

A hosszú távú, rendszeres fizikai edzés és az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés kardiális hatásainak vizsgálata patkánymodelleken

PhD Doktori Tézisek

Dr. Oláh Attila

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Radovits Tamás, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Gellér László, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Csont Tamás, PhD, egyetemi docens
Dr. Ivanics Tamás, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Monos Emil, DSc, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:
Prof. Dr. Pavlik Gábor, DSc, professor emeritus
Dr. Miklós Zsuzsanna, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest

2015

Bevezetés

A rendszeres testmozgás szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedések megelőzésében és kezelésben széles körben ismert. A rendszeres fizikai aktivitás a kardiovaszkuláris mortalitást körülbelül 35%-kal, az összhalálozást 33%-kal csökkenti és hosszabb élettartamot biztosít. Azonban az utóbbi években a magas intenzitású, extrém hosszú ideig tartó testmozgás lehetséges káros következményeire derült fény és ez kérdésessé tette az ilyen típusú mozgás kardiovaszkuláris egészségre gyakorolt hatásait. A jelenleg érvényben levő „American Heart Association” szakmai irányelvei legalább heti 150 perc közepesen intenzív aerob testmozgást vagy 60 perc megerőltető fizikai aktivitást javasolnak az egészség megőrzése érdekében. Mindazonáltal nem ismerjük a testmozgás pontos „dózis-hatás” görbáját és nem tisztázott az sem, hogy mekkora mértékű fizikai aktivitás biztosítja a legnagyobb egészség-megőrző hatást.

A szív rendszeres fizikai terhelés hatására kialakuló strukturális, funkcionális és elektromos jellemzőinek összességét sportszívnek nevezzük. Az 1890-es évek óta ismert a sportolók szívmegegyeztetése. Azóta a sportszívvvel kapcsolatos tudásmennyiség fokozatosan növekedett, amely az invazív és non-invazív technikák dinamikus fejlődésének köszönhető. A rendszeres intenzív fizikai aktivitás kardiális hipertrófiát okoz, amely egy olyan fontos fiziológiai adaptáció, ami a szív kamrai és pitvari átmérőinek és a szívizom tömegének reverzibilis, kiegyensúlyozott növekedésével jár. E morfológiai változások mögött a kardiomiociták hipertrófiája és a neo-angiogenezis következtében kialakuló sűrűbb kapilláris-hálózat áll. A nyugalmi bradikardia következtében meghosszabbodik a diasztolés idő, a glükóz- és zsírsavoxidáció javulása pedig a metabolikus határfok növekedését eredményezi. Mindezek következtében javul a szívizom vérellátása és fokozódik a teljesítménye. Élénk tudományos érdeklődés mutatkozott ezen előnyös változások háttérében zajló molekuláris mechanizmusok feltárása iránt, mert ezen szignálok aktiválása révén új preventív és terápiás lehetőségek nyílhatnak szívelégtelenségben.

A patológiás hipertrófiával ellentétben, a fiziológiai hipertrófiára megtartott, illetve javult szívteljesítmény jellemző a terhelés során megnövekedett perctérfogat-igény biztosítása érdekében. A testmozgás hatására kialakuló kardiális funkcionális változások néhány aspektusát echokardiográfia és mágneses rezonancia vizsgálat segítségével leírták ugyan kísérleti állatokban és emberben is, azonban az így kapott paraméterek többsége erősen függ a szív elő- és utóterhelésétől, így a sportszív mechanikus működéséről teljes körű, megbízható adatokkal nem rendelkezünk. A szív elő- és utóterheléstől független, legpontosabb és legrészletesebb funkcionális jellemzésére invazív vizsgálatok (bal kamrai nyomás-térfogat analízis) alkalmazása nyújthatna lehetőséget, ezek elvégzése azonban egészséges sportolóknál etikai akadályokba ütközik. Ezért releváns állatmodellekre van szükségünk a hosszú távú edzés okozta hemodinamikai változások megértéséhez. A rendszeres fizikai edzés

okozta szívizom-hipertrófia számos állatmodelljétírták le, melyek közül a futópados edzés és az úszóedzés is hatásosnak bizonyult sportszív kiváltására.

Habár a fizikai edzés kardiovaszkuláris rizikót csökkentő hatása jól ismert, egészséges egyénekben kardioneurotikus biomarkerek emelkedését igazolták egyszeri, hosszan tartó, megerőltető testmozgás után. Ezek az eredmények kétségeket vetettek fel a kimerítő fizikai aktivitás kardiovaszkuláris következményeivel kapcsolatban. Az ilyen típusú, nagyfokú terhelést igénylő sportágak, mint az ironman triatlon, az ultramaraton futás vagy az országúti kerékpározás egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek. Ebből kifolyólag több állatkísérletes és humán tanulmány vizsgálta a szívizom-sérülés általánosan alkalmazott biokémiai markere, a kardiális troponin emelkedését kimerítő fizikai terhelés után. Ezek a vizsgálatok a szívizominfarktusz határértékét meghaladó troponin-szinteket mértek, mely fokozott nitro-oxidatív stresszel fehérje és lipid peroxidációval, DNS sérülések kialakulásával társult. Ezek a kimerítő testedzés következtében kialakuló folyamatok irreverzibilis sejtkárosodáshoz és sejthalálhoz vezethetnek a szívizomban.

Az akut, kimerítő fizikai terhelés szívműködésre gyakorolt hatását számos humán tanulmány vizsgálta non-invazív echokardiográfia és mágneses rezonancia vizsgálat használatával. Több vizsgálat átmeneti bal kamrai funkcióromlást figyelt meg, melyet „terhelés-indukálta szív fáradtság“-nak („exercise-induced cardiac fatigue“) neveztek el, azonban a jelentősen különböző vizsgálati protokollok és egymásnak részben ellentmondó adatok miatt egyértelmű következtetések nem voltak levonhatók. Az állatkísérletek egységesebb és szabályozhatóbb vizsgálati lehetőséget nyújtanak az akut, kimerítő fizikai terhelés hatásainak nyomonkövetésére, ráadásul az oxidatív stressz markereinek közvetlen szöveti mérése is lehetséges szívizomzatból. Így tehát az egyszeri, kimerítő terhelés okozta szívizomsérülés megbízható, in vivo állatmodelljének beállítása szükséges a következményes kardiális diszfunkció részletes vizsgálatához.

A nyomás-térfogat (P-V) analízis a jelenleg elérhető legmegbízhatóbb módszer az intakt kamraműködés különböző aspektusainak mérésére, elő- és utóterheléstől független, érzékeny paramétereinek számítására. Ezt a módszert az 1980-as évek közepe óta széles körben használják humán vizsgálatokban és nagyállatmodelleken. Az utóbbi évtizedek technikai fejlesztései lehetővé tették ezen szofisztikált mérőmódszer alkalmazását kisállatmodelleken. Így a P-V analízis az évek során az in vivo bal kamra funkció jellemzésének gold standard vizsgálatává vált különböző kórállapotokban.

Célkitűzés

A sportkardiológia az utóbbi években fokozott figyelemben részesült. Számos kutatócsoport publikált nagy mennyiségű tudományos eredményt a hosszú távú fizikai edzés és az akut, kimerítő fizikai terhelés hatására szívizomban kialakuló változásokról, mind klinikai vizsgálatokban, mind állatkísérletes modellekben. Ennek ellenére a sportszív és az egyszeri, intenzív terhelés okozta szívizomsérülés bal kamrai (BK-i) funkcionális következményeiről még korlátozott mennyiségű tudás áll rendelkezésünkre.

