

# Szakmai Zárójelentés

Az OTKA PD 100245 azonosító számú, "A ciklikus guanozin-monofoszfát jelátvitel modulációjának kardiális hatásai diabetes mellitusban" című kutatás során elvégzett

kutatómunkáról

(2012.01.01.-2014.12.31.)

**Dr. Radovits Tamás**

Kutatásaink első részében a cukorbetegség 1-es (sztreptozotocinnal indukált) és 2-es (genetikailag determinált, Zucker Diabetic Fatty patkányok) típusának patkánymodelljeit állítottuk be a laboratóriumban. Elvégeztük a tervezett kardiális funkcionális vizsgálatokat a beszerzett speciális nyomás-konduktancia mikrokatéter segítségével, és részletes jellemzést adtunk a szisztolés és diasztolés működésről mindkét patkánymodellben. Az állatoktól nyert vér- és vizeletmintákból biokémiai és ELISA módszerekkel a cukorbetegsége, nitro-oxidatív stresszre ill. a cGMP-jelátvitel aktiváltságára jellemző paramétereket határoztunk meg. A miokardiális gén- ill. fehérjeexpressziót qRT-PCR ill. Western blot és immunhisztokémiai technikákkal követtük nyomon, különös tekintettel a miokardium-hipertrófia, a profibrotikus folyamatok, a nitro-oxidatív stressz és az apoptózis jellemző markereinek vizsgálatára. **Mind a kardiális diszfunkció, mind az annak háttérében álló szöveti, sejt- és molekuláris szintű kóros változások tekintetében részletes összehasonlító jellemzést adtunk a két cukorbetegség-típushoz társuló kardiomiopathia patkánymodelljeiről.**

A tervezett experimentális kezelések (foszfodiészteráz-5 gátlás, szolubilis guanilát-cikláz aktiváció) hatásáról, azok hatásos dózisáról in vitro körülmények közt végzett vaszkuláris funkcionális kísérletekben tájékozódunk.

Ezt követően az 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus beállított és részletesen jellemzett patkánymodelljeiben az in vivo gyógyszeres foszfodiészteráz-5 (PDE-5)-gátlás (vardenafil nevű gyógyszerrel), illetve szolubilis guanilát-cikláz (sGC) aktiválás (cinaciguat nevű gyógyszerrel) kardiális hatásait vizsgáltuk meg. A kezelési protokollokat követően a kontroll és kezelt

állatcsoportokban balkamrai nyomás-térfogat analízist végeztünk, melynek segítségével nagy érzékenységgel és részletességgel tudtuk felmérni a kezelések hatásait a hemodinamikai viszonyokra, a szív működés minden aspektusára (szisztolés funkció, kontraktilitás, kamrai fal merevség, aktív relaxáció, mechanoenergetika). Az állatoktól nyert vérmintákból ELISA módszerrel a cGMP-jelátvitel aktiváltságára jellemző paramétereket vizsgáltunk. A funkcionális változások háttérében meghúzódó szöveti, sejt- és molekuláris szintű változásokat immunhisztokémiai, Western blot ill. qRT-PCR technikákkal követtük nyomon.

**Eredményeink a cGMP-jelátvitel gyógyszeres fokozásának protektív hatását jelzik mind 1-es, mind 2-es típusú cukorbetegséghez társuló diabéteses kardiomyopathiában.**

Kutatásaink eredményeit **14 idézhető kongresszusi absztrakt és 7 eredeti közlemény** formájában publikáltuk (a nemzetközi publikációk összesített impakt faktora **15,850**). További **1 közlemény bírálat alatt** áll egy nemzetközi szakfolyóiratnál, **1 másik nemzetközi közlemény elkészítése pedig folyamatban** van.

### **Az eredmények részletes ismertetése:**

#### **1. Az 1-es és 2-es típusú cukorbetegséghez társuló kardiomyopathia patkánymodelljeinek beállítása és összehasonlító jellemzése**

Az 1-es típusú cukorbetegséget patkányainkban 60mg/ttkg sztreptozotocin egyszeri ip. injekciójával váltottuk ki, a kontrollcsoport placebo-t kapott. 72 óra múlva farokvénából vércukormérést végeztünk és a 15mM feletti vércukorértéket mutató állatokat soroltuk a cukorbeteg csoportokba. A modell beállítása sikeres volt, a sztreptozotocinnal oltott állatok >90%-ánál kialakult a cukorbetegség, melynek 8 heti fennállása után reprodukálható, szignifikáns kardiális diszfunkciót igazoltunk (vércukor: diab.  $26,1 \pm 0,9$  vs. ko.  $6,5 \pm 0,2$ mM). Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányainkban speciális diéta (Purina 5008) mellett elhízás és (genetikailag determinált 2-es típusú) cukorbetegség alakult ki. Állatainkban 30-35 hetes életkorban jellegzetes kardiális diszfunkciót észleltünk (vércukor: diab.  $26,0 \pm 2,1$  vs ko.  $6,3 \pm 0,3$ mM).

