. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD, Simons M, Hung D. (2000) Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*, 292: 795-802.
127. Laham RJ, Simons M, Tofukuji M, Hung D, Sellke FW. (1998) Modulation of myocardial perfusion and vascular reactivity by pericardial basic fibroblast growth factor: insight into ischemia-induced reduction in endothelium-dependent vasodilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116: 1022-8.
128. Devereux RB, Reichek N. (1977) Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation*, 55: 613-8.

129. Nadasy GL, Szekeres M, Dezsi L, Varbiro S, Szekacs B, Monos E. (2001) Preparation of intramural small coronary artery and arteriole segments and resistance artery networks from the rat heart for microarteriography and for in Situ perfusion video mapping. *Microvasc Res*, 61: 282-286.
130. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 240-4.
131. De Vriese C, Delporte C. (2007) Autocrine proliferative effect of ghrelin on leukemic HL-60 and THP-1 cells. *J Endocrinol*, 192: 199-205.
132. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. (2010) Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: Hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *58*: 2-16.
133. Chow KB, Leung PK, Cheng CH, Cheung WT, Wise H. (2008) The constitutive activity of ghrelin receptors is decreased by co-expression with vasoactive prostanoid receptors when over-expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 2627-37.
134. Kitazawa T, Kaiya H, Taneike T. (2007) Contractile effects of ghrelin-related peptides on the chicken gastrointestinal tract in vitro. *Peptides*, 28: 617-24.
135. Iantorno M, Chen H, Kim JA, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ. (2007) Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292: E756-64.
136. Vlasova MA, Jarvinen K, Herzig KH. (2009) Cardiovascular effects of ghrelin antagonist in conscious rats. *Regul Pept*, 156: 72-6.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **Sax B**, Nadasy GL, Turi K, Hirschberg K, Furjesz D, Nagy A, Merkely B, Szabo G, Monos E, Kekesi V. (2011) Coronary vasoconstrictor effect of ghrelin is not mediated by growth hormone secretagogue receptor 1a type in dogs. *Peptides*, 32:362-7. IF: 2,434
2. **Sax B**, Merkely B, Turi K, Nagy A, Ahres A, Hartyanszky I Jr, Huttl T, Szabolcs Z, Cseh K, Kekesi V. (2013) Characterization of pericardial and plasma ghrelin levels in patients with ischemic and non-ischemic heart disease. *Regul Pept*, 186:131-6. IF (2012): 2,056

A disszertációtól független közlemények:

3. Toma I, **Sax B**, Nagy A, Entz L jr., Rusvai M, Juhasz-Nagy A, Kekesi V. (2006) Intrapericardial angiotensin II stimulates endothelin-1 and atrial natriuretic peptide formation of the in situ dog heart. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231:847-51. IF 2,845
4. Nagy A, **Sax B**, Entz L jr., Barat E, Toma I, Becker D, Merkely B, Kekesi V. (2009) Comparison of elimination and cardiovascular effects of adenine nucleosides administered intrapericardially or intravenously in anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54:341-7. IF: 2,826
5. Kovacs A, Apor A, Nagy A, Vago H, Toth A, Nagy AI, Kovacs T, **Sax B**, Szeplaki G, Becker D, Merkely B. (2013) Left ventricular untwisting in athlete's heart: key role in early diastolic filling? *Int J Sports Med*, 2013 Jul 30. (e-publication, DOI: 10.1055/s-0033-1349076). IF: 2,433

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm témavezetőm, **Dr. Kékesi Violetta** éveken át utat mutató tanácsait és segítségét, aki még diákkörösként vezetett be a tudományos kutatás világába, és adta tovább a néhai **Dr. Juhász-Nagy Sándor** professzortól örökölt tudományszeretetet és a kutatáshoz szükséges kritikai szemléletet.

Köszönöm **Prof. Dr. Merkely Bélának**, hogy a klinikai feladataim mellett is lehetőséget teremtett az általa mindig prioritásként kezelt kutatómunka elvégzésére is.

Nem készülhetett el volna a dolgozat **Dr. Nagy Andrea** kolléganőm és barátom támogatása és bátorító tanácsai nélkül, amelyekre a kísérletes és klinikai munkám során mindvégig számíthattam. Köszönöm **Dr. Túri Katalinnak, Dr. Kerekes Máténak, Dr. Fürjész Dórának, Dr. Ahres Abdelkrimnek, Dr. Végh Eszter Máriának, Dr. Nagy Klaudia Viviennek** a kísérletekhez nyújtott segítségét.

Köszönöm **Prof. Dr. Cseh Károlynak** a humán minták izotópos mérésében, valamint ez ebből született közlemény megírásához nyújtott fáradhatatlan segítségét.

Köszönöm **Dr. Nádasy György** egyetemi docens úrnak az izolált ereken végzett kísérletek megtervezésében és végrehajtásában nyújtott segítségét, a számtalan arteriola izolálását. Köszönöm **Oravec Lászlóné Ildikó** labormunkához nyújtott segítségét.

Köszönöm a heidelbergi Ruprecht Karl Egyetem Kísérletes Szívsebészeti Kutatólaborja munkatársainak, elsősorban **Dr. Hirschberg Kristófnak** és Dr. Patricia Mambou Gwanmesíanak az immunhisztokémiai metszetek és a western blot vizsgálat elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm a városmajori **Kísérleti Kutató Laboratórium minden munkatársának** az állatkísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségét. A perikardiális minták levételében nyújtott segítségükért köszönet illeti a Városmajorban dolgozó valamennyi szívsebészt és a szívsebészeti műtő munkatársait.

Végezetül köszönöm **feleségemnek** és **családomnak** az irántam tanúsított türelmüket, megértésüket és támogatásukat, amelyre mindvégig feltétel nélkül számíthattam.