Munkánkban a következő célokat tűztük ki:

1. A fizikai edzés által okozott BK-i változások vizsgálata patkánymodellben:

(i) Az úszóedzés hatására kialakuló sportszív patkánymodelljének beállítása. A BK hipertrófia fiziológias természetének igazolása képalkotó technika, szövettani, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok által. Az edzés indukálta miokardiális hipertrófia BK-i morfológiai változásainak és ezen változások reverzibilitásának vizsgálata non-invazív echokardiográfia segítségével.

(ii) Az edzés hatására létrejövő BK-i hemodinamikai változások részletes in vivo jellemzése (szisztolés funkció, kontraktilitás, aktív relaxáció, miokardiális stiffness és mechanoenergetika) BK-i nyomás-térfogat analízis segítségével.

(iii) A non-invazív speckle-tracking echokardiográfia (STE) során mért strain értékek és a nyomás-térfogat analízis során nyert szenzitív, elő- és utóterheléstől független kontraktilitás-indexek korrelációjának vizsgálata a STE experimentális sportkardiológiában való hasznosíthatóságának bizonyítására.

2. A kimerítő fizikai terhelés okozta miokardiális sérülés patkánymodelljében:

(i) Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés hatására létrejövő BK-i diszfunkció első részletes in vivo BK-i hemodinamikai jellemzését adni.

(ii) Meghatározni a kimerítő fizikai terhelés okozta szívizom-sérüléshez vezető molekuláris és sejtszintű mechanizmusokat (nitro-oxidatív stressz, proapoptotikus és profibrotikus markerek vizsgálata).

Módszerek

I. Állatok, kísérleti csoportok

Fiatal felnőtt, hím Wistar patkányokat ($m=275-375$ g) állandó hőmérsékletű (22 ± 2 °C), 12-12 órás világosság-sötétség ciklusú állatházban tartottunk. A standard laboratóriumi patkánytáphoz és a vízhez szabad hozzáférést biztosítottunk. Az állatok a következő vizsgálatokban vettek részt:

1. A sportszív hemodinamikai jellemzése Az állatok 12 hetes edzésprogramot teljesítettek (sportszív patkánymodellje). Echokardiográfiás mérések, szövettani és génexpressziós vizsgálatok történtek a BK hipertrófia fiziológiás természetének igazolására, illetve P-V analízist végeztünk a rendszeres testedzés hatására létrejövő funkcionális változások részletes jellemzésére.

2. A rendszeres testedzés hatására kialakuló BK hipertrófia reverzibilitásának vizsgálata Az edzésprogram teljesítése után a reverzibilitási csoportok állatait egy 8 hetes nyugalmi periódust követően vizsgáltuk. Echokardiográfiás és hisztológiai vizsgálatokat végeztünk a morfológiai reverzibilitás bizonyítására.

3. A STE által mért strain értékek és a P-V analízis során nyert érzékeny kontraktilitás-paraméterek korrelációjának vizsgálata Az edzésterv teljesítése után STE vizsgálatot és P-V analízist végeztünk a strain értékek és az érzékeny kontraktilitás-indexek korrelációjának vizsgálatára.

4. Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés okozta kardiális változások vizsgálata A patkányok az akut, megerőltető fizikai terhelés okozta szívizom-károsodás protokollját teljesítették (3 órás úszás 5 % faroksúly-terheléssel, amit egy 2 órás nyugalmi, megfigyelési periódus követ). Vérplazma- és szívizomszövet-mintákat vettünk az egyszeri, kimerítő terhelés okozta biokémiai és szövettani változások kimutatására. A patkányok másik csoportján P-V analízist végeztünk az egyszeri, hosszan tartó, megerőltető fizikai aktivitás okozta kardiális diszfunkció jellemzésére.

II. Állatmodellek, edzési és terhelési protokollok

Sportszív patkánymodell

Egy kifejezetten patkányok úsztatására alkalmas úsztató berendezést terveztünk, melyet 30-32 °C csapvízzel töltöttünk fel. A korábbi szakirodalmi adatok és saját előkísérleteink alapján olyan edzéstervet állítottunk össze, mely biztosította a markáns szívizom-hipertrófia kialakulását. Az úszó csoportba tartozó egyedek 12 héten keresztül, a hét 5 napján napi 200 perces úszóedzést végeztek. A megfelelő hozzászoktatás érdekében az első alkalommal 15 percig úsztak, majd ezt követően fokozatosan emeltük az edzés hosszát a 200 perces maximális edzés hosszúra. A kontroll egyedek minden alkalommal 5 percet töltöttek a vízben. A fiziológiás hipertrófia

morfológiai reverzibilitásának igazolására, a reverzibilitási úszó és kontroll csoport állatai a 12 hetes edzésprogram teljesítése után 8 héten át nyugalomban maradtak.

Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés okozta szívizom-sérülés patkánymodell

Ugyanazt az úsztató berendezést használtuk, 30-32 °C-os vízzel feltöltve. A stressz minimalizálása érdekében minden patkány 48 órával a kísérlet előtt 20 percet töltött a vízben. Az akut úszó csoport egyedeit 3 órán keresztül úsztattuk, 5 % faroksúly-terheléssel. A kontroll patkányok 5 percet töltöttek a vízben. A terhelési protokoll befejezése után a patkányokat megszártottuk, majd 2 órás nyugalmi, megfigyelési periódus következett. Ezután végeztük kísérleteinket.

III. Echokardiográfia

Hagyományos echokardiográfia

Az állatokat ip. pentobarbital (60 mg/kg) injekcióval elaltattuk, majd egy automata fűthető műtőasztal segítségével testhőmérsékletüket állandóan tartottuk (37 °C). A mellkas szőrtelenítése után transztorakális echokardiográfiát végeztünk. Kétdimenziós hossz- és keresztmetszeti (papilláris izmok középső harmadának magassága), valamint M-mód felvételeket készítettünk egy 13 MHz-es lineáris ultrahangfej segítségével, melyet egy echokardiográfias képalkotó egységhez csatlakoztattunk. Egy képelemző szoftver segítségével a rögzített felvételeken anterior és poszterior falvastagságot szisztolében és diasztolében, valamint BK-i végdiasztolés és végszisztolés átmérőt és areákat mértünk, majd ezekből morfológiai és funkcionális paramétereket számítottunk. A végdiasztolés (LVEDV) és végszisztolés (LVESV) térfogatot a kisállat-szívet leginkább modellező ún. „single plane ellipsoid” és „biplane ellipsoid” modellek alapján számítottuk. A következő paramétereket a szakirodalomban elfogadott képletek alapján számoltuk: frakcionális rövidülés (FS), verőtérfogat (SV) és ejekciós frakció (EF). A BK-i szívizomtömeget (LV mass) a módosított Devereux-képlet alapján számítottuk.

