

**A bal kamra fokozott nyomásterhelése
és annak megszüntetése:
szerkezeti és funkcionális változások a szívben**

Doktori tézisek

Dr. Ruppert Mihály

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kaszaki József, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Görbe Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Tulassay Tivadar, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Patócs Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Péter Andréka, Ph.D., egyetemi tanár

Budapest

2020

Bevezetés

A XXI. században az idült szívelégtelenség előfordulása rohamosan nő, jelentős egészségügyi és gazdasági terhet róva a társadalomra. A szívelégtelenség ellen folytatott harcot nagymértékben korlátozza az a tény, hogy minden gyógyszeres és eszközös terápia ellenére sokszor csak a betegség progressziójának lassítása érhető el. Ennek magyarázatául szolgál, hogy szívelégtelenség fennállása esetén, számos esetben (pl. szívinfarktust követően vagy idiopátiás kardiomiopátiában) irreverzibilis változások mennek végbe a miokardiumban. Így e betegek körében kizárólag a műszívbeültetés vagy a szívtranszplantáció jelenthet definitív megoldást.

Ezzel szemben, kutatási eredmények igazolják, hogy a fokozott nyomásterhelés (pl. aorta sztenózis [AS] vagy hipertónia) által előidézett patológiás szívizom-hipertrófia és szívelégtelenség, a hemodinamikai túlterhelés megszüntetését (pl. sebészi vagy katéteres billentyűcsere AS esetében és vérnyomáscsökkentő gyógyszeres kezelés hipertónia esetében) követően visszaalakulhat. Ezt a jelenséget nevezzük reverz remodelációnak, mely mind strukturális szinten (a kórosan átépült szívizomszerkezet visszaalakulásában), mind funkcionális szinten (a károsodott szisztolés és diasztolés funkció helyreállításában) mind a szívelégtelenség klinikai tüneteiben jelentős javulást eredményezhet. Az elmúlt évek klinikai megfigyelései ugyanakkor arra hívják fel a figyelmet, hogy egyes betegekben csak kismértékű funkcionális és tüneti javulás megy végbe sikeres nyomásterhelés-csökkentő terápia ellenére is. Jelenleg kevésbé ismert, hogy pontosan mely tényezők felelősek a reverz remodelációban tapasztalt nagymértékű variabilitásért. Ezen tényezők befolyásoló szerepének a felderítése elősegítheti a jelenleg alkalmazott terápiás protokollok optimalizálását.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a fokozott nyomásterhelés megszüntetésének az időpontja az egyik olyan faktor, mely nagymértékben befolyásolhatja a miokardiális reverz remodeláció folyamatát. E jelenség hátterében feltételezhetően az áll, hogy a fokozott nyomásterhelés hatására progresszív átalakulások mennek végbe a szívizom szerkezetében. A korai stádiumra szövettani szinten a kardiomiociták hipertrófiája és kismértékű intersticiális kollagén felhalmozódás jellemző. Ezzel szemben a fokozott nyomásterhelés által indukált patológiás hipertrófia későbbi szakaszában a szívizom fibrotikus átépülése kerül előtérbe. Tekintve, hogy a fibrotikus folyamatok reverzibilitása elmarad a hipertrófizált szívizomsejtek regenerációs

képességétől, a késői stádiumokban végrehajtott nyomásterhelés-csökkentő terápia csak részleges strukturális regenerációt idéz elő. Ugyanakkor a jelenleg érvényben lévő klinikai ajánlások AS-ban kizárólag súlyos, előrehaladott állapotban javasolnak sebészi vagy katéteres billentyűcserét. Annak igazolására, hogy a korai stádiumban végrehajtott nyomásterhelés-csökkentő terápia valóban nagyobb mértékű strukturális és következményesen kedvezőbb funkcionális regenerációt biztosít, további kísérletes bizonyítékok szükségesek.

A beavatkozások időpontja mellett felmerült, hogy a betegek neme szintén befolyásoló hatással bírhat a miokardiális reverz remodellációra. Ez a kijelentés azon a megfigyelésen alapul, mely szerint a patológiás szerkezetbeli eltérések nőbetegek esetében a nyomásterhelés megszüntetését követően nagyobb mértékű visszaalakulást mutatnak. Különösen fontos, hogy a nőkben tapasztalt teljesebb strukturális reverz remodelláció a hosszútávú kimenetelt is pozitívan befolyásolja. Jelenlegi tudásunk szerint a női nemhez kapcsolható kedvezőbb terápiás válaszkészség azzal magyarázható, hogy nők esetében „fiziológiásabb” természetű szívizom-hipertrófia alakul ki krónikus nyomásterhelés hatására. Ezzel egybehangzóan, számos vizsgálat igazolta, hogy AS-ban vagy hipertóniában szenvedő nők esetében, jelentősebb falvastagodás, viszont kisebb mértékű kamradilatáció és enyhébb mértékű miokardiális fibrózis figyelhető meg férfi társaikkal összehasonlítva. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a női nem a kardiovaszkuláris megbetegedések széles spektrumával szemben rendelkezik védő hatással. Így, a fenti megfigyelések alapjául szolgáló tanulmányokban az iszkémiás szívbetegség is jellemzően nagyobb előfordulást mutatott férfi betegekben. Emellett számos társbetegségről és rizikófaktorról szintén ismert, hogy jellegzetes nem-specifikus eloszlást mutat. Ezen okoknál fogva további kísérletes kutatómunkák szükségesek annak vizsgálatára, hogy a nők körében észlelt „fiziológiásabb” természetű hipertrófia valóban a nemi különbségeknek, és nem az egyes külső tényezők befolyásoló hatásának tulajdoníthatók.

Célkitűzések

A fokozott nyomásterhelés hatására kialakuló patológiás szívizom-hipertrofia és szívelégtelenség a nyomásterhelés megszüntetését követően visszaalakulhat. Az elmúlt évek kutatási eredményei ugyanakkor felhívták a figyelmet, hogy számos tényező befolyásolhatja a miokardiális reverz remodeláció folyamatát. A klinikai megfigyelések szerint e befolyásoló tényezők közül a nyomásterhelés csökkentésének időpontja (korai versus késői szakaszban végrehajtott beavatkozások) valamint a női nem szerepe kiemelkedő jelentőséggel bírnak. Ezen tényezők befolyásoló hatásának kísérletes körülmények között történő igazolása elősegítheti a jelenleg alkalmazott terápiás ajánlások optimalizálását.

A fentiek alapján jelen kísérletsorozatunkban a következő célkitűzéseink voltak:

1. Mikrosebészeti módszerrel beállítani egy kisállatmodellt, mely egyaránt alkalmas a fokozott nyomásterhelés által kiváltott patológiás szívizom-hipertrofia és szívelégtelenség tanulmányozására valamint a fokozott nyomásterhelés megszüntetése által előidézett reverz remodeláció vizsgálatára

2. Vizsgálni a strukturális és funkcionális változásokat a fokozott nyomásterhelés-indukálta patológiás szívizom-hipertrofia szívelégtelenségbe történő progressziója során hím patkányokban

3. Összehasonlítani a korai és késői stádiumban végrehajtott nyomásterhelés csökkentő terápia hatásosságát

4. Standard laboratóriumi körülmények között vizsgálni az esetleges strukturális és funkcionális nemi különbségeket a fokozott nyomásterhelés hatására kialakuló patológiás szívizom-hipertrofiában.

Módszerek

Kísérleti modellek

A hasi aorta műtéti beszűkítése (abdominal aortic banding [AB])

Egy hétig tartó akklimatizációs időt követően hím és nőstény patkányokon (5-6 hetes korú, 160-180g tömegű Sprague-Dawley patkányok, Janvier, Franciaország) abdominális aortic banding-t (AB) vagy áloperációt (Sham) hajtottunk végre. Az AB során a hasi aorta szuprarenális szakaszát egy 22G-s tű külső átmérőjének nagyságára szűkítettük be. Az áloperált (Sham) állatok azonos beavatkozáson mentek keresztül, az aortaszűkítéstől eltekintve. A műtéteket izoflurán anesztéziában végeztük el.

