

Zárójelentés a 2007. 07. 01. – 2012. 06. 30-ig folyó K 67971-es OTKA kutatási pályázatról

A kutatás lényegében végig a tervek szerint folyt, kivéve a tervezett betegszámot, amely az eredetileg tervezettől lényegesen elmaradt a 2007-2008 évi kutatási időszakról készített részjelentésben részletesen ismertetett okok miatt. Röviden a betegszám az eredetileg tervezettől főként azért maradt el lényegesen, mert a tervezett 5 orvos helyett csak ketten végeztük a vizsgálatot, kisebb részben azért, mert a sokféle kizáró ok miatt az eredetileg gondoltnál a gyakorlatban nehezebb volt a vizsgálatban történő részvételre alkalmas betegeket találni. Az új betegek bevonását 2011.06.30-án befejeztük, összesen 112 beteget vontunk be a vizsgálatba (18-at a kontroll, 94-et a betegcsoportba). Eddig 4 beteg érte el a vizsgálati végpontot (2 betegnél pitvarfibrillatio, 2 betegnél szívelégtelenség alakult ki), és 13 beteg esett ki a vizsgálatból, 8 beteg azért, mert a továbbiakban nem kívánt részt venni benne, 5 beteg pedig azért, mert a vizsgálat közben kizáró okok alakultak ki. Minden betegnél (a legkésőbb bevontaknál is) legalább egy követéses vizsgálat volt, a betegek több mint felénél a teljes vizsgálatot (első vizsgálat és 3 követéses vizsgálat) elvégeztük.

Az alábbiakban az eddig feldolgozott tudományos eredményeinket ismertetem röviden. A vizsgálat egyik fő kérdésére, nevezetesen a pitvarfibrilláció (AF) és a szívelégtelenség (HF) bekövetkezésének előrejelzésére, rizikójának becslésére a vizsgált tudományos labor és echocardiographiás paraméterekkel nem fogunk tudni választ adni, tekintettel arra, hogy a tervezettnél lényegesen kisebb betegszám miatt a vizsgálat lezárásáig csak olyan kevés (összesen 4) beteg érte el a AF és HF vizsgálati végpontokat, amely statisztikai összehasonlítást nem tesz lehetővé a vizsgálati végpontot elérő és nem elérő betegek között. Ezért a vizsgálat másik fő kérdésére a megtartott ejectió frakciójú szívelégtelenség (HFPEF) illetve diastolés bal kamra (LV) dysfunctio pathogenesisére koncentráltunk, amelyre vonatkozóan már számos érdekes előzetes eredménnyel rendelkezünk. Az eredetileg tervezetthez képest újabb labor meghatározásokat (chromogranin A=cGA, B-típusú natriureticus peptid=BNP, tetrahydrobiopterin=BH₄) és genetikai polymorphismus vizsgálatokat is végeztünk. Eddigi eredményeinkből közleményt még nem publikáltunk, de eredményeinket poster prezentáció formájában már bemutattuk az Európai Kardiológus Társaság 2010 évi Stockholmban és 2011 évi Párizsban, valamint az Euroecho 2010 évi Koppenhágában tartott kongresszusain és a 2012 évi Európai Kardiológus Kongresszusra (München) is elfogadták egy posterünket. A fenti eredményekből tartott