Speckle-tracking echokardiográfia

A bal karma hossz- és keresztmetszeti tengelyei mentén állandó, 218 Hz képsébséggel speckle-tracking elemzésre alkalmas felvételeket készítettünk egy speciális szoftver segítségével. A globális longitudinális strain (GLS) és szisztolés strain rate (LSr) számításához 3-3 szívciklust elemeztünk három különböző hossztenegelyi felvételen. A globális cirkumferenciális strain (GCS) és szisztolés strain rate (CSr) számításához ugyanezt a mitrális billentyű papilláris izmainak középső harmadában készült keresztmetszeti felvételeken vittük véghez. A végdiasztolés felvételeken az endokardiális felszín kézzel történő kijelölése után az elemző szoftver automatikusan 6 szegmensre osztotta a szívizom látható felszínét és ezeket követte a szívciklusok folyamán. Az így számított strain és strain rate értékeket átlagoltuk és statisztikai elemzést végeztünk.

IV. Hemodinamikai mérések, balkamrai nyomás-térfogat analízis

A patkányokat elaltattuk, tracheotomia és intubáció után mesterségesen lélegeztettük, testhőmérsékletüket a kísérlet során 37 °C-on tartottuk. A jobb oldali arteria carotis communis felől egy 2 Fr-es Millar nyomás-konduktancia mikrokatótert (SPR-838) vezettünk az aorta ascendensbe, ahol stabilizáció után artériás középnyomást (MAP) és szívfrekvenciát (HR) mértünk. A katótert a bal kamrába továbbvezetve stabilizáció után regisztráltuk a bal kamrai nyomás- és térfogatviszonyokat. Egy P-V analízisre alkalmas, speciális program segítségével a következő hemodinamikai paramétereket számítottuk: BK-i végszisztolés nyomás (LVESP), BK-i végdiasztolés nyomás (LVEDP), maximális és minimális dP/dt (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}), a BK-i relaxáció időkonstans (Tau) [τ ; mind Weiss, mind Glantz módszer szerint], ejekciós frakció (EF), verőmunka (SW) és nyomás-térfogat terület (PVA). Az LVEDV, LVESV, SV és a perctérfogat (CO) az in vitro és in vivo térfogatkalibrációs lépések után kerültek kiszámításra. A CO-t normalizáltuk a testtömegre [szívindex (CI)]. A teljes perifériás ellenállást (TPR) a MAP/CO képlet szerint számítottuk. Az artériás elasztanciát az LVESP/SV képlet segítségével kalkuláltuk. A ventrikulo-arteriális kapcsolást (VAC) az E_a és ESPVR arányával írtuk le, a BK-i mechanikus hatásfokot (Eff) a SW és a PVA hányadosaként számítottuk.

A vena cava inferior fokozatos kompressziója mellett regisztrált bal kamrai nyomás-térfogat összefüggések segítségével elő- és utóterheléstől független funkcionális indexeket számítottunk. A BK-i kontraktilitást érzékenyen jellemző paraméterek: a végszisztolés P-V összefüggés meredeksége (ESPVR; a parabolikus kurvilineáris modell szerint), a verőmunka – végdiasztolés térfogat összefüggés meredeksége (az ún. preload recruitable stroke work, PRSW), valamint a dP/dt_{max} és végdiasztolés térfogat összefüggés meredeksége (dP/dt_{max} -EDV). A végdiasztolés P-V összefüggés meredeksége (EDPVR) a BK-i falmerevség (stiffness) megbízható jelzője.

A kísérletek végeztével a szívcsúcson keresztül in vivo perfúziót végeztünk oxigenált Ringer-oldat segítségével a vörösvértestek szövetekből történő eltávolítása végett. Majd a szív azonnali eltávolítása után szívtömeget mértünk és BK-i miokardiális szövetmintákat vettünk. Ezen minták egy részét a 4 %-os paraformaldehid-oldatban történő fixálás után paraffinba ágyasztuk. A molekuláris biológiai és bizonyos szövettani céljából gyűjtött mintákat folyékony nitrogénben sokkfagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk.

V. Biokémia

A hemodinamikai méréseket követően a vena cava inferiorból vénás vérmintákat vettünk a biokémiai vizsgálatokhoz. Ezeket centrifugáltuk, majd a vérplazmát -80 °C-on tároltuk. Stressz biomarker (adrenokortikotrop hormon és kortizol) és kardioneurotikus biomarker [plazma kardiális eredetű troponin T (cTnT), kreatin-kináz (CK), laktát-dehidrogenáz (LDH), aszpartát-transzamináz (AST) és kreatinin (a vesefunkció mérésére)] szinteket mértünk klinikai laboratóriumi automaták segítségével.

VI. Hisztológia

Hematoxilin-eozin (HE) festés

A paraffinba ágyazott, illetve sokkfagyasztott szívizom-mintákból transzmurális szívizom-metszetek hematoxilin-eozin festése után fénymikroszkóppal, 400x-os nagyításon vizsgáltuk a szöveti szerkezetet.

A sportszívmodell esetén a kardiomiocita hipertrófia mérése érdekében 100 db hosszmetsetben elhelyezkedő, véletlenszerűen kiválasztott kardiomiocita sejtmagján áthaladó harántátmérőt mértünk, majd az értékeket állatonként átlagoltuk.

Az akut úszó állatokban a szívizom-struktúra vizsgálata történt a kimerítő fizikai terhelés okozta miokardiális sérülés kimutatására.

Masson trikróm (MT) festés

A fagyasztott szívizomszövet-mintákból szövettani metszeteket készítettünk, majd MT festést végeztünk. A MT festés szemikvantitatív értékelése során a szívizom kéken festődő kollagén tartalmát metszeteinken a következőképpen értékeltük: 0: nincs festődés, 1: gyenge, 2: közepes, 3: erős festődés. 20 BK-i látótér értékének átlaga (400x nagyítás) adta meg a metszet pontszámát.

Dihidroetidium (DHE) festés

A fagyasztott szívizommintákból a reaktív oxigéngyökök in situ kimutatására fluoreszcens dihidroetidium festést végeztünk. A fagyasztott metszeteket sötét, nedves kamrában 30 percen keresztül megfelelő koncentrációjú DHE oldatban inkubáltuk. A fluoreszcens jelet 590 nm hullámhosszú szűrőn keresztül jelenítettük meg és háttérkorrekciót végeztünk a negatív kontroll mintákra. Állatonként 8 felvételt készítettünk (200x nagyítás), melyeket a BK szabad fal részéből véletlenszerűen választottunk ki, és a fluoreszcens jel területét és intenzitását az ImageJ képelemző szoftver segítségével számoltuk.

Nitrotirozin (NT) festés

A nitro-oxidatív stressz bemutatására a BK-i szívizom-metszeteken a tirozin nitráció mértékét immunhisztokémiával vizsgáltuk. A paraffinba ágyazott metszeteket deparaffináltuk. A nitrotirozin kimutatását antigén-feltárást követően anti-nitrotirozin nyúl poliklonális antitesttel végeztük. Másodlagos antitestként kecske anti-nyúl antitest szolgált, a jelölést avidin-biotin peroxidáz komplex erősítette és diaminobenzidin segítségével vizualizáltuk. Metszetenként 5 felvételt (200x nagyítás) készítettünk véletlenszerűen kiválasztott BK szabadfali területről. A NT pozitív területek arányát ImageJ képelemző szoftver segítségével mértük.

Terminális deoxinukleotidil transzferáz-közvetített biotin-dUTP végjelzés (TUNEL festés)

A fagyasztott szövettani metszeteken TUNEL festést végeztünk egy kolorimetriás TUNEL rendszer segítségével a gyártó utasításai szerint. Állatonként a BK 30 véletlenszerűen kiválasztott metszetén (400x nagyítás) megszámoltuk a TUNEL-pozitív sejteket, majd az értékeket egyenként átlagoltuk.

