

Nitrogén monoxid által közvetített kardioprotekció a szívizom iszkémiás károsodása és a sportszív kialakulása során

Doktori tézis

Dr. Lux Árpád

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szelid Zsolt PhD

Opponensek: Dr. Kaszaki József PhD, med. habil.
Dr. Kováts Tímea PhD

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Rosivall László, DSc.

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Nyolczas Noémi PhD
Dr. Miklós Zsuzsanna PhD

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

A bemutatott munka célja a nitrogén monoxid jelátvitel patológiás és élettani kardiovaszkuláris adaptációban betöltött szerepének vizsgálata volt.

Több, mint 30 éve derült fény arra, hogy a titokzatos EDRF (endothelium-derived relaxing factor) valójában nem más, mint a nitrogén monoxid (NO). Széles körben ismert, hogy biológiai rendszerekben ezt a szerves, könnyen oldódó gázt vagy endogén nitrogén szintetázok (NOS) állítják elő L-argininből, vagy nitritből esetleg nitrátból redukálódik. Három NOS izoforma került leírásra (endoteliális, neuronális, indukálható), és általánosan elfogadottá vált az endoteliális NOS szív-érrendszeri szabályozásra kifejtett jelentős befolyása.

Az NO hatását cGMP közvetített jelátvitellel, vagy attól függetlenül, (nitrozatív és S-nitrozilációs fehérje módosítások)fejtí ki. A cGMP jelentős másodlagos jelátvivő molekula, amit a citoplazmában található (sGC) vagy a sejtmembránhoz kapcsolódó (pGC) guanilát cikláz enzimek termelnek. A cGMP közvetlen célpontjai illetve jelátvitelének szereplői a protein kináz G (PKG), a ciklikus-nukleotid kapuzott ion csatornák (CNG), és a cGMP-t hidrolizáló foszfodiészterázok (PDE). Ez utóbbi enzimek közül néhány alloszterikus cGMP kötőhellyel is rendelkezik. A cGMP affinitását célpontjaival szemben foszforiláció és egyéb fehérje módosítások is szabályozzák.

A kardiovaszkuláris NOS / sGC jelátvitelért nagyrészt a PKG család egy tagja, a PKGI α felel. Részt vesz a kalcium szint és jelátvitel, a sejtvezeték szerveződés, a simaizom összehúzódás, a génfunkció, a fibroblaszt mobilitás, a neutrofil migráció és saját PDE mediált katabolizmusának szabályozásában, valamint anti-apoptotikus hatással is bír.

A foszfodiészterázok a cGMP és cAMP lebontásáért felelős katabolikus enzimek. A család 21 tagjából ötnek van

kardiovaszkuláris aktivitása, melyek közül szelektív gátlószerei miatt a PDE-5-t vizsgálták a legrészletesebben.

Az iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodás a szívműködés jelentős, potenciálisan halálos funkcióvesztésével jár, és feltételezhetően az iszkémiás szívkárosodás 40-50%-ért felelős. Az iszkémiás jelrendszer által okozott kezdeti sérülés után a reperfúzió és a pH gyors normalizálódása további szabadgyök-képződéshez, kalcium oszcillációhoz, a mitokondriális légzési lánc szétkapcsolásához, neutrofil infiltrációhoz és „NOS uncoupling”-hoz vezet.

Többek között az inhalált nitrogén monoxiddal történő NO pótlásról és a cGMP katabolizmus gátlásáról is ismert, hogy hatékonyan csökkentik az I/R károsodást. Az NO inhalációt követően a vérben képződő metabolitokból az iszkémiás régióban az alacsony oxigén koncentráció és a savas pH hatására a NO felszabadul, majd aktiválja a NOS/sGC jelátvitelt. A cGMP jelátvitel PDE-5 gátlókkal történő szelektív fokozása hatékonyan véd a szívizom hipertrófia, az iszkémiás kardiomiopátia és az I/R károsodás ellen.

A nitrogén monoxid jelátvitel az edzés indukálta szív-adaptációban is részt vesz. Intenzív testedzés hatására jobb- és balkamrai hipertrófia alakul ki, megnő a szívizom tömege és emelkedik a nyugalmi verőtérfogat – ezeket a változásokat összességében sportszívnek nevezzük. A folyamatnak legfőbb mozgatórugói a serkentő hormonok (pl. az inzulin-szerű növekedési hormon). Ezen felül a mozgás által indukált endoteliális NOS aktivitásról ismert, hogy komolyan befolyásolja a szív kontrakciós erejét és mobilizálja valamint toborozza a szív- és ér eredetű progenitor sejteket.

Az endoteliális NOS gén mutációiról már korábban leírták, hogy megváltoztatják az NO biohasznosulását, befolyásolják a sportolói teljesítményt és bizonyos mértékben kihatnak a bal kamrai remodellációra.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám az NO-közvetített kardioprotekció két különböző és egyben speciális aspektusával foglalkozik: (1) az iszkémia-reperfúziós károsodás és a kedvezőtlen iszkémiás remodelláció mérséklésével és (2) az emberi szív sport-adaptációjával.