Az aortaszűkítés eltávolítása (debanding)

A 6. (korai debanded) illetve a 12. hét (késői debanded) leteltével az AB állatok egy részében az aortaszűkítés eltávolításra került. Ezen beavatkozás során szintén izoflurán gáz inhalációval biztosítottuk az anesztéziát.

Kísérleti protokollok

1. vizsgálat: A strukturális és funkcionális változások időbeli követése a fokozott nyomásterhelés által kiváltott szívizom-hipertrófia és szívelégtelenség kialakulása során

Előzetes kísérleteink alapján, a 6, 12 és 18 hetes kísérleti időtartamokat választottuk a patológiás szívizom-hipertrófia korai és késői stádiumainak vizsgálatára.

Sham-6hét (n=9): az állatokat áloperációt követően 6 hétig követtük;

AB-6hét (n=13): az állatokat aortaszűkítést követően 6 hétig követtük;

Sham-12hét (n=9): az állatokat áloperációt követően 12 hétig követtük;

AB-12hét (n=13): az állatokat aortaszűkítést követően 12 hétig követtük;

Sham-18hét (n=10): az állatokat áloperációt követően 18 hétig követtük;

AB-18hét (n=13): az állatokat aortaszűkítést követően 18 hétig követtük.

2. vizsgálat: A korai és a késői nyomásterhelés-csökkenés összehasonlítása

Ezen kísérletünkben az első vizsgálatban alkalmazott kísérleti elrendezést két további csoporttal, a korai és a késői debanded csoportokkal egészítettük ki.

Sham-6hét (n=10): az állatokat áloperációt követően 6 hétig követtük;

AB-6hét (n=10): az állatokat aortaszűkítést követően 6 hétig követtük;

Sham-12hét (n=10): az állatokat áloperációt követően 12 hétig követtük;

AB-12hét (n=11): az állatokat aortaszűkítést követően 12 hétig követtük;
Sham-18hét (n=9): az állatokat áloperációt követően 18 hétig követtük;
AB-18hét (n=13): az állatokat aortaszűkítést követően 18 hétig követtük;
Korai debanded (n=14); a csoport tagjai aortaszűkítésen mentek keresztül, majd a 6. hét után a szűkület eltávolításra került és az állatokat a 12. hét végéig követtük
Késői debanded (n=15): a csoport tagjai aortaszűkítésen mentek keresztül, majd a 12. hét után a szűkület eltávolításra került és az állatokat a 18. hét végéig követtük.

3. vizsgálat: Nemi különbségek vizsgálata a patológiás szívizom-hipertrófiában

A nemi különbségek tanulmányozására hím és nőstény aortaszűkített és áloperált patkányokat alkalmaztunk 6 és 12 hetes utánkövetéssel.

Hím sham-6hét (n=8): hím áloperált patkányok 6 hetes utánkövetéssel

Hím AB-6hét (n=8): hím AB patkányok 6 hetes utánkövetéssel

Nőstény sham-6hét (n=8): nőstény áloperált patkányok 6 hetes utánkövetéssel;

Nőstény AB-6hét (n=7): nőstény AB patkányok 6 hetes utánkövetéssel;

Hím sham-12hét (n=8): hím áloperált patkányok 12 hetes utánkövetéssel;

Hím AB-12hét (n=10): hím AB patkányok 12 hetes utánkövetéssel;

Nőstény sham-12hét (n=8): nőstény áloperált patkányok 12 hetes utánkövetéssel

Nőstény AB-12hét (n=7): nőstény AB patkányok 12 hetes utánkövetéssel;

Echokardiográfia

A szívultrahangos méréseket az AB/Sham operációt megelőzően (baseline) illetve azt követően a 3., 6., 9., 12., 15. és 18. héten végeztük. Meghatározásra kerültek a bal kamrai (BK) átmérők (végdiasztolés BK-i átmérő [LVEDD] és végszisztolés BK-i átmérő [LVESD]), a BK-i falvastagságok [elülső [AWT] és hátulsó [PWT] falvastagság szisztolében (s) és diasztolében (d)], a BK-i izomtömeg (LVmass) és annak testtömegre normalizált indexe (LVmass index), valamint a relatív falvastagság (RWT).

BK-i nyomás-térfogat analízis

A kísérleti időszak leteltével (6., 12. illetve 18. hét) hemodinamikai méréseket végeztünk. Ennek során az állatokat izofluránnal altattuk el. A következő paraméterek kerültek meghatározásra: szisztolés (SBP) és diasztolés artériás vérnyomás (DBP), artériás középnyomás (MAP), BK-i végdiasztolés (LVEDP) és végszisztolés (LVESP) nyomás, maximális és minimális dP/dt (dP/dt_{max}, dP/dt_{min}), BK-i végszisztolés

(LVESV) és végdiasztolés (LVEDV) térfogatértékek, verőtér fogat (SV), perctér fogat (CO), ejekciós frakció (EF), artériás elasztancia ($[E_a]_a = LVESP/SV$), a BK-i aktív relaxáció időkonstansa (Tau, a Glantz módszer alapján). A vena cava inferior kompressziója mellett a következő kontraktilitás-paramétereket számítottuk: végszisztolés nyomás-tér fogat összefüggés egyenesének a mereksége (ESPVR), vérómunka (SW)–LVEDV összefüggés egyenesének a mereksége (az ún. preload recruitable stroke work, [PRSW]) és a dP/dt_{max} –EDV összefüggés egyenesének a mereksége (dP/dt_{max} –EDV). A miokardiális fal merevséget a végdiasztolés nyomás-tér fogat összefüggés (EDPVR) egyenesének merekségével jellemeztük. A BK működésének hatékonyságát a ventrikulo-artériás kapcsolás (VAC) alapján ítéltük meg ($VAC = E_a/ESPVR$).

A LVEDP-ből és az echokardiográfiás paraméterekből BK-i meridionális falfeszülést számítottuk ($\sigma = 0.334 * LVESP * [LVESD / (1 + PWT_s / LVESD)]$).

Post mortem szervtömeg mérések

A hemodinamiaki mérések végeztével az állatokat kivérettetéssel eutanizáltuk, majd a oxigenált Ringer oldattal perfundáltunk. Ezáltal biztosítottuk, hogy a vörösvértestek eltávolításra kerüljenek a szövetekből. A perfúzió után meghatároztuk a szív tömegeket (HW) és a tibia csontok hosszúságait (TL), melyekből a szív tömeg tibiahosszra normalizált indexét (HW/TL) számítottuk.

BK-i szövettan

Hematoxilin-eozinnal festett metszeteken a kardiomiociták harántátmérőit kerültk meghatározásra ([CD], 100 db/metszet). Az intersticiális és a perivaszkuláris miokardiális fibrózis mértékét picrosirius vörössel festett metszeteken vizsgáltuk.

BK-i génexpressziós vizsgálatok

-80°C-on tárolt BK-i szívizom-mintákat egy speciális pufferben homogenizáltunk, majd RNS izolálást végeztünk. Ezt követően meghatároztuk az RNS oldatok koncentrációját és minőségét. A megfelelő koncentrációjú és minőségű mintákból cDNS-t állítottunk elő. A génexpresszió vizsgálatára kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót (qRT-PCR) hajtottunk végre. A következő gének kifejeződése került meghatározásra: β -típusú miozin nehézlánc (β -MHC), α -MHC, pitvari típusú nátriuretikus peptid (ANP). A génexpressziós adatokat a gliceraldehid-3-foszfát-

dehidrogenáz (GAPDH) referencia génre normalizáltuk és az expressziós szinteket a CT komparatív módszerrel ($2^{-\Delta CT}$) számítottuk. Valamennyi értéket pozitív kalibrátorra (a Sham-6hét csoport valamennyi mintájából létrehozott cDNS-pool) normalizálva adtuk meg [$2^{-\Delta\Delta CT}$].