VII. Miokardiális génexpressziós vizsgálatok

A szívizom-mintákat folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A BK-i szöveteket ezután homogenizáltuk, RNS izolálást végeztünk és ennek tisztaságát 260 nm-en mért optikai denzitás értékek alapján igazoltuk. Ezután reverz transzkripciót végeztünk. A következő célgénekre kvantitatív, valós idejű PCR reakciót indítottunk: β -miozin nehéz lánc (β -MHC), transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), kataláz, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD), glutation-peroxidáz 1 (GPX-1), glutation-reduktáz (GSR), tioredoxin-1, szuperoxid-diszmutáz 2 (SOD-2), endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), Bcl-2 asszociált X protein (Bax), B-sejt limfóma 2 (Bcl-2), mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), a metalloproteináz szöveti inhibitor-2 (TIMP-2), mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), a metalloproteináz szöveti inhibitor-1 (TIMP-1). A génexpressziós adatokat a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) expressziójára normalizáltuk.

VIII. Statisztika

Minden adatot átlagérték \pm átlag szórása (SEM) formájában adtuk meg. Adataink normál eloszlásának igazolása (Shapiro-Wilks teszt) után Student-féle kétmintás t próbát használtunk az úszó és kontroll állatok, a reverzibilitási úszó és reverzibilitási kontroll, valamint az akut úszó és kontroll állatok közötti különbségek statisztikai összehasonlítására. A P-V analízis során nyert kontraktilitás-paraméterek és a STE által számolt strain értékek közötti korreláció vizsgálatára Pearson-féle korrelációs tesztet használtunk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

I. A sportszív részletes hemodinamikai jellemzése

Szívtömeg

A rendszeres testedzés hatására jelentősen emelkedett szívtömeget mértünk a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez a különbség a testtömegre történt normalizálás után még kifejezettebbnek bizonyult. Ezen adatok egyértelműen a szívizom-hipertrófia kialakulására mutattak rá.

Echokardiográfia

Állatainkban az edzésprogram teljesítése után a BK-i falvastagság-értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak. Úszó állataink szívében változatlan LVEDV mellett csökkent LVESV volt megfigyelhető. Ennek következtében magasabb SV, EF és FS értékek mutatkoztak edzés hatására. A BK-i izomtömeg növekedést mutatott, mely szintén jelentős mértékű BK hipertrófia kialakulására utal.

Hisztológia

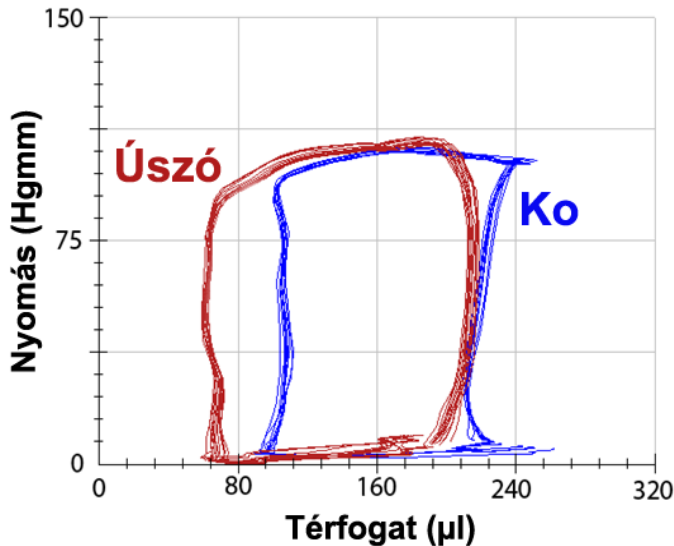
A kardiomiocita átmérő szignifikánsan magasabbnak mutatkozott úszóedzés hatására, mely mikroszkópos szinten is megerősítette a BK hipertrófia jelenlétét. A Masson-trikróm festés szemikvantitatív kiértékelésének eredménye nem mutatott különbséget a szívizom kollagén mennyiségében csoportjaink között.

Patológiás hipertrófia és stressz markerek

A TGF- β és a β -MHC miokardiális expressziója nem változott az úszóedzés hatására, mely igazolta a szívizom-hipertrófia fiziológiás természetét. A stressz biomarker változatlan plazma szintje kizárja a stressz befolyásoló szerepét.

Hemodinamikai paraméterek

Nyugalmi hemodinamikai paraméterek. A HR, MAP, LVESP, LVEDP és dP/dt_{\min} értékek nem különböztek az úszó és a kontroll csoport között (1. táblázat). A dP/dt_{\max} , egy klasszikus kontraktilitás-paraméter növekedő tendenciát mutatott. A BK-i relaxációs időkonstans (τ) értékének csökkenése az aktív relaxáció javulását mutatta edzés hatására. Az 1. ábra reprezentatív, eredeti nyugalmi P-V hurkokat mutat egy-egy úszó és kontroll állat esetén. A kiszélesedett P-V hurok növekedett verőtér fogatot mutat fiziológiás hipertrófiában, változatlan LVEDV és csökkent LVESV mellett. Az EF, CO, CI és SW értékeinek növekedése a szisztolés funkció javulására mutat úszó állatainkban. Mindemellett a TPR és az E_a csökkenését tapasztaltuk (1. táblázat).



1. ábra. Nyugalmi bal kamrai nyomás-térfogat (P-V) hurkok

Az úszó és kontroll (Ko) csoport egy-egy állatából nyert reprezentatív BK-i nyugalmi P-V hurkok. A hurkok kiszélesedése emelkedett verővolument mutat sportszívben, mely változatlan végdiasztolés térfogat mellett csökkent végszisztolés térfogatnak volt tulajdonítható.