A rágszálókon végzett vizsgálatban az inhalált NO által (iNO) fokozott cGMP szintézis és a tadalafil (TAD) által gátolt cGMP lebontás iszkémia reperfúzióra kifejtett együttes hatását vizsgáltuk. Célkitűzéseim a következők voltak:

- Egy megismételhető, iszkémia-reperfúziós (I/R) rágszáló modell kifejlesztése
- Az iNO és TAD kezelések szív-funkcióra és szerkezetre kifejtett hatásának vizsgálata iszkémia-reperfúziót követően

Élsporthókban, „single gene approach” segítségével vizsgáltuk az NO biológiai hasznosulásának genetikailag meghatározott különbségeinek szerepét a sporttal összefüggő szív-adaptációban. Célkitűzéseim a következők voltak:

- Helyi szűrőprogramok számára is felhasználható DNS-izoláló és génpolimorfizmust (SNP) elemző eljárás kialakítása.
- A NOS3 Glu298Asp polimorfizmus és a szív sport-adaptációja közti összefüggések vizsgálata.

3. MÓDSZEREK

3.1 Iszkémia-reperfúziós károsodás csökkentés

3.1.1. I/R indukció és vizsgálati terv

Az I/R indukciót azonos korú, felnőtt, hím C57B16J egereken altatás után, lélegeztetés mellett végeztük. Az

iszkémiát az elülső leszálló koronária (LAD) egyórás átmeneti lekötésével váltottuk ki. Műtét utáni fájdalomcsillapítást két napon át alkalmaztunk.

Az egereket négy kezelési csoportba randomizáltuk és vagy három napig (3d), vagy négy hétig (4w) követtük: kezeletlen kontroll (CON), inhalált nitrogén monoxid (iNO), tadalafil (TAD) és kombinált kezelés (iNO+TAD). Az inhaláció a reperfüzió előtt 30 perccel kezdődött és az azt követő 20. percgig tartott. A tadalafilt egy órával az I/R előtt közvetlenül a gyomorba adtuk (4 mg/kg). A cGMP szinteket egy külön vizsgálati populációnál mértük.

3.1.2. Szívtultrahang vizsgálat

A transztorakális szívtultrahang vizsgálatot (TTE) altatott és hőmérséklet kontrollált egereken, 18-33 Mhz-es ultrahangfejjel végeztük. Megmértük a vég-szisztolés és diasztolés bal kamrai átmérőket (LVIDd és LVIDs), a vég-szisztolés és diasztolés szeptum és hátsó fal vastagságot (IVSd, IVSs, LVPWd, LVPWs) és kiszámoltuk a frakcionális rövidülést (FS).

3.1.3 Invazív hemodinamikai vizsgálatok

Három nap után invazív vérnyomásmérést, négy hét után invazív nyomás-konduktancia méréseket végeztünk. Nyugalmi nyomás-térfogat és a párhuzamos szöveti vezetőképesség figyelembevételével fokozatosan csökkenő előterhelés melletti okklúziós görbéket rögzítettünk. A rögzített mérések utólagos értékelésekor részletesen kifejeztük a szisztolés és diasztolés mutatókat.

3.1.4. Infarktus-méret és szívtizom nekrozis meghatározás

Három nappal az I/R után, a jobb nyaki ütőéren keresztül kék szövet-festéket adtuk a keringéshez (a LAD ismételt lekötése mellett). Az agarózba beágyazott szíveket 500 µm vastag szeletekre vágtuk és TTC-vel (triphenyl tetrazolium

chloride) festettük. Fényképeket készítettünk, amiket planimetriával értékeltünk. A keringő troponin I (TnI) szintet ELISA segítségével az I/R előtt (alapszint), valamint 4 és 24 órával a reperfüzió során mértük meg.

3.1.5. cGMP szint meghatározás

A vérmintákat IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) oldatot tartalmazó csövekbe gyűjtöttük, a balkamrákat folyékony nitrogén segítségével porítottuk és extraháltuk. Plazma és szöveti cGMP szinteket határoztunk meg.

3.1.6. Nitrogén monoxid származékok mérése

A vérben oldott nitrogén monoxid származékok mérése ózon alapú kemilumineszcenciás méréssel történt. A reperfüzió után 20 perccel gyűjtött szíveket homogenizáltuk, extraháltuk, a fehérje koncentrációt BCA (bicinchoninic acid assay) segítségével mértük, majd 5 mg/mL-re beállítottuk. A szívkivonatokból és a plazmából ELISA-val 3-nitrotirozin meghatározást végeztünk.

3.1.7. A sejtközi kollagén-lerakódás és a myeloperoxidáz-pozitív sejt-infiltráció meghatározása

Reperfüzió után három nappal myeloperoxidáz festést (MPO) végeztünk. A balkamrai szívsövénybe és szabad falba infiltráló sejteket mozaikképeken számoltuk meg. A kollagén lerakódást szemi-kvantitatív szín-küszöböléses módszerrel, Sirius vörössel festett szívizom metszeteken mértük.

3.1.8. Statisztikai elemzés

Minden adat átlag \pm SEM formában lett feltüntetve. A statisztikai próbákhoz One-way ANOVA-t Bonferroni post hoc teszttel, two.way ANOVA-t Dunnett teszttel és Kruskal-Wallis tesztet Dunn post hoc teszttel használtunk. A <0.05 P értéket szignifikánsak fogadtuk el.

3.2 A NOS3 Glu298Asp polimorfizmus és a poszt-adaptáció

3.2.1. A résztvevők kiválasztása

Magasan kvalifikált magyar atlétákat (n=145) és hasonló etnikai valamint szociális háttérrel rendelkező, kor és nem szerint egyeztetett edzetlen embereket szűrtünk.