előadásokkal Pepó Lilla IV. éves TDK hallgatóm a Semmelweis Egyetem 2010 évi TDK Konferencia Kardiológiai Szekciójában II. helyezést, a 2010 évi Korányi Frigyes Tudományos Fórumon III. helyezést, Jánosi Olivér V. éves TDK hallgatóm a Semmelweis Egyetem 2011 évi TDK Konferencia Kardiológiai Szekciójában III. helyezést, Gellért Bálint IV. éves TDK hallgatóm a Semmelweis Egyetem 2012 évi TDK Konferencia Kardiológia Szekciójában I. helyezést értek el. Eredményeinkből legalább 3 (esetleg 4) közleményt tudunk közölni rangos külföldi, impakt faktorral rendelkező folyóiratokban. A tervezett közlemények közül egyet, a MacIver hypothesis humán echocardiographiás vizsgálattal történt igazolásáról szólót, a zárójelentés beadásának határidejéig elkészítettük, a jelentéshez mellékeljük, rövidesen közlésre beküldjük. Az utolsó vérmintákat a biokémiai mérésekre, csak 2012 júliusban szállítottuk ki, ezért a biokémiai vizsgálatokból a közleményt csak 2012 év vége felé tudjuk elkészíteni. Az alábbiakban ismertetett genetikai vizsgálatok eredményeihez kiegészítésként még mRNS preparálás után mangán superoxid dismutase (MnSOD) és nitrogén oxid synthase (NOS) expresszió méréseket tervezünk, ezért a genetikai vizsgálatok végleges eredményei kb. 2012 végére, a közlemény megírása kb. 2013 első negyedére várható. **Tekintettel arra, hogy az eredményeinkből megírt közlemények megjelenése és/vagy elfogadása kb. a következő egy év folyamán várható, a tisztelt Értékelő Bizottsághoz azzal a kéréssel fordulunk, hogy a pályázat végleges értékelését egy év múlva, e közlemények ismeretében végezzék el.**

Előzetes eredmények

A most röviden ismertetésre kerülő előzetes eredményeinket ≥ 60 éves 112 egyén (18 kontroll, 94 normális ejectiós frakciójú hypertóniás beteg) vizsgálatából nyertük. Echocardiographiával LV diastolés dysfunctiót találtunk 56/94 (60%) betegben (HTDD+ csoport), nem volt LV diastolés dysfunctio 38/94 (40%) betegben (HTDD- csoport).

1. Az oxidatív stressz, gyulladás, hypercoagulabilitas szerepe a bal kamra diastolés dysfunctio pathogenesisében hypertóniás betegekben

Az oxidatív stressz mértékével fordítottan arányos plasma total scavenger kapacitás (TSC) csökkent, az oxidatív stressz mértékével egyenesen arányos plasma BH₄ szint nőtt

mindkét betegcsoportban (mindkét betegcsoportban $p < 0,001$ a TSC-re és $p < 0,01$ a BH₄-re vonatkozóan), az oxidatív stresszt jelző protein karboniláció (PK) nőtt ($p < 0,05$) a HTDD-csoportban, a CRP szint ($p < 0,05$), az interleukin-6 (IL-6) szint nőtt ($p < 0,001$) a HTDD+ csoportban, a tumor necrosis faktor- α (TNF- α), plasminogen-inhibitor-I (PAI-I), chromogranin-A (cGA), B-típusú natriureticus peptid (BNP) szintek mindkét betegcsoportban szignifikánsan nőttek (TNF- α : $p < 0,05$, PAI-I: $p < 0,001$ mindkét betegcsoportban; cGA: $p < 0,05$ a HTDD- és $p < 0,01$ a HTDD+; BNP: $p < 0,05$ a HTDD- és $p < 0,01$ a HTDD+ csoportokban) a kontroll csoporttal összehasonlítva. A többi alvadási paraméterben (fibrinogén, von Willebrand faktor) a vizsgált csoportok között nem volt szignifikáns különbség. A vizsgált LV myocardialis segmentumokban mért maximális longitudinális strain (S) átlagának abszolút értékei ($p < 0,05$ mindkét betegcsoportban) valamint a maximális longitudinális systolés LV ($p < 0,05$ mindkét betegcsoportban), maximális korai diastolés LV ($p < 0,05$ a HTDD-; $p < 0,001$ a HTDD+ csoportban), pitvari contractió periódus ($p < 0,05$ mindkét betegcsoportban) és pitvari reservoir periódus ($p < 0,001$ mindkét betegcsoportban) strain rate (SR) átlagainak abszolút értékei mindkét betegcsoportban kisebbek voltak a kontroll csoport megfelelő értékeinél. A fenti LV és pitvari myocardialis deformáció paraméterek longitudinalis LV systolés és diastolés, valamint pitvari dysfunctio jelenlétére utalnak a vizsgált betegcsoportokban.

A nagyon sok szignifikáns echo-labor paraméter korrelációt itt részletesen nem ismertetem, röviden úgy jellemezhetők, hogy az oxidatív stressz, gyulladás mértéke, a BNP és PAI-I szintek fordítottan korreláltak a LV systolés és diastolés valamint a pitvari funkcióval.