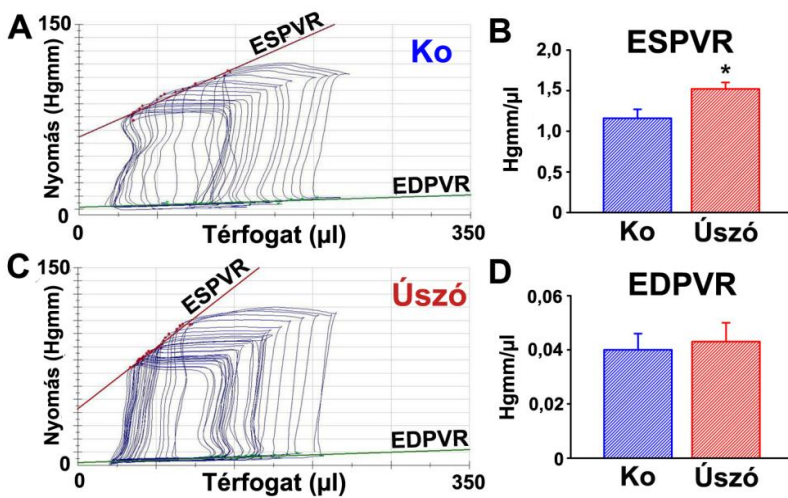
1. táblázat. Hemodinamikai paraméterek

	Kontroll	Úszó
Szívfrekvencia, 1/min	235±7	236±7
Artériás középnyomás, Hgmm	81,8±2,5	83,4±2,4
BK-i végszisztolés nyomás, Hgmm	95,1±3,2	91,5±2,4
BK-i végdiasztolés nyomás, Hgmm	8,2±0,8	8,5±0,5
Maximális dP/dt, Hgmm/s	7295±189	7668±196
Minimális dP/dt, Hgmm/s	6771±396	6878±470
τ (Weiss), ms	10,7±0,2	9,6±0,3*
τ (Glanz), ms	11,9±0,2	10,1±0,6*
BK-i végdiasztolés térfogat, µl	206,0±8,0	209,4±11,9
BK-i végszisztolés térfogat, µl	99,5±6,7	75,4±5,0*
Verőtérfogat, µl	145,4±7,7	175,4±8,5*
Perctérfogat, ml/min	32,3±1,9	44,7±3,7*
Szívindex, (ml/min)/testtömeg kg	66,5±4,0	100,0±8,0*
Ejekciós frakció, %	64,1±1,5	73,7±0,8*
Teljes perifériás ellenállás, Hgmm/(ml/min)	2,63±0,20	1,98±0,19*
Artériás elasztancia, Hgmm/µl	0,69±0,05	0,53±0,03*
Verőmunka, Hmg·ml	11,1±0,8	15,1±0,9*
Nyomás-térfogat terület, Hgmm·ml	25,9±0,9	28,3±2,6
Mechanikus hatásfok, %	44,6±2,1	53,0±0,02*
Ventrikulo-arteriális kapcsolás	0,65±0,08	0,37±0,02*

Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtuk meg. BK, bal kamra. *p<0,05 vs. kontroll.

A P-V analízis során csökkenő előterhelés mellett regisztrált viszonyok alapján számolt funkcionális indexek. A 2. ábra a vena cava inferior fokozatos okklúziója során, tehát csökkenő előterhelés mellett regisztrált P-V hurkokat mutatja be egy-egy úszó és kontroll állat esetén a ESPVR és EDPVR értékeivel. Az úszó állatok esetén tapasztalt meredekebb ESPVR az edzett szív növekedett kontraktilitására utal. A EDPVR nem különbözött a csoportjaink között, ami változatlan BK-i falmerevségre (stiffness) utal fiziológiás hipertrófiában.

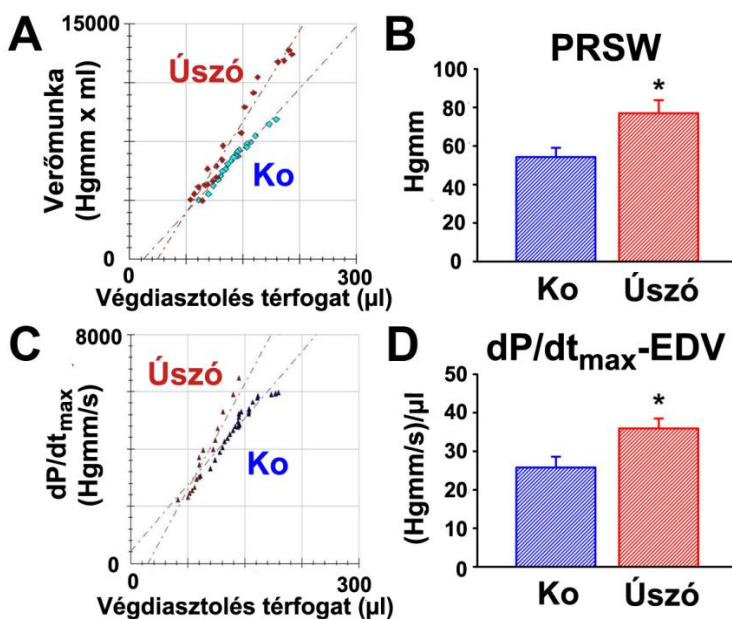
2. ábra. BK-i végszisztolés nyomás-térfogat (P-V) összefüggés (ESPVR) és végdiasztolés P-V összefüggés (EDPVR)



A ESPVR és a EDPVR egy-egy állatban a kontroll (Ko; A), illetve az úszó (C) csoportból. A bal kamrai kontraktilitást jellemző ESPVR meredeksége szignifikánsan magasabb volt edzés hatására (B). Az EDPVR értéke nem különbözött, változatlan kamrai falmerevséget mutatott sportszívben (D). * $p < 0,05$ vs. Ko

A 3.A ábrán a vérömunka-végdiasztolés térfogat összefüggés látható egy-egy reprezentatív edzett és kontroll állat esetén. Az összefüggés meredekebbnek mutatkozott edzés hatására, melyet alátámasztottak a magasabb PRSW értékek az edzett állatok szívében (3.B ábra). Meghatároztuk a dp/dt_{max} és a végdiasztolés térfogat összefüggésének egyenesét is. A dp/dt_{max} egy klasszikus kontraktilitás-index, amelynek értéke azonban függ a kamra előterhelésétől. A dp/dt_{max} -EDV összefüggés meredeksége növekedett úszó állatokban, mely a rendszeres testedzés által kiváltott miokardiális kontraktilitás-emelkedésre utal (3.C és D ábra).

3. ábra. Nyomás-térfogat hurkokból nyert szenzitív kontraktilitás-paraméterek



Az ún. preload recruitable stroke work (PRSW), vagyis a vérömunka és a végdiasztolés térfogat (EDV) összefüggés (A); valamint a maximális dp/dt (dp/dt_{max}) és az EDV összefüggés (C) egyenese egy-egy reprezentatív úszó és a kontroll (Ko) állat esetén. Mindkét összefüggés egyenesének meredeksége növekedett fizikai edzés hatására (B, illetve D), amely a bal kamrai kontraktilitás javulását elő- és utóterheléstől függetlenül jelezte * $p < 0,05$ vs. Ko.

A szívizom mechanoenergetikája. A P-V analízis során növekedett BK-i kontraktilitást és csökkent artériás elasztanciát találtunk. Következésképpen, a VAC szignifikánsan csökkent, amely optimálisabb kontraktilitás-utóterhelés arányt mutat sportszívben. A SW, vagyis a BK által végzett effektív mechanikai munka jelentősen növekedett edzés hatására. A BK energiafogyasztásával arányos PVA paraméter változatlan maradt. Így a két érték hányadosa, azaz a BK mechanikus hatásfoka emelkedett, ami a sportszív mechanoenergetikai viszonyaiban bekövetkezett javulást tükrözi (1. táblázat).

II. A rendszeres testedzés hatására kialakuló BK hipertrófia reverzibilitásának vizsgálata

A szívtömeg nem különbözött a reverzibilitási úszó és reverzibilitási kontroll csoportok között. Az átlagos kardiomiocita átmérő a kontroll állatok szintjére tért vissza a 8 hetes pihenési periódust követően. Nem találtunk különbséget a reverzibilitási úszó és kontroll állatok között sem a morfológiai, sem a funkcionális echokardiográfias paraméterekben, ami a testedzés okozta kardiális változások teljes reverzibilitását mutatja.