#### **Kardiális funkcionális vizsgálatok:**

A szív működés vizsgálatára a rendkívül érzékeny és részletes jellemzést adó balkamrai nyomás-térfogat (P-V) analízis módszerét alkalmaztuk a beszerzett nyomás-konduktancia mikrokatéterrel. Mind 1-es, mind 2-es típusú cukorbetegségben szignifikáns, jól reprodukálható kardiális diszfunkciót mutattunk ki, melynek karakterisztikája eltérő volt a két modellben. 1-es típusú cukorbetegségben a szisztolés funkció (ejekciós frakció: diab.  $58,1 \pm 2,5$  vs ko.  $70,4 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,05$ ), kardiális kontraktilitás (preload recruitable stroke work: diab.  $49,5 \pm 3,3$  vs ko.  $83,0 \pm 5,5$  Hgmm,  $p < 0,05$ ) és az aktív relaxáció (minimális dP/dt: diab.  $-3883 \pm 132$  vs ko.  $-6135 \pm 363$  Hgmm/ $\mu$ l,  $p < 0,05$ ) súlyos károsodása dominált, míg 2-es típusú cukorbetegségben ezek mérsékelt romlása mellett a kamrai falmerevség jelentős fokozódása volt kimutatható (végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége: diab.  $0,053 \pm 0,004$  vs ko.  $0,020 \pm 0,004$  Hgmm/ $\mu$ l,  $p < 0,05$ ).

#### Biokémiai, szövettani és molekuláris biológiai vizsgálatok:

Cukorbeteg állatokban emelkedett vér- és vizeletglükóz szintek, és tendenciálisan alacsonyabb plazma cGMP-tartalom volt kimutatható. A szövettani feldolgozás során mindkét típusú cukorbeteg szívizommintákban miokardium-hipertrófia, degeneráció és fibrotikus remodeláció igazolódott. A miozin nehéz láncok alfa-izozómájának expressziója szignifikánsan csökkent, a béta-izozómájáé pedig többszörösére emelkedett expressziót mutatott, mely az 1-es modellben volt markánsabb. A DNS-károsodás (TUNEL-pozitív kardiomiociták: diab.  $56 \pm 3$  vs ko.  $17 \pm 3\%$ ,  $p < 0,05$ ) és a nitro-oxidatív stressz mértéke (nitrotirozin immunhisztokémiai score: diab.  $9,5 \pm 0,5$  vs ko.  $3,9 \pm 0,6$ ,  $p < 0,05$ ), a c-fos és c-jun markerek és a proapoptotikus kaszpáz-12 fokozott expressziója valamint az eNOS csökkenése 1-es típusú cukorbetegségben volt kifejezettebb. A TGF- $\beta$ 1 és az ANF expressziójának növekedése (relatív expresszió: diab.  $2,0 \pm 0,3$  vs ko.  $0,6 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ) viszont jelentősebb volt 2-es típusú cukorbetegség esetén. A cukorbetegség két típusában igazolt eltérő karakterisztikájú strukturális és molekuláris változások jól magyarázhatják a leírt funkcionális különbségeket a két modell közt.