Előzetes eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a HFPEF leggyakoribb prekursorának tekinthető normális EF-jú hypertóniás betegekben az oxidatív stressznek [főként myocardialis NOS szétkapcsolódás révén jöhet létre, amelyre az irodalom szerint valószínűleg alacsony szöveti BH₄ (NOS cofactor) szinttel társuló emelkedett plasma BH₄ szint utal] és gyulladásnak esetleg primer pathogenetikai szerepe lehet a LV systolés és diastolés valamint a pitvari dysfunctio előidőzésében. Az emelkedett plasma BNP, cGA szintek fokozott neuroendokrin aktiváció jelenlétére utalnak mindkét hypertóniás betegcsoportban.

2. A megtartott ejectió frakciójú szívelégtelenség (HFPEF) MacIver-Townsend által feltételezett pathogenetikai hypothesisének vizsgálata betegeinkben

MacIver és Townsend (Heart 2008; 94: 446-449) a LV contractio matematikai modellje alapján feltételezte, hogy HFPEF-ben a normális EF-ért nem a csökkent longitudinális systolés LV funkciót kompenzáló fokozott radialis systolés funkció a felelős, ahogy ezt eddig gondoltuk, hanem a kompenzáló mechanizmusként létrejövő LV hypertrophia következtében létrejövő megtartott abszolút radialis falvastagodás (RWT). Bár a szerző közleményében hivatkozik egyes humán vizsgálatok hypothesisét részlegesen támogató eredményeire, a fenti hypothesisit humán vizsgálatban eddig még nem ellenőrizték. A longitudinális LV és pitvari S és SR eredményeket ld. az előző alcímben. . A bal kamrai izomtömeg (LVM) ($p < 0,01$, $p < 0,05$) és LVM/testfelszín (tfsz) ($p < 0,05$, $p < 0,01$) a HTDD+ csoportban nőtt a kontrollhoz és a HTDD- csoporthoz képest, az LVM/tfsz a HTDD- csoportban is nőtt ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest.. A bal pitvari térfogat (LAV) és a LAV/tfsz értékek csak a LV diastolés dysfunctio mértékével arányos, nem szignifikáns, enyhe növekedési trendet mutattak a betegcsoportokban a kontrollal összehasonlítva. A radialis LV maximális S, systoles SR, abszolút radialis falvastagodás (RWT) és a hagyományos LV systoles funkció paraméter (LV verőtér fogat, EF, mitralis annulus M-mód kitérés, mitralis annulus systolés csúcssebesség) értékekben nem volt különbség. Az EF/LVM ($p < 0,001$) és a EF/LVM/tfsz ($p < 0,001$) a HTDD+ csoportban csökkent a kontrollhoz és a HTDD- csoporthoz ($p < 0,01$ mindkét paraméter esetében) képest. Kezdeti eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a HFPEF potenciális előfutárának tekinthető HT-ás normális EF-jú betegekben csökkent longitudinális LV systolés és pitvari funkciót találtunk, és igazoltuk, hogy a normális EF nem a radialis systolés funkció növekedésének, hanem a LVM kompenzatorikus növekedése következtében megtartott abszolút RWT-nak a következménye. Tehát eredményeink humán vizsgálatban igazolni látszanak a MacIver-Townsend hypothesisit. A normális EF mechanizmusa eredményeink és a MacIver-Townsend hypothesis alapján HFPEF-ben a következő lehet: $EF = \text{verőtér fogat (SV)} / \text{végdiastolés térfogat (EDV)}$, a HFPEF-et előidéző betegség, állapot a longitudinális LV systolés funkció csökkenéséhez, ezáltal következményes SV csökkenéshez vezet egyfelől, másfelől az afterload növelésével kompenzatorikus LV hypertrophiát idéz elő, ami az EDV csökkenéséhez is vezet egyúttal. Ha az SV és EDV csökkenése közel azonos mértékű, akkor az EF (amely $= SV/EDV$) nem változik, normális marad. Az EF helyett az EF/LVM vagy EF/LVM/tfsz ajánlott a LV systolés dysfunctio jellemzésére HFPEF-ben.