III. A STE által mért strain értékek és a P-V analízis során nyert érzékeny kontraktilitás-paraméterek korrelációjának vizsgálata

A bal kamra hipertrófiájának morfológiai markerei

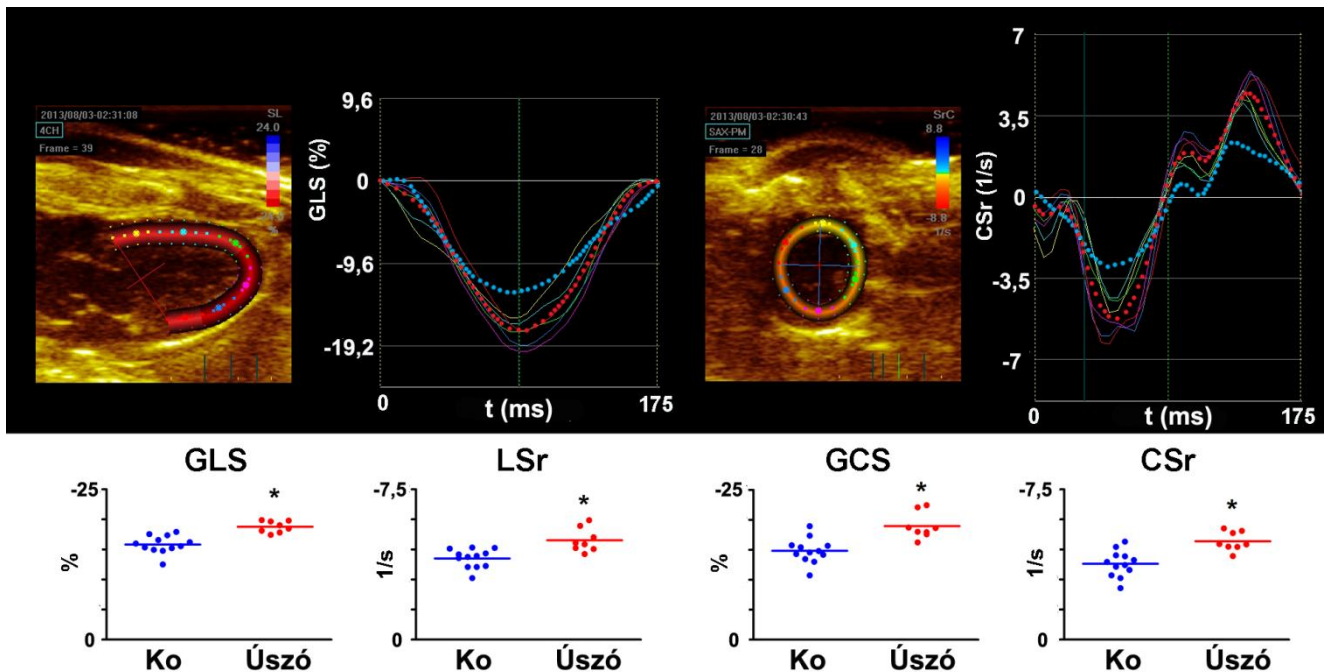
Szívultrahangos vizsgálat során emelkedett falvastagság-értékeket találtunk, mind az anterior, mind a poszterior régióban az edzett állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A számított BK-i izomtömeg jelentős BK hipertrófiát mutatott az edzésprogram végeztével. Ezen adatokat alátámasztotta a post mortem mért szívtömeg értékek növekedése.

A nyomás-térfogat analízis során számolt kontraktilitás-indexek

Az érzékeny, elő- és utóterheléstől független összefüggések, mint a ESPVR, a PRSW és a dP/dt_{max} -EDV meredekebbnek mutatkoztak úszóedzés hatására. A jelentősen növekedett értékek emelkedett BK-i kontraktilitást mutattak sportszívben.

A speckle-tracking echokardiográfia alapján mért strain paraméterek

A kontraktilitás-indexekhez hasonlóan az edzett állatokban "szupernormális" szisztolés funkció igazolódott. Mind a longitudinális és cirkumferenciális strain és szisztolés strain rate értékek jelentősen emelkedtek a kontroll csoporthoz viszonyítva (4. ábra).



4. ábra. A speckle-tracking analízis reprezentatív felvételei és eredményei. Az ábra felső részén egy edzett patkány reprezentatív felvételei láthatóak. Az azonos színű folyamatos görbék az echokardiográfiás felvételen található szegmensnek felelnek meg. A 6 szegmens átlagát a piros pontozott vonallal jelöltük és hasonlítottuk egy kontroll állat átlagához (kék pontozott vonal). (A) A longitudinális strain meghatározása egy hosszszetszeti felvételen. Az átlagolt görbék negatív csúcsa adja meg a globális longitudinális strain (GLS) értékét. (B) A cirkumferenciális strain rate meghatározása a papilláris izmok középső harmadának magasságában készült keresztmetszeti felvételeken. Az átlagolt görbék negatív csúcsa adja meg a cirkumferenciális szisztolés strain rate (CSr) értékét. Ahogy a diagrammokon látható (C), minden általunk mért strain és strain rate index (GLS, LSr – longitudinális szisztolés strain rate, GCS – globális cirkumferenciális strain, CSr) „szupernormálisnak” mutatkozott az úszó csoportban a kontroll csoporthoz (Ko) viszonyítva. A horizontális vonalak az átlagértéket mutatják. *: $p < 0.05$ vs. Ko.

A kontraktilitás és strain paraméterek közötti korreláció vizsgálata

Az ESPVR értékeivel korrelált a GLS ($r = -0,71$, $p < 0,001$) és a LSr ($r = -0,53$, $p = 0,016$), különösen erős korrelációt találtunk a GCS ($r = -0,83$, $p < 0,001$) és a CSr ($r = -0,75$, $p < 0,001$) esetén. A PRSW és a dP/dt_{\max} -EDV értékei szintén erős vagy közepes korrelációt mutattak a strain és strain rate paraméterekkel.

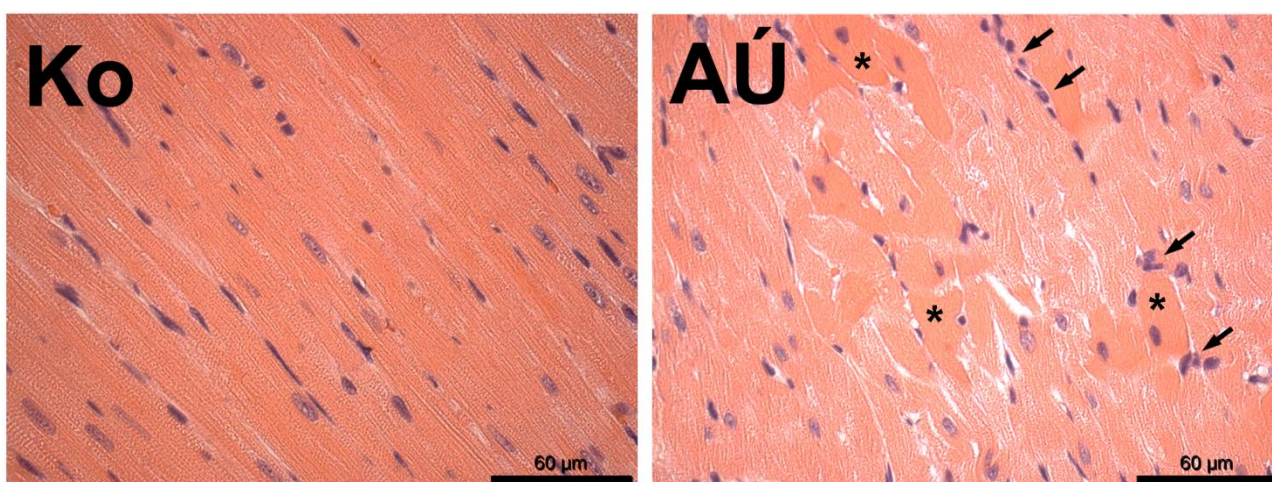
IV. Az akut, kimerítő fizikai terhelés okozta kardiális változások vizsgálata

Biokémia

A szérumban cTnT koncentráció jelentősen növekedett az akut, kimerítő terhelés hatására. A szérumban CK, LDH és AST enzimek aktivitási szintje is nagyfokú emelkedést mutatott az akut úszó állatokban a kontroll csoport állataihoz viszonyítva. A szérumban kreatinin értékek nem mutattak különbséget a két csoport között.