BK-i fehérjeexpressziós vizsgálatok

A fehérje meghatározáshoz a -80°C -on tárolt BK-i szívizom mintákat RIPA pufferrendszerben (mely proteáz inhibitorokat is tartalmazott) homogenizáltuk. Western blot alkalmazásával a kötőszöveti típusú növekedési faktor (CTGF) BK-i fehérje expresszióját határoztuk meg. A CTGF fehérjeszintjét a GAPDH fehérje mennyiségére normalizáltuk.

Statisztika

Minden adatot átlagérték \pm SEM formájában adtuk meg. Az adatok normál eloszlását, esetszámtól függően D'Agostino-Pearson omnibus teszttel, Shapiro–Wilk teszttel vagy Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük.

Két független csoport összehasonlítására, normál eloszlás esetén párosítatlan kétmintás t-próbát, míg nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk.

Az ultrahangos utánkövetés eredményeit azonos csoporton belül egyutas ismétléses varianciaanalízissel ([ANOVA]; normál eloszlás esetén) és Holm-Sidak-féle post hoc teszttel, vagy Friedman teszttel (nem normál eloszlás esetén) és Dunn-féle post hoc teszttel vizsgáltuk (1. vizsgálat).

3 független csoport összehasonlítására egyutas ANOVA-t Tukey-féle post hoc teszttel (normál eloszlás esetén) vagy Kruskal-Wallis tesztet Dunn-féle post hoc teszttel (nem normál eloszlás esetén) végeztünk.

6 (1. vizsgálat) és 4 (2. vizsgálat) független csoport összehasonlítására kétutas ANOVA-t (idő és AB faktorokkal), Tukey-féle post hoc teszttel végeztünk. Azokat az adatsorokat, melyek nem normál eloszlást mutattak, az ANOVA teszt elvégzése előtt logaritmikusan transzformáltuk.

A $P < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Bevezetésre kerültek továbbá a $P < 0,01$ és $P < 0,001$ osztályok is a szignifikancia szint jelölése érdekében.

Eredmények

I. A strukturális és funkcionális változások időbeli követése a fokozott nyomásterhelés által kiváltott szívizom-hipertrófia és szívelégtelenség kialakulása során

Echokardiográfia

A kísérlet 3. hetétől kezdődően az AWTd, PWTd és az LVmass index értékei folyamatos növekedést mutattak az AB-18hét csoportban a Sham-18hét csoporthoz képest, igazolva a szívizom-hipertrófia kialakulását. A 12. a 15. és a 18. héten továbbá a LVEDD is növekedett, ami a BK dilatációját jelezte.

Patológiás szívizom-hipertrófia és fibrózis markerek

Az HW/TL, a CD, a β/α -MHC génexpressziós arány és az ANP génexpresszió egyaránt fokozódott az AB-6hét, AB-12hét és AB-18hét csoportokban a megfelelő Sham csoportokhoz képest. Emellett a kollagén mennyisége szintén növekedett az AB-12hét és AB-18hét csoportokban, mely intersticiális fibrózis kialakulására utalt.

BK funkció

Artériás utóterhelés. A SBP, DBP és a MAP egyaránt emelkedtek az AB csoportokban a megfelelő áloperált csoportokhoz képest, igazolva a fokozott utóterhelés jelenlétét az aortaszűkítéstől proximális érterületen (1. táblázat).

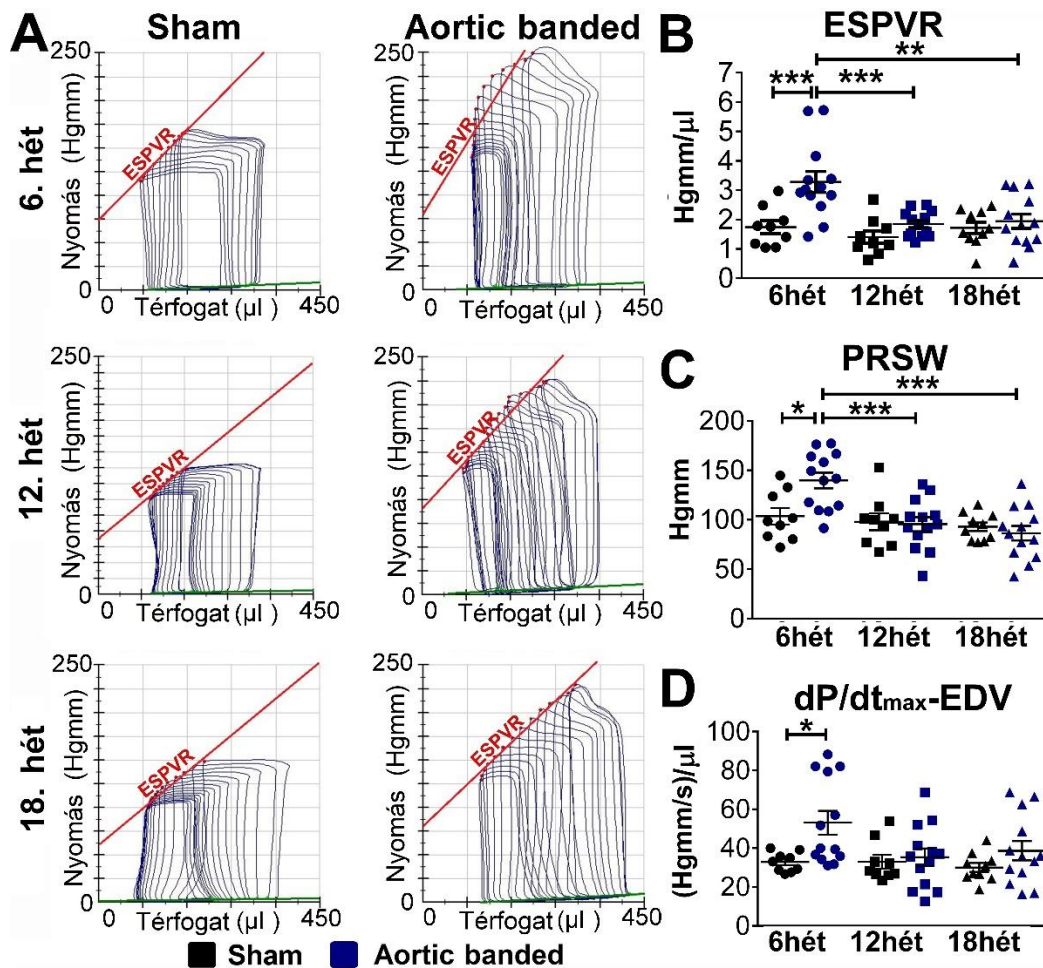
Elő- és utóterheléstől függő szisztolés paraméterek. Az EF értékei nem különböztek az AB-6hét csoportban a korban illesztett kontroll csoport értékeihez képest (1. táblázat). Ezzel szemben, az AB-12hét és AB-18hét csoportokban az EF szignifikánsan csökkent a megfelelő Sham csoportokkal összehasonlítva (1. táblázat).

Elő- és utóterheléstől független kontraktilitásparaméterek. Az AB-6hét csoportban az ESPVR, PRSW és dp/dt_{max} -EDV jelentősen növekedett a Sham-6hét csoporthoz képest, emelkedett BK-i kontraktilitást jelezve (1. ábra). A kontraktilitás növekedése ugyanakkor nem volt kimutatható az AB-12hét és AB-18hét csoportokban. Ezzel egybehangzóan a kontraktilitást jelző paraméterek szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak az AB-12hét és AB-18hét csoportokban a AB-6hét csoporttal összehasonlítva (1. ábra).