## **2. A cGMP-jelátvitelt fokozó experimentális kezelések (foszfodiészteráz-5 gátlás, szolubilis guanilát-cikláz aktiválás) vaszkuláris hatásainak vizsgálata oxidatív stresszben**

In vitro vaszkuláris funkcionális kísérletekben patkányaink mellkasi aortagyűrűit vizsgáltuk két in vivo relevanciával bíró reaktív oxidánsal, hipoklorittal ill. peroxinitrittel indukált nitro-oxidatív stressz jelenlétében. Acetilkininnel kiváltott, endothélfüggő, és nátrium-

nitroprussziddal kiváltott nem-endothélfüggő vazorelaxációs vazomotor válaszokat regisztráltunk. A cGMP-jelátvitel fokozása céljából alkalmazott foszfodiészteráz-5 (PDE-5) gátló kezelés (vardenafil) dóziszfüggő módon, eredményesen javította az endothélfunkciót (maximális relaxáció acetilkolinra: hipoklorit:  $67,4 \pm 3,0\%$  vs.  $30 \mu\text{g}/\text{ttkg}$  vardenafil + hipoklorit:  $82,1 \pm 2,7\%$ ,  $p < 0,05$ ; ill. vs.  $300 \mu\text{g}/\text{ttkg}$  vardenafil + hipoklorit:  $93,4 \pm 1,0\%$ ,  $p < 0,05$ ). A szolubilis guanilát-cikláz aktivátor kezelés (cinaciguat) hatékonyan előzte meg az endothélfunkció romlását (maximális relaxáció acetilkolinra: cinaciguat+peroxinitrit  $67,1 \pm 3,5$  vs peroxinitrit  $44,5 \pm 5,9\%$ ,  $p < 0,05$ ) és mérsékelte a nitro-oxidatív stresszt.

### **3. A cGMP-jelátvitelt fokozó experimentális kezelések (foszfodiészteráz-5 gátlás, szolubilis guanilát-cikláz aktiválás) hatásainak vizsgálata diabeteses mellitusban**

#### A foszfodiészteráz-5 gátló vardenafil akut hatásai a szív működésre 1-es típusú diabetes mellitusban

Sztreptozotocinnal indukált 1-es típusú cukorbeteg patkányok szív működését vizsgáltuk in vivo balkamrai nyomás-térfogat analízis segítségével alaphelyzetben, majd  $30 \mu\text{g}/\text{ttkg}$  vardenafil iv. beadása után. A kiindulási értékekhez képest az akut PDE-5-gátlás után alacsonyabb artériás középnyomást ( $124 \pm 4$  vs.  $111 \pm 4 \text{Hgmm}$ ), növekedett kontraktilitást ( $dP/dt_{\text{max}}$ :  $6657 \pm 348$  vs.  $8278 \pm 556 \text{Hgmm/s}$ ) és jobb relaxációt (relaxációs időkonstans, Tau:  $13,6 \pm 0,4$  vs.  $11,6 \pm 0,6 \text{ms}$ ) észleltünk cukorbeteg állatokban. Eredményeink a cGMP-jelátvitel fokozásának kedvező akut kardiális hatásaira utalnak.

#### A foszfodiészteráz-5 gátló vardenafil krónikus kardiovaszkuláris hatásai 2-es típusú diabetes mellitusban

*Kezelés:* ZDF lean kontroll és ZDF 2-es típusú cukorbeteg patkányokat 7 hetes életkortól kezdődően 25 héten át kezeltünk placebóval (Ko-Ko, Diab-Ko) ill. po.  $10 \text{mg}/\text{ttkg}/\text{nap}$  vardenafillal (Ko-Vard, Diab-Vard).

*Hemodinamika:* A kezelést követően a szív működés vizsgálatára a rendkívül érzékeny és részletes jellemzést adó balkamrai nyomás-térfogat analízis módszerét alkalmaztuk nyomáskonduktancia mikrokatéterrel. A kezeletlen cukorbeteg állatokban szignifikáns kardiális diszfunkciót igazoltunk. Várakozásainkkal összhangban elsősorban a diasztolés funkció romlása állt előtérben: a kamrai falmerevség nőtt (balkamrai végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége, EDPVR:  $0,077 \pm 0,002$  Diab-Ko vs.  $0,045 \pm 0,03 \text{Hgmm}/\mu\text{l}$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ), az aktív

relaxáció romlott (relaxációs időkonstans, Tau:  $9,1 \pm 0,3$  Diab-Ko vs.  $8,2 \pm 0,1$  ms Ko-Ko,  $p < 0,05$ ); a kamrai kontraktilitás csökkenő tendenciát mutatott (végszisztolés elasztancia,  $E_{es}$ :  $1,90 \pm 0,16$  Diab-Ko vs.  $2,49 \pm 0,18$  Hgmm/ $\mu$ l Ko-Ko, n.s.). A bal kamra mechanoenergetikai paramétereit szignifikánsan gyengébbek voltak cukorbeteg állatokban (kamraműködés hatásfoka, Eff:  $70,6 \pm 2,5$  Diab-Ko vs.  $79,8 \pm 0,8\%$  Ko-Ko). A 25 hetes PDE-5 gátló kezelés hatékonyan védte ki a szív működés romlását 2-es típusú DM-ban (EDPVR:  $0,062 \pm 0,006$  Hgmm/ $\mu$ l; Tau:  $8,6 \pm 0,3$  ms; Eff:  $74,5 \pm 2,8\%$  Diab-Vard, mindhárom paraméter esetén  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko), míg egészséges állatokban nem volt számottevő hatása.