3.2.2. Spiroergometria

Elektromágnesesen fékezett kerékpár ergométeren, teljes kifáradásig tartó folyamatos rámpatesztet végeztünk. A ventilációs paramétereket és légzési adatokat légvételtől légvételre rögzítettük. Mértük a vitális mutatókat, a vér laktát szintjét és a szubjektív kifáradást (BORG skála). Az 50ml/kg/perc VO₂ maximum alatt teljesítő sportolókat, illetve az e felett teljesítő kontrollokat kizártuk a további elemzésből.

3.2.3 A szív mágneses rezonancia vizsgálata (cMRI)

Volumetriás méréseket végeztünk szív MRI vizsgálattal és meghatároztuk az ejekciós frakciókat, a maximális vég-szisztolés és diasztolés falvastagságokat, valamint a vég-diasztolés és szisztolés kamrai indexeket. Testsúlyt és testmagasságot mértünk, majd a testfelszínt a Mosteller formulával számoltuk ki.

3.2.4 DNS izolálás és genotipizálás

Proteáz alapú technikával teljes perifériás vérből genomiális DNS-t izoláltunk. A nyert DNS mennyiségét és minőségét spektrofotometriával határoztuk meg. A Glu298Asp polimorfizmus genotipizálását mennyiségi, reverz transzkripciót alkalmazó polimeráz láncreakció (qRT-PCR) és a kereskedelmi forgalomban elérhető primerek segítségével végeztük.

3.2.5 Statisztikai analízis

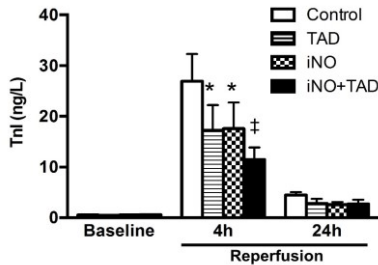
A folyamatos változókat átlag \pm SD, a kategórikus változókat n(%) formában tüntettük fel. A két csoport közötti összehasonlításokat t próbával és khi² próbával végeztük. A faktorok közötti interakciókat ANOVA-val (Tukey HSD post-hoc teszttel), lineáris regresszióval és multivariáns analízissel vizsgáltuk. A <0.05 P értékeket tekintettük szignifikánsnak. A számításokat SPSS 22.0 programcsomaggal végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az iszkémia-reperfúziós sérülés csökkentése

4.1.1. A kombinált iNO és TAD kezelés szinergikus kardioprotekciót nyújt I/R után

Az iNO (n=9; 17.6 \pm 5.1 ng/l) és TAD (n=7; 17.3 \pm 5.0 ng/l) mellett a CON (n=9; 24.6 \pm 5.3 ng/l) állatokhoz viszonyított és 4 óra után elért TnI plazmaszint csökkenést a kombinált kezelés tovább fokozta (n=9; 11.4 \pm 2.4 ng/l, 1. Ábra).

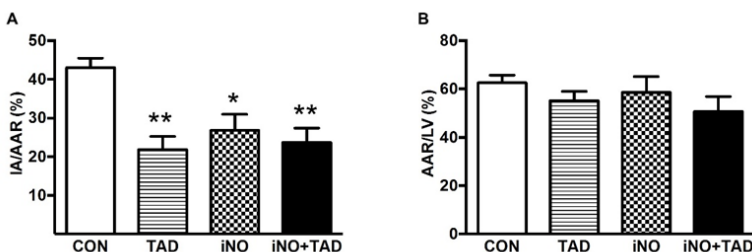


1. Ábra. Troponin I (TnI) plazmaszintek. A biomarker felszabadulás 4 óra után csúszosodott és 24 óra után normalizálódott. A TAD (n=7), iNO (n=9) és iNO+TAD (n=9) kezelések a CON-hoz viszonyítva szignifikánsan csökkentették a TnI szinteket. * P<0.05, ** P<0.001 vs CON.

A TTC festés alapján a veszélyeztetett terület (AAR) minden csoportban a bal karma területének ~57%-át tette ki, de

nem kompromittálta a hemodinamikai állapotot vagy a korai, 3 napos túlélést.

Az AAR-en belüli életképtelen terület jelentősen lecsökkent a TAD (n=8), iNO (n=5) és iNO-TAD (n=5) kezelt állatokban ($27\pm 4\%$, $22\pm 3\%$ és $24\pm 4\%$ vs, CON $43\pm 2\%$ -kal (n=7), $P<0.05$). A TTC festés korlátozott diszkriminatív ereje további különbségtételt nem tett lehetővé. (2. Ábra).

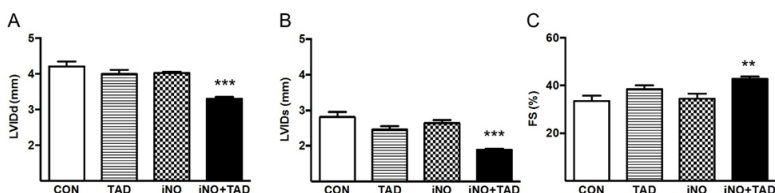


2. Ábra. A TTC festett minták planimetriás analízise. A CON állatokkal szemben minden kezelés (CON n=7, TAD n=8, iNO n=5, iNO+TAD n=5) csökkentette az AAR-hez viszonyított infarktus méretet (IA, A panel). Az AAR/LV arány összemérhető volt a csoportok között. (B panel). CON = kezeletlen, TAD = Tadalafil, iNO = inhalált nitogén monoxid, iNO+TAD = kombinált kezelés. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CON

A bal kamra hosszútávú (4w) szerkezeti és funkcionális átalakulását ultrahanggal és nyomás-térfogat analízissel vizsgáltuk. Egyedül a kombinált kezelés mérsékelte jelentősen a nemkívánatos remodellinget és javította a frakcionális rövidülést (3. Ábra). A peri-infarktus területek mérése alapján minden kezelés csökkentette a hipertrófiát és megőrizte a falvastagodást. (1. Táblázat).