VAC. Az AB-6hét csoportban a BK-i kontraktilitás növekedése (emelkedett ESPVR) ellensúlyozta a fokozott utóterhelést (emelkedett E_a), így a VAC értéke nem különbözött

a megfelelő Sham csoportéhoz képest. Ezzel ellentétben az AB-12hét és AB-18hét csoportokban a BK-i kontraktilitás növekedésének hiánya, a fokozott utóterhelés változatlan fennállása mellett a VAC romlásához vezetett. (1. táblázat).

Diasztolés funkció. Az aktív relaxációs időkonstans, Tau jelentősen nőtt az AB-6hét, AB-12hét és AB-18hét csoportokban a megfelelő Sham csoportokhoz képest (1. táblázat). Emellett az EDPVR meredeksége szintén emelkedett az AB-18hét csoportban a Sham-18hét csoporthoz viszonyítva (1. táblázat).



1. ábra. A bal kamrai kontraktilitás alakulása a fokozott nyomásterhelés-indukálta patológiás szívizom-hipertrofia szívelégtelenségbe történő progressziója során. A: A vena cava inferior okklúziója során, csökkenő előterhelés mellett regisztrált reprezentatív nyomás-térfogát hurkok. A 6. héten az aortaszűkített (aortic banding) csoportban a végszisztolés nyomás-térfogát összefüggés egyenesének meredeksége (B, [ESVPR]), a vér munka-végdiasztolés térfogát összefüggés egyenesének meredeksége (C, [PRSW]), valamint a maximális dP/dt-végdiasztolés térfogát összefüggés egyenesének meredeksége (D, [dP/dt_{max}-EDV]) fokozott kontraktilitást igazolt. A kontraktilitás ezen növekedése a 12. és 18. héten már nem volt kimutatható az aortic banding csoportokban. *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001.

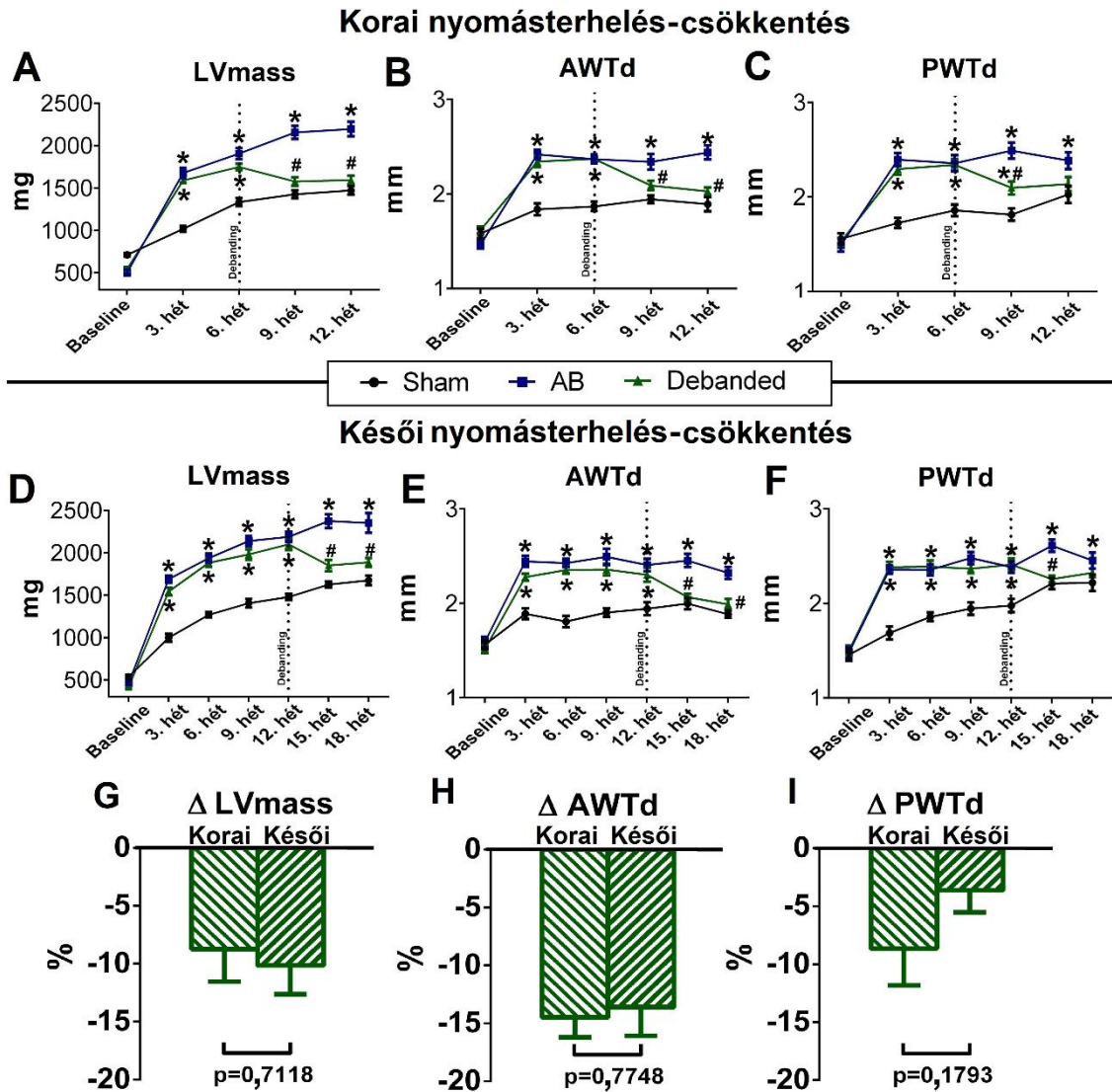
1. táblázat. Hemodinamikai paraméterek aortaszűkített és áloperált patkányokban különböző időpontokban. Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtuk meg. AB: aortic banding, SBP: szisztolés vérnyomás, DBP: diasztolés vérnyomás; MAP: artériás középnyomás; HR: szívfrekvencia; LVEDV: bal kamrai végdiasztolés térfogat; LVESV: bal kamrai végszisztolés térfogat; SV: verőtérfogat; CO: perc térfogat; EF: ejekciós frakció; E_a: artériás elasztancia; VAC: ventrikulo-artériás kapcsolás; Tau: aktív relaxációs időkonstans; EDPVR: végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés. *: P <0,05 vs. korban illesztett áloperált csoport. **: P<0.01 vs. korban illesztett áloperált csoport. ***: P<0.001 vs. korban illesztett áloperált csoport. #: P<0,05 vs. AB-6hét. ##: P<0,01 vs. AB-6hét. ###: P<0,001 AB-6hét. \$: P<0,05 vs. AB-12hét. \$\$: P<0,01 vs. AB-12hét.