3. A ventricularis-vascularis interakció vizsgálata

A pulzushullám a magas ellenállású muscularis arteriolákból és a nagyerek elágazási pontjairól visszaverődik, és ennek a visszavert hullámnak a nagysága, és visszaérkezésének ideje nagymértékben befolyásolja a LV myocardialis relaxációt (ventricularis-vascularis interakció). A kor előrehaladtával vagy a nagy artériák falának rugalmatlanságához vezető betegségekben a visszavert hullám terjedési sebessége (PWV) nő, és a visszavert hullám az aorta billentyű záródása előtt érkezik vissza az aorta gyökbe (normálisan az aorta billentyű záródása után érkezik), a centrális késő systolés nyomást jelentősen növelve, így a LV-nak nagyobb nyomással szemben kell a vért kipumpálnia (afterload nő), a myocardium relaxációs ideje megnyúlik, az LAV, LVM is nő. A centrális systolés vérnyomásnak (ventricularis-vascularis interakciónak) fontos, - bár talán inkább súlyosbító, mint domináns, elsődleges-, szerepe van a LV diastolés dysfunctio, HF kialakulásában, a cardiovascularis események létrejöttében, és a cardiovascularis mortalitásban. A carotis ultrahanggal talált arteria carotis elváltozások súlyosságát egy carotis score értékkel jellemeztük, és EKG-val kapuzott applanatis tonometriával mértük a PWV-t az art. carotis comm. és az art. femoralis között, ezzel megbecsülve az érfalmerevséget.

A carotis score érték és a PWV a HTDD+ csoportban szignifikánsan ($p=0,004$ a carotis score-ra, $p<0,05$ a PWV-re vonatkozóan) magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, ami fokozott atherosclerosisra, megnövekedett érfalmerevségre utal a HTDD+ csoportban. A vizsgált csoportok vérnyomásértékei között nem volt szignifikáns különbség.

4. Oxidatív stresszel, BH₄ metabolismussal, nitrogén oxid synthase funkcióval összefüggésben álló enzimek single nucleotid polymorphismusainak vizsgálata

A HFPEF pathogenesisében számos állatkísérletes bizonyíték alapján felmerült a szívizom nitrogén oxid synthase (NOS) szétkapcsolódás következtében létrejövő oxidatív stressz szerepe, amelyben a NOS cofactor BH₄ oxidatív depletiojának döntő jelentősége van. Állatkísérletes HFPEF modelleken a BH₄ adás visszafordította a bal kamra hypertrophiát, fibrosist, diastolés dysfunctiót és a NOS szétkapcsolódást. Az antihypertensív kezelés (hydralazin) és a NOS szétkapcsolódásra közvetlenül nem ható antioxidáns (Tempol, tetrahydroneopterin) kezelés nem akadályozta meg a bal kamra hypertrophiát, fibrosist és diastolés dysfunctiót, ami arra utal, hogy ezek létrejötte nem általában az oxidatív stressz vagy tensió emelkedés, hanem a NOS szétkapcsolódás következménye.

Ezért több oxidatív stresszel, BH₄ metabolismussal és NOS funkcióval összefüggő enzimet kódoló gén összesen 9 single nucleotid polymorphismusának (SNP) prevalenciáját vizsgáltuk. Négy (rs841, rs3783641, rs10483639 és rs807267) guanosine triphosphate