A nyomás-térfogat analízis jelentősen nagyobb verőtérfogatot mutatott az iNO+TAD kezelt állatoknál, ami összemérhető szívfrekvencia mellett ezzel arányos perctérfogat növekedéshez vezetett. Az iNO kezelt egereknél közepes reakciót észleltünk, nagyobb vég-szisztolés nyomással és verőmunkával. Egy, az előterheléstől független mutató, a PRSW

(preload-recrutable stroke work) különbségei nem érték el a szignifikáns mértéket. A kamrai elasztancia, Ees, érdemben nem különbözött és normál tartományban mozgott. Ennek megfelelően az Ea/Ees hányadossal jellemzett kamrai-érrendszeri összhangot kifejező mutató nem jelzett jelentős különbséget a vizsgált csoportok között. A diasztolés funkcionális mutatókat (LVEDP, dP/dt_{min} és izovolumetriás relaxációs idő (τ)) a kezelési stratégia nem befolyásolta (2. Táblázat).



2. Ábra. A szerkezeti változások szívultrahangos mérése. Négy hét után iNO+TAD kezelés (kombinált szerek, n=13) hatására a kezeletlen (n=13), Tadalafil (n=12) és iNO (inhalált NO, n=13) csoportokhoz viszonyítva csökkent a balkamrai vég-diasztolés és vég-szisztolés átmérő (LVIDd; LVIDs, A és B panel). Az iNO+TAD kezelt állatoknál, a többi csoporthoz képest frakcionális rövidülés (FS) kedvezőbb értéket mutatott. (C panel). *** P<0.001 vs CON, iNO és TAD és ** P<0.01 vs CON és iNO.

	N	IVSd (mm)	WT _{IVS} (%)	LVPWd (mm)	LVPWs (mm)	WT _{PW} (%)
CON	11	1.07±0.05	24±6	1.05±0.03	1.23±0.004	18±4
TAD	12	0.93±0.02 **	40±3	0.99±0.01	1.23±0.005	25±1
iNO	10	0.90±0.03 **	48±5 **	0.94±0.03 *	1.27±0.015 **	35±5 **
iNO+TAD	13	0.87±0.02 **	52±3 ***	0.93±0.02 **	1.23±0.003	32±2 *

1. Táblázat. Szívultrahangos mérések. IVSd és IVSs – diasztolés és szisztolés kamrai szeptum vastagság, LVPWd és LVPWs – diasztolés és szisztolés hátsófal vastagság, WT_{IVS} és WTPW – a szeptum és a hátsó fal vastagodása, százalékosan kifejezve. CON = kezeletlen, TAD = Tadalafil, iNO = inhalált nitrogén monoxid, iNO+TAD = kombinált kezelés. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 vs CON

	CON (n=11)	TAD (n=13)	iNO (n=12)	iNO-TAD (n=13)
HR (BPM)	601±12	604±14	603±15	609±13
LVESP (mmHg)	78±3	85±4	89±2*	82±3
LVEDP (mmHg)	2.4±0.6	2.1±0.3	3.5±0.7	2.3±0.5
SV (μL)	10.2±0.9	11.0±1.1	13.6±1.1	14.9±1.2*
CO (μL/min)	6129±566	6637±713	8277±707	9156±773*
EF (%)	50.6±4	54±4	54±4	59±3
SW (mmHg x μL)	771±85	932±91	1205±97*	1134±119
PRSW	69±8	71±6	75±10	94±8
Ea (mmHg/μL)	7.8±1.1	7.0±0.5	6.3±0.7	5.7±0.3
Ees (mmHg/μL)	10.1±2.8	10.3±1.5	6.7±1.1	9.1±2.2
Ea / Ees	1.01±0.16	0.79±0.09	1.10±0.14	0.83±0.13
dP/dt _{max} (mmHg/s)	8795±946	9956±646	11899±879	10617±969
dP/dt _{min} (mmHg/s)	-7498±538	-8248±586	-8930±822	-7837±396
τ (ms)	5.2±0.2	5.2±0.2	5.0±0.3	5.1±0.2