	6. hét		12. hét		18. hét	
	<i>Sham</i> (n=9)	<i>AB</i> (n=13)	<i>Sham</i> (n=9)	<i>AB</i> (n=13)	<i>Sham</i> (n=10)	<i>AB</i> (n=13)
SBP, Hgmm	148±4	215±4***	138±5	215±5***	150±5	228±4***
DBP, Hgmm	116±3	150±2***	110±4	154±4***	120±4	170±3***###\$\$
MAP, Hgmm	127±4	172±2***	119±4	174±4***	140±4	189±3***###\$
HR, ütés/perc	355±7	369±9	354±5	366±7	379±7	357±5
LVEDV, µl	268±16	305±14	286±23	320±20	283±18	327±14
LVESV, µl	175±15	194±12	178±17	231±11	160±11	241±11***
SV, µl	188±16	173±10	195±11	163±12	175±10	151±15
CO, ml/perc	66,7±6,1	62,9±3,0	69,4±4,5	59,4±4,1	66,3±4,4	53,7±5,4
EF, %	58±3	51±2	57±2	44±2**	55±2	41±3***##
E _a , Hgmm/µl	0,75±0,06	1,20±0,08*	0,68±0,05	1,33±0,10***	0,84±0,05	1,54±0,16***
VAC	0,50±0,08	0,45±0,06	0,54±0,06	0,76±0,08##	0,57±0,10	0,87±0,08###
Tau, ms	14,2±0,4	18,4±0,9**	12,8±0,6	19,4±0,6***	13,0±0,3	21,7±1,2***#
EDPVR, Hgmm/µl	0,038±0,005	0,038±0,007	0,028±0,004	0,042±0,006	0,014±0,003	0,032±0,004**

II. A korai és a késői nyomásterhelés-csökkentés összehasonlítása

Echokardiográfia

Mind a korai, mind a késői nyomásterhelés-csökkentő terápia az LVmass, az AWTd és a PWTd paraméterekben jelentős mértékű csökkenést eredményezett (2./A-F ábra.). A visszaalakulás mértékében nem találtunk különbséget egyetlen ultrahangos paraméterben sem (2./G-I ábra) a korai és késői debanded csoportok között.

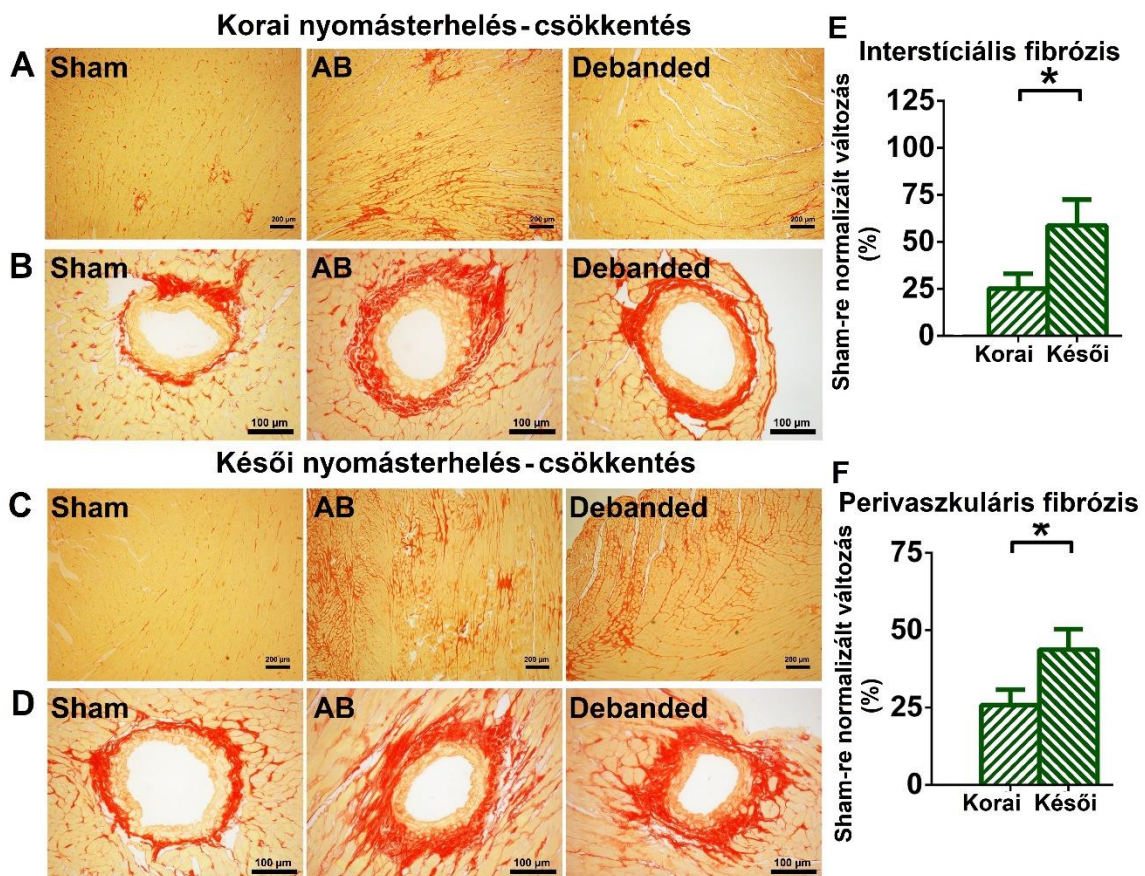


2. ábra. A miokardiális reverz remodelláció echokardiográfiai utánekvetése korai és a késői nyomásterhelés-csökkentő terápiát követően. A bal kamrai izomtömeg ([LVmass]; A, D), valamint az elülső ([AWTd], B, E) és hátsó ([PWTd], C, F) falvastagság jelentősen csökkent a korai és késői debanded csoportokban egyaránt. A visszaalakulás mértékében (G-I) nem találtunk különbséget. *:P <0,05 vs. korban illesztett Sham. #:P <0,05 vs. korban-illesztett AB.

Patológiás szívizom-hipertrófia és fibrózis markerek

A CD, a HW/TL és a főtális génprogram reaktivációját jelző génexpressziós változások (emelkedett β/α -MHC arány) jelentős visszaalakulást mutattak a korai és a késői debanded csoportokban egyaránt. Az ultrahangos mérésekhez hasonlóan, ezen paraméterekben sem találtunk különbséget a visszaalakulás mértékében a korai és a késői nyomásterhelés-csökkentő terápia között.

Ugyanakkor, az intersticiális és perivaszkuláris fibrózis kizárólag a korai nyomásterhelés-csökkentő terápia esetében alakult vissza (3./A-B ábra), míg a késői debanded csoportban perzisztált (3./C-D ábra). Ennek megfelelően, szignifikáns különbség volt kimutatható a korai és a késői debanded csoportok között az intersticiális és a perivaszkuláris fibrózis tekintetében (3./E-F ábra).