cyclohydrolase-1 (GTPCH), - a BH₄ szintézis rate limiting enzyme -, 1 (rs4673) NADPH oxidase (NADPHox), 1 (rs4880) mangán superoxide dismutase (MnSOD), 2 (rs1799983, rs2070744) NOS3 és 1 (rs10493389) phosphodiesterase4B (PDE4B) gént genotipizáltunk Taqman assay segítségével valós idejű PCR technikával. A kontroll csoporthoz képest az rs4880 (MnSOD) minor allél frekvenciája (MAF) csökkent a HTDD+ csoportban ($p=0,041$), az rs2070744 (NOS3) MAF-ja szignifikánsan ($p=0,046$) nőtt a HTDD-, és a szignifikancia határán ($p=0,058$) nőtt a HTDD+ csoportban, míg az rs10493389 (PDE4B) MAF-ja csökkent ($p=0,024$) a HTDD- csoportban és csökkenési trendet ($p=0.086$) mutatott a HTDD+ csoportban. Az rs1799983 (NOS3) mindkét betegcsoportban, és három GTPCH SNP, MAF-ái a HTDD+ csoportban növekedési trendet mutattak a kontrollhoz képest, az rs3783641 GTPCH SNP és az (rs4673) NADPH oxidase MAF-i a vizsgált csoportokban egyáltalán nem különböztek. Mivel a fenti enzimek minor alléljai a PDE4B kivételével fokozott oxidatív stresszt okozhatnak, a PDE4B kivételével azon enzimek MAF-i alapján, amelyek MAF-ja a kontroll csoporttól szignifikánsan vagy csak trendet mutatva különbözött (MnSOD, két NOS3, 3 GTPCH SNP) egy genetikai score-t alkottunk az oxidatív stresszre történő predispositio jellemzése céljából. Az előbbi 6 enzim MAF-i alapján a genetikai score-t úgy számoltuk ki, hogy az adott minor allélt hordozók annyi pontszámot kaptak, amennyit az adott minor allélból hordoztak (major allél homozygota: 0 pont, minor allél heterozygota: 1 pont, minor allél homozygota: 2 pont, így a score értéke 0-12 pont között lehetett).

A genetikai score a a HTDD+ csoportban szignifikánsan ($p=0,01$) magasabb volt, HTDD- csoportban növekedési trendet ($p=0,07$) mutatott párhuzamosan a korábban a biokémiai eredményeknél bemutatott fokozott oxidatív stresszre utaló TSC csökkenéssel, plasma BH₄, PK szint növekedéssel a kontrollhoz képest. Kezdeti eredményeink azt igazolják, hogy a HFPEF prekursor állapotának tekinthető normális EF-jú HT-ás betegekben kimutatható fokozott oxidatív stressz legalább részben genetikai faktorok által meghatározott. Az oxidatív stresszre való genetikai hajlam a LV diastoles dysfunctio mértékével párhuzamosan nő. A plasma BH₄ szint irodalmi adatok szerint fordítottan arányos a szöveti BH₄ szinttel, ezért a mindkét betegcsoportban a kontrollhoz képest emelkedett plasma BH₄ szint csökkent myocardialis BH₄ szintre, következményes myocardialis NOS szétkapcsolódásra utal a vizsgált hypertoniás betegekben.

Eredményeink lehetséges klinikai hasznosítása

Eredményeink talán a közeljövőben klinikailag is közvetlenül hasznosíthatók lehetnek. Szemben a csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenséggel (HFREF), amelynek hatékony

kezelésére számos, bizonyítottan mortalitást csökkentő gyógyszerrel rendelkezünk, a HFPEF-nek a tüneti kezelésen kívül jelenleg egyáltalán nincs kemény végpontokra ható, igazoltan hatékony terápiája. Nemrégóta rendelkezésünkre áll a sapropterin hydrochlorid, amely a szobahőn instabil BH₄ helyett, orális BH₄ terápiára alkalmas vegyület. Ezt a vegyületet az FDA már engedélyezte a phenylketonuria kezelésére. Egy nem randomizált, nem placebo kontrollos humán vizsgálatban a sapropterin hydrochlorid vérnyomáscsökkentő hatását is igazolták. A BH₄ terápia a HFPEF első igazoltan hatékony kezelése lehet a közeljövőben.

HFPEF-es beteg rutin echocardiographiás vizsgálata során az EF illetve egyéb hagyományos bal kamra funkciós paraméterek helyett, amelyek nem jelzik a HFPEF-ben csak érzékenyebb, de speciális vizsgálatokkal (például myocardialis deformáció paraméterek mérésével) általában kimutatható enyhe-mérsékelt fokú longitudinális LV systolés dysfunctiót, az EF/LVM vagy EF/LVM/tfsz paraméterek meghatározásával az enyhe-mérsékelt fokú LV systolés dysfunctio is valószínűleg kimutathatóvá válik.