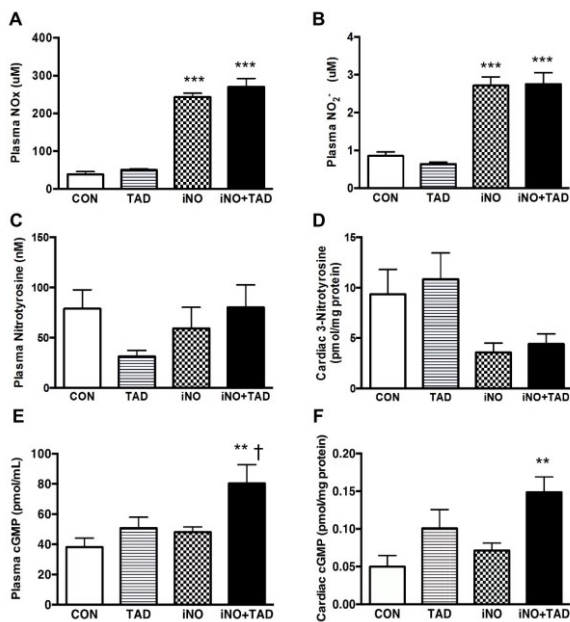
2. Táblázat. Nyomás-térfogat analízis 4 hét után. HR- szívfrekvencia (/perc); LVESP és LVEDP – balkamrai vég-szisztolés és vég-diasztolés nyomás; SV - verőtérfogat, CO – perctérfogat (cardiac output); EF - ejekciós frakció; SW - verőmunka; PRSW - preload-recruitable stroke work; Ea - arteriális elasztancia; Ees – bal kamrai vég-szisztolés elasztancia,; Ea/Ees arány – ventrikulo-arteriális kapcsolás; dP/dt_{max} és dP/dt_{min} - időegység alatt bekövetkező nyomásváltozás maximális és minimális értéke; τ- tau az izovolumetriás relaxáció Weiss módszere alapján számított időállandója.. Minden adat átlag±SEM formában van feltüntetve. CON = kezeletlen egerek, TAD = Tadalafil, iNO = inhalált nitrogén monoxid, iNO+TAD = kombinációs kezelés. * P<0.05 vs CON

4.1.2. Nitrogén monoxid származékok és nitrozatív stressz

Az NO inhaláció után mért plazma NO_x szintek (nitrát, nitrit és S-nitroso vegyületek) 5-6-szoros emelkedést mutattak (P<0.0001), a plazma nitrit koncentrációja pedig háromszorosa volt a CON és TAD csoportokénak (P<0.0001). Érdekes módon a közvetlen reperfüziós szakban mért szöveti nitrotirozin tartalom alacsonyabb tendenciát mutatott. (P=0.10 és 0.08).

Az iNO és TAD kezelések utáni plazma cGMP szint érdemben nem változott (48±3 pmol/mL [n=8] és 51±7 pmol/mL [n=6] vs 38±6 pmol/mL [n=7] a CON állatokban), de

közel megduplázódott az iNO+TAD kezelés után (80 ± 12 pmol/mL [$n=7$], $P < 0.01$ vs CON és iNO, $P < 0.05$ vs TAD).

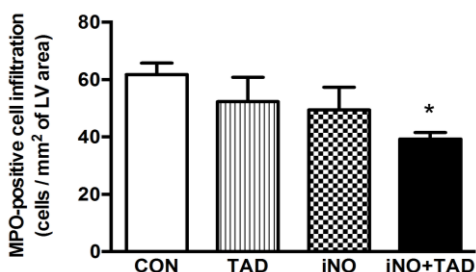


3. Ábra. NO eredetű oxidációs termékek, 3-nitrotirozin szintek és cGMP szintek a plazmában és a szív-szövetben. Plazma NO_x (nitrátok, nitrit és S-nitroso vegyületek, A panel) és nirtit szintek (NO₂-, B panel) mértünk minden vizsgálati csoportban (CON ($n=8$), TAD ($n=7$), iNO ($n=7$), and iNO+TAD ($n=8$)). A nitrozatív stressz becslése a 3-nitrotirozin (3-NT) származékokat tartalmazó fehérjék ELISA meghatározásával történt (C-D panelek). A keringő és szív-szöveti cGMP szinteket enzimmunoassayval mértük. (E-F panelek) Amíg az iNO+TAD kezelés hatására a plazma cGMP szint jelentősen megemelkedett ($n=7$; $P < 0.01$ vs CON és $P < 0,05$ vs iNO), addig a TAD ($n=6$) és iNO ($n=8$) kezelések érdemben nem tértek el a CON csoporttól. Hasonlóképp a CON csoporthoz képest az iNO+TAD ($n=7$) igen, de a TAD ($n=8$) vagy az iNO ($n=6$) nem emelte meg a szöveti cGMP szintet ($P < 0.01$, F panel). CON = kezeletlen egerek, TAD = Tadalafil, iNO = inhalált nitrogén monoxid, iNO+TAD = kombinációs kezelés *** $P < 0.0001$ vs CON és TAD, ** $P < 0.01$ vs CON, † $P < 0.05$ vs iNO

Ezzel párhuzamosan a szöveti cGMP szint csak az iNO+TAD kezelés után emelkedett meg (0.15 ± 0.02 pmol/mg [$n=7$] vs 0.05 ± 0.01 pmol/mg a CON-ban [$n=7$], $P < 0.01$), az iNO (0.07 ± 0.01 pmol/mg [$n=6$]), illetve TAD (0.10 ± 0.02 pmol/mg [$n=8$]) kezelések nem okoztak változást. (3. Ábra).

4.1.3. Az iNO+TAD kezelés mérsékli a leukocita infiltrációt

Három nap után a mid-ventrikuláris keresztmetszeti felszínhez viszonyított MPO-pozitív sejtszám jelentősen alacsonyabb volt az iNO+TAD kezelt egerekben. ($P=0.02$ vs CON, 4. Ábra).