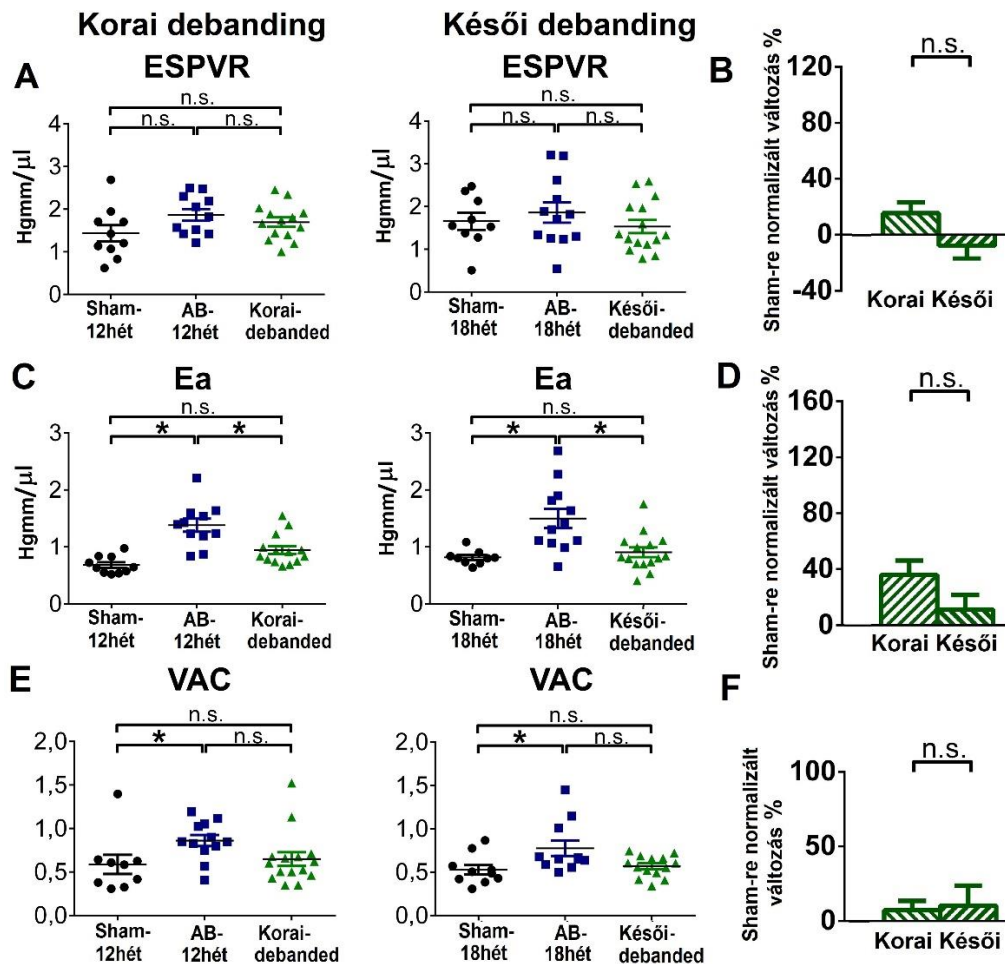
3. ábra. A korai és a késői nyomásterhelés-csökkentés hatása a miokardiális fibrózisra. A pikroszíriusz vörössel festett szövettani metszetek az intersticiális (A, C) (nagyítás 50x, skála: 200µm) és a perivaszkuláris fibrózisban bekövetkező változásokat mutatják (B, D) (nagyítás 100x, skála: 100µm). Mind az intersticiális (E), mind a perivaszkuláris fibrózis (F) nagyobb mértékben alakult vissza a korai debanded csoportban a késői debanded csoporthoz képest. AB: aortic banding. *: P<0,05

BK funkció

Artériás utóterhelés és meridionális falfeszülés. A korai és a késői debanded csoportokban a SBP, a DBP a MAP és a σ szignifikáns mértékben csökkentek a korban illesztett AB csoportokhoz viszonyítva. Az utóterhelés és a falfeszülés csökkenésének mértékében nem találtunk különbséget a két debanded csoport között.

Elő- és utóterheléstől függő szisztolés paraméterek. A nyomásterhelés-csökkentés mind a korai, mind a késői stádiumban eredményesen növelte az EF-t. A javulás mértékében nem találtunk különbséget a korai és a késői debanded csoportok között.

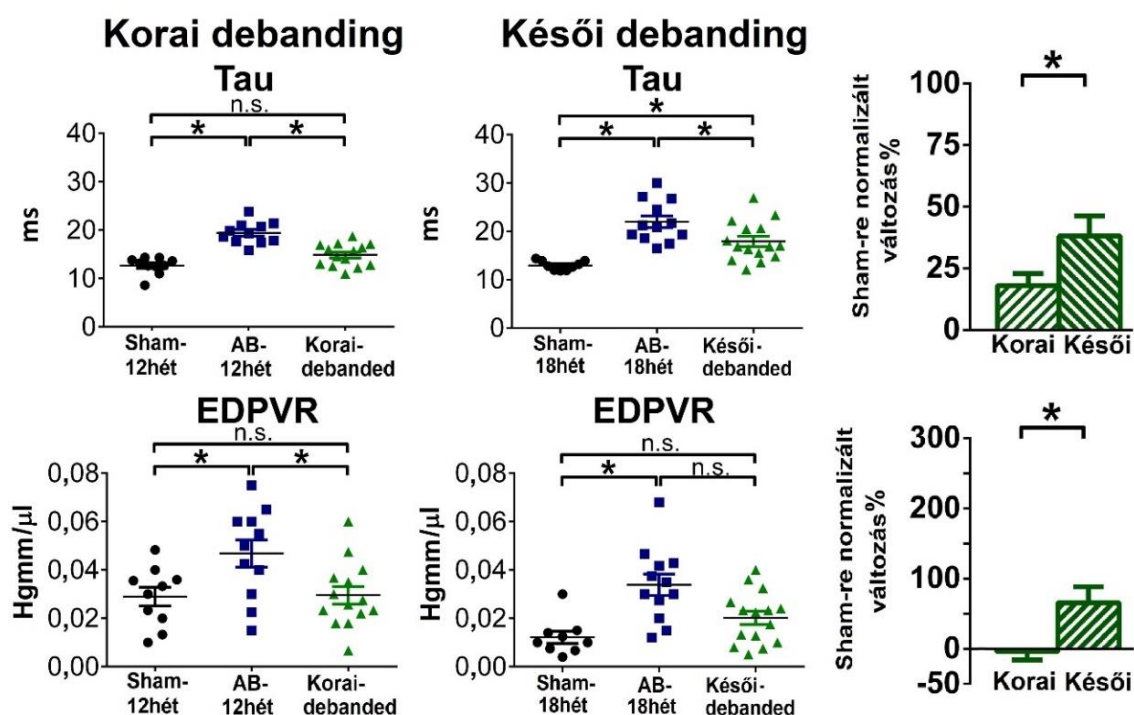
Elő- és utóterheléstől független kontraktilitásparaméterek. A BK kontraktilitása nem változott a nyomásterhelés-csökkentő terápiák hatására (4./A ábra).



4. ábra. A korai és a késői nyomásterhelés-csökkentés hatása a ventrikulo-artériás kapcsolásra (VAC). A-B: A bal kamra kontraktilitásában (végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés egyenesének a meredeksége [ESPVR]) nem volt különbség a csoportok között. C-D: Az artériás elasztancia (E_a) ugyanakkor jelentősen csökkent mindkét debanded csoportban. E-F: Fiziológias VAC volt kimutatható a korai és a késői debanded csoportokban egyaránt. *: $P < 0,05$

VAC. Az E_a csökkenése a korai és a késői debanded csoportokban egyaránt eredményesen javította a VAC-t (4./E ábra). A VAC-ban azonos mértékű javulás volt megfigyelhető a nyomásterhelés korai illetve késői időpontban történő csökkentése esetében (4./F ábra).

Diasztolés funkció. Ugyan mind a korai, mind a késői debanded csoportban az aktív relaxáció (Tau) jelentősen javult a korban illesztett Sham csoportokhoz képest (5./A ábra), a javulás mértéke nagyobbak bizonyult a korai debanded csoportban a késői debanded csoporttal összehasonlítva (5./B ábra). Továbbá, a miokardiális falmerevséget jellemző parameter, az EDPVR kizárólag a korai nyomásterhelés-csökkentő terápia esetében mutatott csökkenést (5./C ábra). A késői debanded csoportban az EDPVR nem különbözött a korban illesztett AB csoporttal összehasonlítva (5./C ábra). Így a Tau-hoz hasonlóan, az EDPVR is szignifikánsan nagyobb mértékű javulást mutatott a korai denbanded csoportban a késői debanded csoporttal összehasonlítva (5./D ábra).