*Biokémiai, molekuláris biológiai mérések:* A ZDF cukorbeteg patkányokban emelkedett vér- és vizeletglükóz szintek voltak kimutathatók, melyre a krónikus vardenafil-kezelés nem volt hatással. A szövettani feldolgozás során a diabeteses állatok szívizommintáiban markáns miokardium-hipertrófia (tibiahosszra normalizált átlagos kardiomiocita átmérő: CD/TL:  $3,53 \pm 0,02$  Diab-Ko vs.  $3,09 \pm 0,02$   $\mu$ m/cm Ko-Ko,  $p < 0,05$ ) és jelentős fibrotikus remodelláció (Masson's trichrome score:  $1,05 \pm 0,09$  Diab-Ko vs.  $0,57 \pm 0,13$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ) igazolódott. qRT-PCR technikával vizsgálva a diasztolés szívelégtelenséget jelző pitvari nátriuretikus faktor (ANF) miokardiális expressziója szignifikánsan magasabb volt kezeletlen ZDF cukorbeteg állatokban ( $3,04 \pm 0,26$  Diab-Ko) az egészséges kontrollhoz ( $0,92 \pm 0,17$  Ko-Ko) képest. A patológias miokardium-hipertrófiára jellemzően megváltozott a miozin nehéz-lánc (MHC) izoformák expressziója ( $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC:  $6,05 \pm 1,07$  Diab-Ko vs.  $0,93 \pm 0,13$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ) a szívizomban, mely a főtálcis génprogram reaktivációjára utal.

A vardenafil-kezelés hatására ZDF cukorbeteg állatokban jelentősen magasabb plazma cGMP-szinteket ( $52,0 \pm 5,5$  Diab-Vard vs.  $23,2 \pm 3,2$  pmol/ml Diab-Ko,  $p < 0,05$ ), kisebb mértékű miokardium-hipertrófiát (CD/TL:  $3,15 \pm 0,02$   $\mu$ m/cm,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) és fibrotikus átépülést (Masson's trichrome score:  $0,59 \pm 0,08$ ,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) észleltünk, valamint az ANF expresszió ( $1,39 \pm 0,21$ ,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) normalizálódását figyeltük meg. Egészséges állatokban a kezelésnek nem volt számottevő hatása a vizsgált biokémiai és molekuláris paraméterekre.

*In vitro vaszkuláris funkcionális mérések:* Patkányaink mellkasi aortagyűrűinek vazomotor működését vizsgáltuk in vitro miográfós módszerrel. Acetilkolinnal kiváltott, endothélfüggő, és nátrium-nitroprussziddal kiváltott nem-endothélfüggő vazorelaxációs válaszokat regisztráltunk. ZDF cukorbeteg patkányokban szignifikáns endotheliális diszfunkció volt megfigyelhető, melyet

az acetilkolin koncentráció-hatás görbéjének jobbra tolódása jelzett ( $pD_2$ :  $7,20 \pm 0,07$  Diab-Ko vs.  $7,63 \pm 0,08$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ). Az alkalmazott PDE-5 gátló kezelés (vardenafil) hatékonyan védte ki az endothélfunkció károsodását ( $pD_2$  acetilkolinra:  $7,45 \pm 0,03$  Diab-Vard,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko). A nátrium-nitroprussziddal kiváltott nem-endothélfüggő vazorelaxáció nem mutatott eltérést.

#### A foszfodiészteráz-5 gátló vardenafil hatásai 1-es típusú cukorbeteg patkányok veseműködésére

Egészséges kontroll és sztreptozotocinnal indukált 1-es típusú cukorbeteg patkányokat 8 héten át vardenafillal kezeltünk. A PDE-5 gátló kezelés kedvező kardiovaszkuláris hatásai mellett a diabeteses renális károsodások tekintetében is protektív hatásokat figyeltünk meg a vardenafillal kezelt cukorbeteg állatokban. A podocyták cGMP-tartalma növekedett, csökkent a renális oxidatív stressz és enyhült a proteinuria.