4. Ábra. Myeloperoxidáz pozitív (MPO) sejt-infiltráció 3 nappal az I/R után. Az iNO+TAD ($n=6$) kezelés mellett a CON ($n=5$) egerekhez képest jelentősen csökkent az MPO-pozitív sejt-infiltráció, az iNO ($n=6$) vagy TAD ($n=7$) kezelésnek csak szerény hatása volt. CON = kezeletlen egér, TAD = Tadalafil, iNO = inhalált nitrogén monoxid, iNO+TAD = kombinációs kezelés. * $P < 0.05$ vs CON

4.2. A NOS3 Glu298Asp polimorfizmus és a szív sport-adaptációja

4.2.1. Hasonló háttérű sportolók és edzetlen személyek

Az életkor és a nemek eloszlása (25.4% és 29.7% nő, sportolók és edzetlen személyek) nem különbözött a vizsgálati csoportok között. A férfiak, illetve a sportolók testmagassága, súlya, testtömeg indexe és testfelszíne meghaladta a nőket és az edzetlen személyekét. (3. táblázat)

	Sportolók		
	Összes (n=126)	Férfiak (n=94)	Nők (n=32)
<i>Kor (év)</i>	25.9±5.5	26.9±5.7	24.9±5.3
<i>Magasságt (m)</i>	1.87±0.11 *	1.95±0.04 †	1.77±0.07 ‡
<i>Súly (kg)</i>	85.2±15.6 *	97.5±8.3 †	72.3±10.2 ‡
<i>BMI (kg/m²)</i>	24.8±2.6	25.8±2.2	23.4±2.5
<i>BSA (m²)</i>	2.18±0.28 *	2.38±0.1 †	1.89±0.3 ‡

	Nem-sportolók		
	Összes (n=155)	Férfiak (n=109)	Nők (n=46)
<i>Kor (év)</i>	27.4±5.2	27.1±5.1	28.0±5.7
<i>Magasságt (m)</i>	1.76±0.11	1.83±0.07	1.67±0.09
<i>Súly (kg)</i>	70.5±15.3	81.4±13.6	59.9±7.2
<i>BMI (kg/m²)</i>	22.8±4.3	24.1±4.6	21.6±3.9
<i>BSA (m²)</i>	1.94±0.3	2.08±0.3	1.74±0.2

3. Táblázat. A sportolók és edzetlen személyek jellemzői. * $p < 0.01$ vs minden edzetlen személy, † $p < 0.01$ vs edzetlen férfiak, ‡ $p < 0.01$ vs edzetlen nők. A testtömeg index mind a sportolók és nem-sportolók, mind a férfiak és nők között különbözött. ($p < 0.05$). A férfiak és nők súlya, magassága, testfelszíne és testtömeg indexe mindkét csoportban különbözött. ($p < 0.05$).

4.2.3. Szív-morfológia és funkció

A sportolók térfogat- és tömeg indexei jelentősen nagyobbak mutatkoztak, míg a nyugalmi ejekciós frakciókban (LVEF, RVEF) nem volt eltérés. Ezen felül a sportolói aktivitástól független, szignifikáns nemi különbségeket regisztráltunk. (4. Táblázat). A kimerüléskor mért VO₂ maximum (60 ± 7 vs 40 ± 7 ml/kg/min, $p < 0.0001$) és perc-ventilláció (VE, 150 ± 15 versus 84 ± 39 l/min, $p < 0.0001$) szignifikánsan nagyobb volt a sportolóknál, illetve mindkét csoporton belül a férfiak között.

4.2.4. Genotípus eloszlás

Az allél eloszlás (minor allél frekvencia 0.27 és 0.26 a nem-sportolók és a sportolók esetén) hasonló volt mindkét csoportban, és nem korrelált a sportolói teljesítménnyel. A vizsgált genotípusok Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak.

	Sportoló			Nem-sportoló		
	Összes	Férfi	Nő	Összes	Férfi	Nő
N	126	94	32	155	109	46
<i>LVEF (%)</i>	58.5 ±6.3	57.8 ±4.3	60.4 ±9.7	59.4 ±4.3	59.5 ±4.4	58.4 ±4.2
<i>LVEDVi (ml/m²)</i>	116.2 ±17.4 *	121.4 ±14.9 ‡	102.4 ±16.2	92.9 ±12.9	97.3 ±11.1 ‡	84.4 ±13.2
<i>LVESVi (ml/m²)</i>	48.8 ±11.2 *	51.4 ±9.6 ‡	41.9 ±12.1	37.8 ±7.6	39.5 ±7.3 ‡	35.4 ±8.0
<i>LVMi (g/m²)</i>	81.1 ±19.6 *	88.1 ±15.9 ‡	62.4 ±16.0	61.3 ±13.9	68.1 ±10.4 ‡	47.0 ±10.1
<i>LVSVi (ml/m²)</i>	67.6 ±8.3 *	69.8 ±8.1 ‡	61.6 ±5.6	54.8 ±7.8	57.8 ±6.8 ‡	49.0 ±6.8
<i>RVEF (%)</i>	57.9 ±6.2	57.1 ±4.0	60.2 ±9.9	58.5 ±4.8	58.2 ±4.9	58.2 ±4.4
<i>RVEDVi (ml/m²)</i>	121.5 ±19.6 *	127.8 ±17.4 ‡	106.0 ±17.3	95.5 ±15.2	100.7 ±14.1 ‡	85.7 ±13.4
<i>RVESVi (ml/m²)</i>	53.2 ±11.3 *	55.8 ±10.9 ‡	46.6 ±9.9	39.8 ±9.6	42.6 ±9.9 ‡	35.3 ±7.3
<i>RVSVi (ml/m²)</i>	68.2 ±10.2 *	70.7 ±9.5 ‡	61.5 ±9.2	56.7 ±7.0	58.3 ±6.4 ‡	52.4 ±7.7
<i>RVMi (g/m²)</i>	29.9 ±6.1 *	32.5 ±4.6 ‡	23.5 ±5.4	24.4 ±4.3	25.3 ±3.5 ‡	20.1 ±3.0