Hisztológia

A kontroll csoport egészséges szívizom-szerkezetével szemben az akut terhelésnek kitett állatok miokardiumában helyenként szívizomrost-töredezettséget, fehérvérsejt infiltrációt, szöveti ödémát és sejtes eozinofiliát figyeltünk meg (5. ábra).



5. ábra A bal kamrai (BK) miokardium konvencionális szövettani vizsgálata

A hematoxin-eozinnal (HE) festett BK metszeteken helyenként a szívizomrostok töredezettsége, szöveti ödéma, sejtes eozinofília (csillag jelölés) és leukocita infiltráció (nyilak), vagyis a miokardiális sérülés jelei mutatkoztak az akut úszó (AÚ) csoportban az egészséges kontroll (Ko) miokardiumhoz viszonyítva (400x nagyítás, skála 60 µm).

A DHE festett BK szívizomszöveti metszeteken a piros színű fluoreszcens jel intenzitása jelentősen növekedett akut terhelést követően, ami markáns reaktív oxigén szabadgyök-termelést tükröz. A NT festés fokozott tirozin nitrációt mutatott az akut úszó állatok szívizomszövetében. A TUNEL-pozitív kardiomiocita sejtmagok száma emelkedett volt a terhelés hatására.

Miokardiális génexpresszió

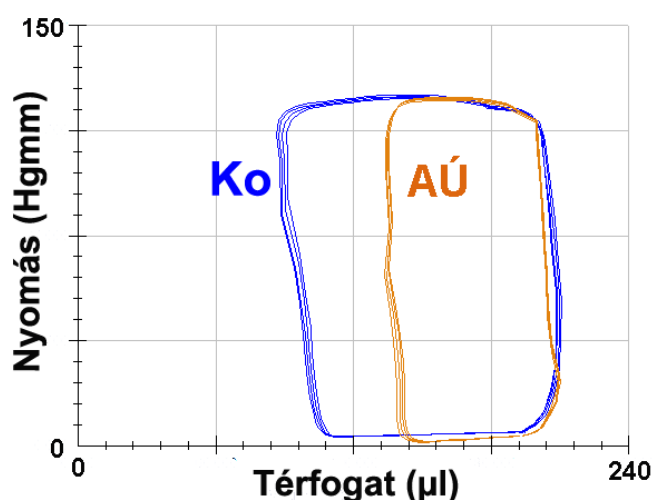
A miokardiális génexpressziós vizsgálatok a G6PD, GSR, thioredoxin-1, SOD-2 és az eNOS expressziójának szignifikáns emelkedését igazolták, a kataláz és a GPX-1 erős tendenciális növekedését figyeltük meg a kimerítő terhelés hatására. Ezek az eredmények az endogén antioxidáns rendszer aktiválódására utalnak.

A proapoptotikus mediátor Bax miokardiális expressziójának fokozódása és az antiapoptotikus mediátor Bcl-2 expressziójának csökkenése a Bax/Bcl-2 arány jelentős növekedését eredményezte, amely a proapoptotikus szignálutak aktivációjára mutat rá.

A MMP-2 és MMP-9 expressziós értékei növekedtek az intenzív igénybevétel jelentő testmozgás után. A TIMP-2 kifejeződése nem különbözött a két csoport között, a TIMP-1 expressziója pedig szignifikáns növekedést mutatott, ami emelkedett MMP-2/TIMP-2 és csökkent MMP-9/TIMP-1 arányt eredményezett. A TGF- β erős tendenciális növekedést mutatott a terhelés hatására. Ezek az eredmények a megerőltető fizikális terhelés okozta profibrotikus szignálutak aktiválódására utalhatnak a szívben.

Hemodinamika

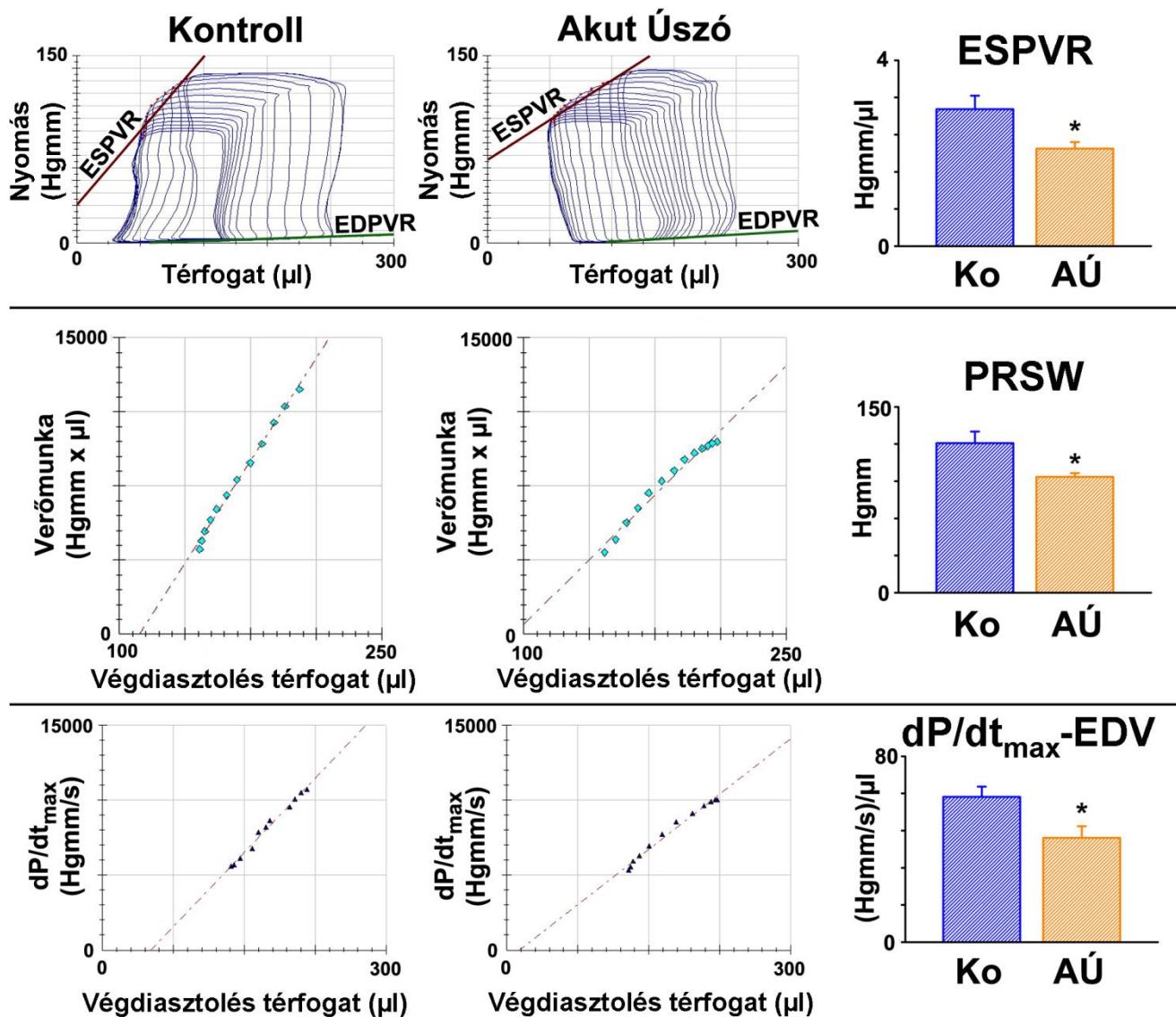
Nyugalmi hemodinamikai paraméterek. A 6. ábra eredeti, reprezentatív nyugalmi P-V hurkokat mutat be egy-egy akut úszó és kontroll patkány esetén. A MAP, HR, LVESP, LVEDP, τ , dP/dt_{max} and dP/dt_{min} értékei változatlanok maradtak az akut terhelés hatására. A nyugalmi P-V hurok szélességének csökkenése, mely a SV redukcióját tükrözi változatlan LVEDV és növekedett LVESV mellett. Következésképpen az EF, CO, CI és SW is csökken, ami a BK szisztolés funkciójának romlására utal a megerőltető testmozgás végzése után. A TPR és az E_a emelkedett az akut úszó csoportban.