#### A szolubilis guanilat-cikláz aktivátor cinaciguat kardiovaszkuláris hatásai 1-es típusú DM-ban

*Kezelés:* Egészséges kontroll és sztreptozotocinnal indukált 1-es típusú cukorbeteg patkányokat 8 héten át kezeltünk placebóval (Ko-Ko, Diab-Ko) ill. po. 10mg/ttkg/nap cinaciguattal (Ko-Cin, Diab-Cin).

*Hemodinamika:* A kezelést követően a szív működés vizsgálatára a rendkívül érzékeny és részletes jellemzést adó balkamrai nyomás-térfogat analízis módszerét alkalmaztuk nyomáskonduktancia mikrokatéterrel. A kezeletlen cukorbeteg állatokban szignifikáns kardiális diszfunkciót igazoltunk: a kamrai kontraktilitás csökkent (végszisztolés elasztancia,  $E_{es}$ :  $0,72 \pm 0,10$  Diab-Ko vs.  $1,82 \pm 0,13$  Hgmm/ $\mu$ l Ko-Ko,  $p < 0,05$ ), az aktív relaxáció romlott (relaxációs időkonstans, Tau:  $17,3 \pm 0,8$  Diab-Ko vs.  $10,3 \pm 0,3$  ms Ko-Ko,  $p < 0,05$ ), a kamrai falmerevség nőtt (balkamrai végdiasztolés nyomás, LVEDP:  $9,4 \pm 0,7$  Diab-Ko vs.  $7,0 \pm 0,6$  Hgmm Ko-Ko,  $p < 0,05$ ). A 8 hetes sGC-aktiváló kezelés hatékonyan védte ki a szív működés romlását 1-es típusú DM-ban ( $E_{es}$ :  $1,20 \pm 0,15$  Hgmm/ $\mu$ l; Tau:  $14,9 \pm 0,6$  ms; LVEDP:  $7,3 \pm 0,6$  Hgmm Diab-Cin, mindhárom paraméter esetén  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko), míg egészséges állatokban nem volt számottevő hatása.

*Biokémiai, molekuláris biológiai mérések:* A cukorbeteg patkányokban emelkedett vér- és vizeletglükóz szintek voltak kimutathatók, melyre a cinaciguat-kezelés nem volt hatással. A szövettani feldolgozás során a diabeteses állatok szívizommintáiban miokardium-hipertrófia, degeneráció, jelentős DNS-fragmentáció/apoptózis (TUNEL-score:  $1,04 \pm 0,18$  Diab-Ko vs.  $0,24 \pm 0,02$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ) és jelentős fibrotikus remodelláció (Masson's trichrome score:  $1,79 \pm 0,12$  Diab-Ko vs.  $0,45 \pm 0,04$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ) igazolódott. Immunhisztokémiai és Western

blot módszerekkel a profibrotikus mediátor TGF $\beta$  szintjének jelentős emelkedését észleltük a Diab-Ko csoportban (relatív fehérjeexpresszió:  $3,05 \pm 0,75$  Diab-Ko vs.  $0,78 \pm 0,21$  Ko-Ko,  $p < 0,05$ ). qRT-PCR technikával vizsgálva a mátrix-metalloproteináz-9 (MMP-9), a pitvari nátriuretikus faktor (ANF) és a hősokk-protein 70 (HSP70) miokardiális expressziója szignifikánsan magasabb volt kezeletlen cukorbeteg állatokban az egészséges kontrollhoz képest. A cinaciguat-kezelés hatására jelentősen magasabb szöveti és vérplazma cGMP-szinteket, kisebb mértékű TUNEL-pozitivitást (TUNEL score:  $0,48 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) és fibrotikus átépülést (Masson's trichrome score:  $1,19 \pm 0,18$ ,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) észleltünk, valamint a profibrotikus TGF $\beta$ -fehérjeexpresszió ( $1,28 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$  vs. Diab-Ko) és a cukorbetegségre jellemző génexpressziós eltérések normalizálódását figyeltük meg cukorbeteg patkányaink szívizomszövetében. Egészséges állatokban a kezelésnek nem volt számottevő hatása a vizsgált biokémiai és molekuláris paraméterekre.