4. Táblázat. A résztvevők szív-MRI paramétereit. n –résztvevők száma; LV – bal kamrai, LVEF – LV ejekciós frakció; LVEDVi - LV végdiasztolés térfogat index; LVESVi – LV vég-szisztolés térfogat index; LVMi – LV tömeg index; LVSVi – LV verőterfogat volume index; RV – jobb kamrai, RVEF – RV ejekciós frakció; RVEDVi – RV vég-diasztolés térfogat index; RVESVi – RV vég-szisztolés térfogat index; RVSVi – RV verőterfogat index; RVMi – RV tömeg index

* p<0.01 vs minden nem-sportoló, ‡ p<0.01 vs nők. A vizsgált csoportok életkorban nem tértek el egymástól.

4.2.4. Szerkezet és funkció összefüggése a genotípussal

A nyugalmi RVSVi (60±9 vs. 62±12 ml/m², p=0.047) és RVMi (26±6 vs. 27±6 g/m², p=0.019) a Glu homozigóttal összevetve magasabb volt az Asp allélt hordozóknál. (sportolók és nem sportolók, n=133 vs. n=148). Az Asp allélt hordozó sportolók RVMi-jét és RVSVi-jét magasabbnak találtuk a Glu homozigóttal. (31.7±5.5 vs. 27.4±6.0 g/m², p<0.01 és 71.1±9.6 vs. 64.3±9.8 ml/m², p<0.001). Nem sikerült

összefüggést igazolni a nem-sportolóknál, valamint a genotípus és a bal kamrai illetve légzésfunkciós paraméterek között.

	Sportolók (VO2 max >50ml/kg/min)		Nem-sportolók (VO2 max <50ml/kg/min)		P
	Glu/Glu	Glu/Asp + Asp/Asp	Glu/Glu	Glu/Asp + Asp/Asp	
N	64	62	84	71	-
<i>LVEF (%)</i>	58.3±8.1	58.7±4.5	59.1±2.4	60.0±6.7	0.688
<i>LVEDVi (ml/m²)</i>	115.1±20.5 *	117.0±14.9 *	92.1±14.6	94.4±9.3	<0.001
<i>LVESVi (ml/m²)</i>	49.2±13.3 *	48.5±9.3 *	37.8±7.8	37.9±7.6	<0.001
<i>LVMi (g/m²)</i>	77.9±23.1 *	83.5±16.2 *	60.3±15.3	63.2±11.2	<0.001
<i>LVSVi (ml/m²)</i>	66.4±7.6 *	68.5±8.7 *	54.1±7.6	56.1±8.2	<0.001
<i>RVEF (%)</i>	57.7±8.1	58.1±4.4	58.3±4.1	58.4±5.8	0.427
<i>RVEDVi (ml/m²)</i>	117.8±19.9 *	124.4±19.1 *	95.6±17.6	95.4±9.8	<0.001
<i>RVESVi (ml/m²)</i>	53.0±10.5 *	53.4±12.1 *	40.4±11.0	38.7±6.5	<0.001
<i>RVSVi (ml/m²)</i>	64.3±9.8 #*	71.1±9.6 *	56.6±6.7	56.8±7.8	<0.001
<i>RVMi (g/m²)</i>	27.4±6.0 #*	31.7±5.5 *	25.3±4.7	23.3±3.4	<0.001

11. Táblázat Genotípusokhoz tartozó szív-MRI paraméterek. n – résztvevők száma; LV – bal kamrai; LVEF – LV ejekciós frakció; LVEDVi – LV vég-diasztolés kamrai volumen index; LVESVi – LV vég-szisztolés kamrai volumen index; LVMi – LV tömeg index; LVSVi – LV verőtér fogat index; RV – jobb kamrai; RVEF – RV ejekciós frakció; RVEDVi – RV vég-diasztolés tér fogat index; RVESVi – RV vég-szisztolés tér fogat index; RVSVi – RV verőtér fogat index; RVMi – RV tömeg index
 Variancia analízissel szignifikáns különbséget igazoltunk a vizsgált csoportok között. Post hoc teszttel verifikáltuk a sportolóknál a genotípus jelentős befolyását (# p<0.001 vs Asp hordozó) a nyugalmi RVSVi és RVMi alakulására. A sportolói státusz az ejekciós frakciókon kívül minden paramétert szignifikánsan befolyásolt. (* p<0.001 vs nem-sportolók, genotípustól függetlenül).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Kombinált kezeléssel fokozható a kardio-protekción