6. ábra A nyugalmi bal kamrai (BK) nyomás-térfogat (P-V) hurkok változása kimerítő terhelés hatására

Eredeti, reprezentatív regisztrátumok egy kontroll (Ko) és egy akut úszó (AÚ) állat nyugalmi P-V viszonyairól. A P-V hurok csökkent szélessége változatlan végdiasztolés térfogat mellett csökkent verőtérfogatot és ejekciós frakciót tükröz a kimerítő fizikai terhelés hatására.

A P-V analízis során csökkenő előterhelés mellett regisztrált viszonyok alapján számolt funkcionális indexek. A 7. ábra felső részén a tranziens vena cava inferior okklúzió alatt egy-egy kontroll és akut úszó állatban regisztrált P-V viszonyokat eredeti regisztrátumok szemléltetik. Az ESPVR meredeksége csökkent a kimerítő terhelés hatására, amely jelentősen csökkent kontraktilitást tükröz. A másik két érzékeny kontraktilitás-paraméter is ezt támasztotta alá: a PRSW és dP/dt_{max} -EDV lineáris összefüggésének meredeksége is jelentősen csökkent (7. ábra). Az EDPVR nem mutatott különbséget, mely érték a BK falmerevségének változatlanságát mutatja.



7. ábra Nyomás-térfogat (P-V) analízis során nyert elő- és utóterheléstől független bal kamrai kontraktilitás-paraméterek változása az akut kimerítő fizikai terhelés hatására.

A végszisztolés P-V összefüggés (ESPVR) (felső panel); az ún. preload recruitable stroke work, vagyis a verőmunka és a végdiasztolés térfogat összefüggése (PRSW, középső panel); valamint a maximális dP/dt és végdiasztolés térfogat összefüggés (dP/dt_{max}-EDV, alsó panel) egy-egy reprezentatív felvétele a kontroll (Ko), illetve az akut úszó (AÚ) csoportból. Mindhárom összefüggés meredeksége jelentősen csökkent, mely a kontraktilitás károsodására utal kimerítő fizikai terhelés után. *p<0,05 vs. Ko.

A BK mechanoenergetikája. Az akut terhelés csökkent kontraktilitással és az artériás elasztancia emelkedésével járt. Ezen változások következtében növekedett a VAC, ami a BK és az artériás rendszer kontraktilitás-utóterhelés illeszkedési zavarára utal. A csökkent SW ellenére a PVA változatlanul mutatkozott, így a BK munkájának mechanikus hatásfoka csökkent akut úszás hatására. Mindezen adat a BK mechanoenergetikájának romlására utal az egyszeri kimerítő fizikai terhelés hatására.

Következtetések

Munkám első részében a rendszeres testedzés hatására kialakuló szívizom-hipertrófia *in vivo*, részletes hemodinamikai jellemzését mutattam be nyomás-térfogat analízis segítségével. A rendszeres testedzés hatására kialakuló reverzibilis, fiziológiás miokardiális hipertrófiát igazoltuk patkánymodellünkben. A bal kamra működését elő- és utóterheléstől függetlenül jellemző paraméterek alapján a szisztolés (emelkedett kontraktilitás) és a diasztolés (javult aktív relaxáció és változatlan kamrai stiffness) funkció javulását írtuk le edzett állatokban. A kamra működésének mechanoenergetikáját növekedett mechanikus határfok és optimalizált ventrikulo-arteriális kapcsolat jellemezte sportszívben.

További kísérleteinkben mind a nyomás-térfogat analízis és a speckle-tracking echokardiográfia során nyert paraméterek javult szisztolés funkciót tükröztek sportszív patkánymodelljében. A speckle-tracking echokardiográfia során mért paraméterek szoros összefüggést mutattak az elő- és utóterheléstől független kontraktilitás-indexekkel. A nyomás-térfogat analízis és a speckle-tracking echokardiográfia paramétereinek között talált erős korreláció alapján a non-invazív speckle-tracking echokardiográfia alkalmazása ígéretes módszer lehet a fiziológiás szívizomhipertrófia kialakulásának nyomonkövetésére kisállatmodellekben.

Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés miokardiális sérülést és nitro-oxidatív stresszt okozott patkánymodellünkben. Elsőként adtunk részletes hemodinamikai jellemzést a megerőltető terhelés okozta bal kamrai diszfunkcióról nyomás-konduktancia mikrokatéter segítségével. Az érzékeny, a szív működését, annak terhelési viszonyaitól függetlenül jellemző indexek alapján a szisztolés funkció romlása (csökkent kontraktilitás) volt kimutatható az akut úszás hatására, változatlan diasztolés funkció és károsodott mechanoenergetika (csökkent mechanikus határfok, ventrikulo-arteriális illeszkedési zavar) mellett. Akut, kimerítő fizikai terhelés hatására a kardiális nekroenzimek emelkedését, sporadikus szívizom-sérülés jeleit, kardiális diszfunkciót, valamint a proapoptotikus és profibrotikus folyamatok aktivációját írtuk le. Kérdéses azonban, hogy e károsodások átmeneti, reverzibilis változásnak tekinthetők vagy tartós miokardiális sérülést, irreverzibilis diszfunkciót eredményeznek.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke:

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

IF: 4,012

*megosztott elsőszereplőség

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

IF: 6,175

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

IF: 4,012

*megosztott elsőszereplőség

Oláh A, Lux Á, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Mátyás C, Ruppert M, Merkely G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. (2013) A sportszív részletes hemodinamikai jellemzése bal kamrai nyomás-térfogat analízis segítségével. *Cardiol Hung*, 43: 224-232.

Egyéb közlemények:

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

IF: 3,536

Radovits T, Mátyás C, **Oláh A**, Kökény G, Barnucz E, Szabó G, Merkely B. (2012) A foszfodiészteráz-5-gátló vardenafil hatásai diabéteszes kardiovaszkuláris diszfunkcióra. Cardiol Hung, 42: 272-279.