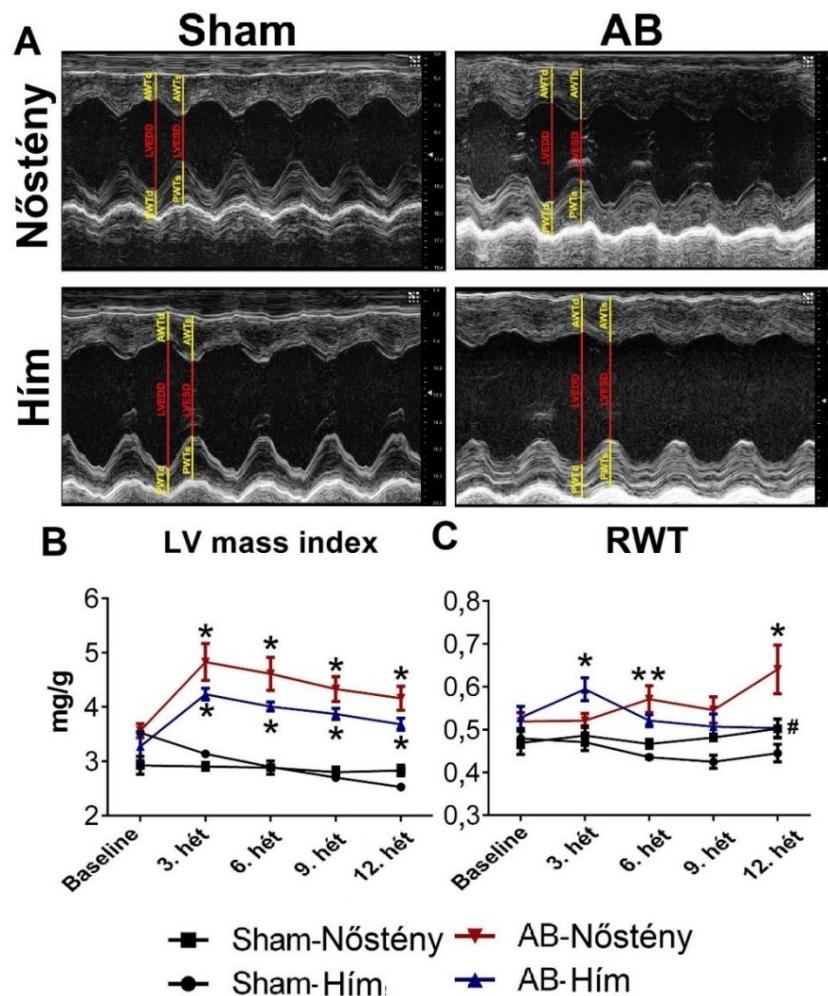


5. ábra. A korai és késői nyomásterhelés-csökkentés hatása a diasztolés funkcióra. A korai debanded csoportban mind az aktív relaxáció (Tau), mind a kamrai falmerevség (végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés egyenesének meredeksége [EDPVR]) jelentős javulást mutatott (A, C). Ezzel ellentétben, a késői nyomásterhelés-csökkentés a Tau-t csak kis mértékben, míg az EDPVR-t egyáltalán nem javította. Ennek következtében szignifikáns különbség volt kimutatható a diasztolés funkció tekintetében a korai és a késői debanded csoportok között (B, D). *: $P < 0,05$.

III. Nemi különbségek vizsgálata patológiás szívizom-hipertrófiában

Echokardiográfia

A BK-i izomtömegben (LVmass index) jelentős növekedést figyeltünk meg hím és nőstény AB patkányokban egyaránt (6./A-B ábra). A 6. héten a BK-i szívizom-hipertrófiát koncentrikus geometria jellemezte mindkét nemben (RWT nőtt). Ugyanakkor, a 12. héten csak a nőstény AB állatokban volt megfigyelhető koncentrikus geometria, míg hímekben a szívizom-hipertrófia excentrikus geometriát mutatott (6./A, C ábra).



6. ábra. Nemi különbségek a patológiás szívizom-hipertrófiában hím és nőstény aortaszűkített patkányokban. A: 12. héten készített reprezentatív szívultrahangos felvételek. B: A bal kamrai izomtömeg (LVmass index) jelentős növekedést mutatott hím és nőstény aortaszűkített (aortic banding [AB]) patkányokban egyaránt. C: A 12. héten a relatív falvastagság (RWT) fokozódása nőstény AB állatokban koncentrikus geometriát igazolt. Ezzel szemben, a 12. héten hím AB állatokban excentrikus geometria volt megfigyelhető. *P <0,05 vs. korban, és nemben illesztett Sham. #: P<0,05 vs. nőstény AB.

Patológiás szívizom-hipertrófia és fibrózis markerek

A 6. héten a HW/TL és CD paraméterekben tapasztalt növekedés szívizom-hipertrófia fennállását igazolta az aortaszűkített csoportokban mindkét nemben. Emellett az intersticiális kollagén mennyiségének emelkedése és a CTGF génexpressziójának fokozódása miokardiális fibrózis kialakulására utalt hím és nőstény aortaszűkített állatokban egyaránt. E korai stádiumban nem találtunk különbséget a két nem között sem a hipertrófia, sem a fibrózis mértékében. Ugyanakkor, a 12. héten a HW/TL és CD paraméterekben szignifikánsan nagyobb mértékű növekedést tapasztaltunk nőstény aortaszűkített állatokban, hím társaikkal összehasonlítva. Ellenekezőleg, méréseink alapján a miokardiális fibrózis hím AB állatokban mutatott kifejezettebb változást a patológiás hipertrófia késői stádiumában.

BK funkció

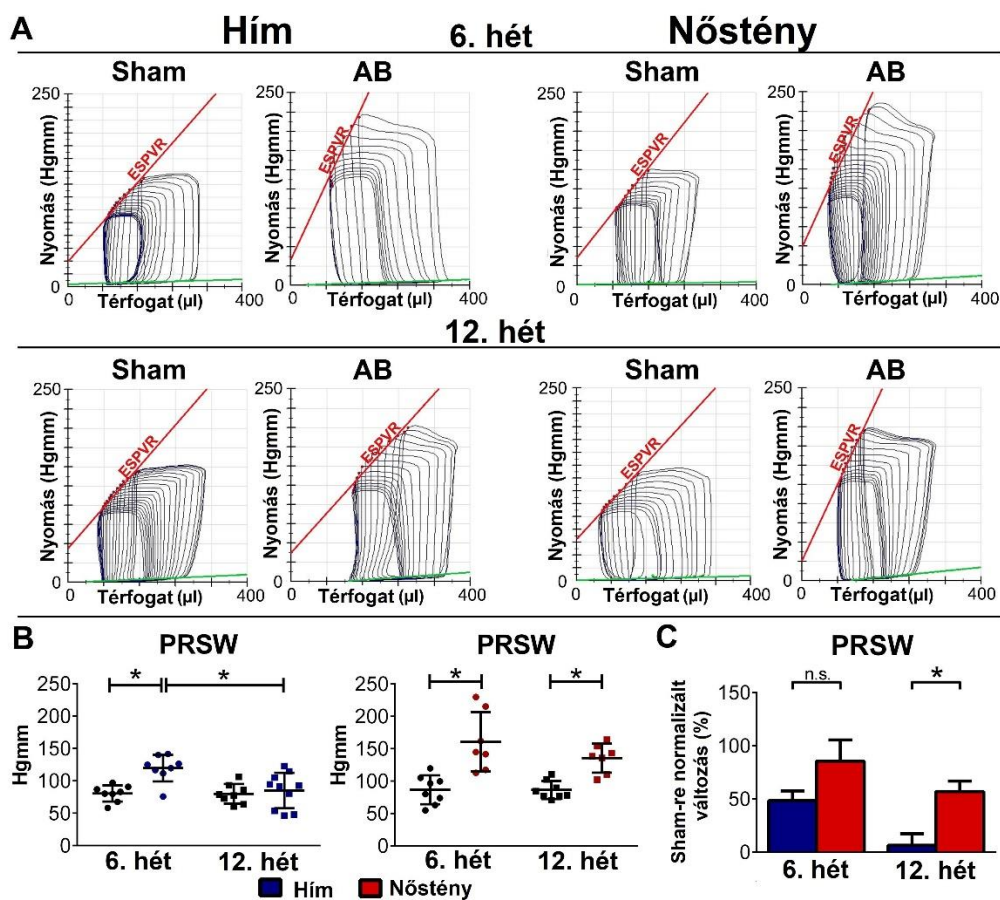
Artériás utóterhelés. A 6. és a 12. héten emelkedett SBP, DBP és MAP értékek voltak mérhetők a szűkülettől proximális érterületen az AB állatokban mindkét nem esetében.