Az iNO és TAD kezelés kombinálása biztonságos, és egereken I/R során védi a szívizomzatot. A monoterápiákhoz képest mérsékli az akut szakban mérhető troponin kiáramlást és gyulladáshoz vezetést. Ez a korai előny 4 héttel később csökkent funkcionális és szerkezeti remodellingként érhető nyomon. A kombinált kezelés csökkentette a bal kamra

tágulatát és megőrizte a regionális balkamra funkciót. Konduktancia katéterrel végzett invazív nyomásméréseink az iNO+TAD kezelt csoportban igazolták az összehúzóerő teljesítmény fokozódását és a verőterefogat jelentős emelkedését. Nem elhanyagolható, hogy a kombinált kezeléshez a plazmában jelentősen nagyobb nitrit koncentráció, tendenciájában csökkenő nitrozatív stressz és magasabb cGMP szintek társultak. A kombinációs kezelés után észlelt jelentős cGMP szint-emelkedés ennek a jelátviteli útnak a szerkezeti és funkcionális remodelling során betöltött szerepét erősíti. Eredményeink alapján a két szer együttes alkalmazása ígéretes lehetőség lehet a betegek iszkémia-reperfúziós károsodását csökkenteni kívánó alkalmazott kutatások számára.

5.2. A NOS3 Glu298Asp polimorfizmus összefügg a sportolók szív-adaptációjával

Vizsgálatunkban élsportolók kardiális funkcióját és szív-morfológiáját határoztuk meg, és egy eddig ismeretlen összefüggést igazoltunk a terheléstől függő jobb kamrai adaptáció (RVSVi and RVMi) és a NOS3 enzim Glu298Asp polimorfizmusa között. Megfigyelésünk valódi jelentőségét a sportolók teljesítményére kifejtett lehetséges hatásán kívül a terhelés indukálta aritmogén jobb kamrai kardiomiopátia kialakulásában játszott szerepe adhatja. Ezen folyamatok pontos feltérképezése hosszú távú után-követést és génkölcsonhatás vizsgálatokat tesz szükségessé.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEFYZÉKE

A disszertáció alapját képező közlemények

Lux A, Pokreisz P, Swinnen M, Caluwe E, Gillijns H, Szelid Z, Merkely B, Janssens SP. (2016) Concomitant Phosphodiesterase 5 Inhibition Enhances Myocardial Protection by Inhaled Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 356(2):284-92. **IF: 3.972**

Szelid Z, **Lux A**, Kolossváry M, Tóth A, Vágó H, Lendvai Z, Kiss L, Maurovich-Horvat P, Bagyura Z, Merkely B. (2015) Right Ventricular Adaptation Is Associated with the Glu298Asp Variant of the NOS3 Gene in Elite Athletes. *PLoS One.*10(10):e0141680. **IF: 3.234**

További közlemények

Oláh A, Németh BT, Mátyás Cs, Hidi L, **Lux A**, Ruppert M, Kellermayer D, Sayour AA, Szabo L, Torok M, Meltzer A, Gellér L, Merkely B, Radovits T (2014) Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of in vivo hemodynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310(5):H587-97. **IF: 3,838**

Szilveszter B., Elzomor H, Károlyi M, Kolossváry M, Raaijmakers R, Benke K, Celeng Cs, Bartykowszki A, Bagyura Zs, **Lux A**, Merkely B, Maurovich-Horvat P. (2016) The effect of iterative model reconstruction on coronary artery calcium quantification. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2016, 32(1):153-60. **IF: 1,810**

Kovacs A, Oláh A, **Lux A**, Mátyás M, Németh BT, Kellermayer D, Ruppert M, Torok M, Szabo L, Meltzer A, Assabiny A, Birtalan E, Merkely B, Radovits T (2014) Strain and strain rate by speckle tracking echocardiography correlate with pressure-volume loop derived contractility indices in a rat model of athlete's heart. *AJP Heart and Circulatory Physiology* 01/2015 IF: 3,838

Bagyura Zs, Kiss L, Edes E, **Lux A**, Polgár L, Soós P, Szenczi O, Szelid Zs, Vadas R, Józán P, Bagdy Gy, Merkely B (2014) Cardiovascular screening programme in the Central Hungarian region. The Budakalász Study. *Orv Hetil.* 24;155(34):1344-52.

Kellermayer D, Oláh A, **Lux A**, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Ruppert M, Mátyás Cs, Merkely B, Radovits T (2014) Detailed Hemodynamic Characterization of Athlete's Heart using Left Ventricular Pressure-Volume Analysis in a Rat Model. *Biophysical Journal* 106(2):344A. IF: 3.97

Radovits T, Oláh A, **Lux A**, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Mátyás Cs, Szabó G, Merkely B (2013) Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy - hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *AJP Heart and Circulatory Physiology*; IF: 4.012

Szelid Zs, Kerecsen G, Maurovich-Horvát P, **Lux A**, Marosi E, Kovács A, Kiss RG, Préda I, Merkely B (2010) Determination of coronary in-stent restenosis using dual source computed tomography angiography. *Interventional Medicine and Applied Science*; 2(1): 5-9.

Szelid ZsL, **Lux A** (2009) Génalapú lehetőségek a cardiovascularis prevencióban és kezelésben. Orvosképzés; S4: 201-366.

Bagyura Zs., Kiss L, Édes E.,**Lux Á.**, Polgár L., Soós P., Szenczi O., Szelid Zs., Vadas R., Józán P., Bagdy Gy., Merkely B. (2014) Cardiovascularis szűrőprogram a közép-magyarországi régióban. Orv. Hetil., 155(34), 1344–1352.