Elő- és utóterheléstől függő szisztolés paraméterek. Az EF a 6. héten megtartott volt az AB csoportokban mindkét nemben. Ezzel ellentétben, a 12. héten az EF kizárólag nőstény AB patkányok esetében mutatott normál értéket, míg hím AB állatokban szignifikáns romlás volt kimutatható.

Elő- és utóterheléstől független kontraktilitásparaméterek. A 6. héten a BK-i kontraktilitást jellemző paraméterek (ESPVR, PRSW) fokozódtak az AB csoportokban mindkét nemben (7. ábra). A kontraktilitás növekedése nőstény aortaszűkített állatokban a 12. héten is kimutatható volt. Ugyanakkor, a kezdeti kontraktilitásnövekedés hím AB állatokban a 12. héten már nem volt jelen, és az ESPVR, valamint a PRSW értékei a hím-AB-12hét csoportban a kontrollok szintjére tértek vissza (7. ábra).

VAC. A 6. héten a kontraktilitás növekedése az AB patkányokban mindkét nem esetében eredményesen kompenzálta az emelkedett artériás utóterhelést, így a VAC fiziológiai szinten maradt. Nőstény aortaszűkített állatokban a kontraktilitás fokozódásának a fennmaradása a 12. héten is megfelelő VAC-t biztosított. Ugyanakkor hím AB állatokban a kontraktilitás növekedésének a visszaalakulása a 12. héten a VAC romlásához vezetett.

Diasztolés funkció. A 6. héten mind hím, mind nőtény aortaszűkített állatokban az aktív relaxáció romlása (Tau megnyúlása) volt megfigyelhető. Az aktív relaxációban tapasztalt romlás mértéke nem különbözött a két nem között a patológiás szívizom-hipertrófia korai stádiumában. Ezzel ellentétben a 12. héten hím AB patkányokban súlyosabb mértékű károsodást figyeltünk meg nőtény társaikkal összehasonlítva. Az aktív relaxáció mellett, a passzív telődésben szintén jellegzetes nemre specifikus változásokat tapasztaltunk a szívizom-hipertrófia késői stádiumában. Ennek megfelelően a LVEDP és az EDPVR kizárólag a hím AB csoportban mutatott romlást a 12 héten, míg nőtény állatokban ezen paraméterek fiziológiásan alacsony szinten maradtak.



7. ábra. Nemi különbségek a bal kamrai kontraktilitásban patológiás szívizom-hipertrófiában. A: vena cava okklúzió során, csökkenő előterhelés mellett regisztrált nyomás-térfogat hurkok. A reprezentatív felvételeken a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés egyenesének meredeksége (ESPVR) jelöli a kontraktilitást. B-C: A 6. héten a verőmunka-végdiasztolés térfogat összefüggés meredekségében (PRSW) tapasztalt növekedés fokozott kontraktilitást igazolt hím és nőtény aortaszűkített (aortic banding ([AB]) állatokban egyaránt. A PRSW növekedése a 12. héten csak nőtény AB patkányokban volt kimutatható, míg hímekben a PRSW a kontrollok szintjére tért vissza. *: $P < 0,05$.

Konklúzió

A fokozott nyomásterhelés által indukált szívizom-hipertrófia és szívelégtelenség a nyomásterhelés megszüntetése után visszaalakulhat. Ugyanakkor kutatások igazolják, hogy egyes betegekben a szívelégtelenség tünetei és a BK-i diszfunkció a megfelelő terápiás beavatkozások után is fennmaradnak. A miokardiális reverz remodelációban talált nagyfokú variabilitás hátterében különböző befolyásoló tényezők állhatnak. A klinikai megfigyelések szerint e tényezők közül a nyomásterhelés megszüntetésének időpontja illetve a betegek neme kiemelkedő jelentőséggel bírhat. Kutatásainkban ezen faktorok szerepét kívántuk vizsgálni standard laboratóriumi körülmények között.

Kutatásunk egyik fő tanulsága, hogy a károsodott BK-i szisztolés funkció mind a korai, mind a késői nyomásterhelés-csökkentő terápiát követően helyreáll. E jelenséget az magyarázza, hogy a szisztolés diszfunkció hátterében még a patológiás szívizom-hipertrófia késői szakaszában sem a BK-i kontraktilitás csökkenése, hanem az artériás utóterhelés növekedése áll. Következésképpen a fokozott nyomásterhelés megszüntetése mind a korai, mind a késői stádiumban a ventrikulo-artériás kapcsolat gyors normalizálódásához vezet, mely a szisztolés funkció javulásában nyilvánul meg.

A szisztolés funkcióval ellentétben ugyanakkor a diasztolés funkciónak mindkét komponense (aktív relaxáció és passzív telődés) jelentősebb javulást mutatott korai nyomásterhelés-csökkentés esetén. A BK-i szívizomminták részletes hisztológiai és molekuláris elemzése arra enged következtetni, hogy az intersticiális és perivaszkuláris fibrózis fennmaradása állhatott a diasztolés diszfunkció perzisztálása mögött a késői debanded csoportban. A diasztolés funkcióban talált jelentős különbségek a korai beavatkozások szükségességére hívják fel a figyelmet.

A beavatkozások időpontja mellett a klinikai vizsgálatok felvetették a lehetőségét, hogy a női nem szintén befolyásoló hatással bírhat a reverz remodelációra. Jelen vizsgálatunkban, a patológiás szívizom-hipertrófia késői stádiumában kisebb mértékű miokardiális fibrózis és kedvezőbb diasztolés funkció jellemezte a nőtény aortaszűkített állatokat hím társaikkal összehasonlítva. Tekintve, hogy a fibrózis és a diasztolés funkciózavar voltak azok a tényezők, melyekben csökkent regenerációt találtunk, eredményeink alapján nőkben a nyomásterhelés megszüntetése valóban teljesebb funkcionális regenerációt idézhet elő.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

- I. **Ruppert M***, Bódi B*, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Jiang W, Lehmann L, Oláh A, Barta BA, Sayour AA, Merkely B, Karck M, Papp Z, Szabó G, Radovits T. (2019) Myofilament Ca^{2+} sensitivity correlates with left ventricular contractility during the progression of pressure overload-induced left ventricular myocardial hypertrophy in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 129:208-218.
IF: 5,055
*: megosztott elsőszerzőség
- II. **Ruppert M**, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Jiang W, Oláh A, Sayour AA, Barta BA, Karime C, Merkely B, Karck M, Radovits T, Szabó G. (2019) Incomplete structural reverse remodeling from late-stage left ventricular hypertrophy impedes the recovery of diastolic but not systolic dysfunction in rats. *J Hypertens*, 37:1200-1212.
IF: 4,209
- III. **Ruppert M**, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Jiang W, Lehmann L, Oláh A, Sayour AA, Barta BA, Merkely B, Karck M, Radovits T, Szabó G. (2018) Pressure-volume analysis reveals characteristic sex-related differences in cardiac function in a rat model of aortic banding-induced myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315:H502-H511.
IF: 4,048
- IV. **Ruppert M**, Bódi B, Nagy D, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Oláh A, Barta BA, Sayour AA, Benke K, Karck M, Merkely B, Papp Z, Szabó G, Radovits T. (2019) A miofilamentáris rendszer Ca^{2+} -érzékenysége korrelál a bal kamrai kontraktilitással a fokozott nyomásterhelés által előidézett patológiás szívizomhipertrófia patkánymodelljében. *Cardiol Hung*, 49: 88-99.