

# A cinaciguat megelőzi a patológiás szívizom-hipertrófia kialakulását bal kamrai nyomás-túlterhelés patkánymodelljén

Németh Balázs Tamás<sup>1</sup>, Mátyás Csaba<sup>1</sup>, Oláh Attila<sup>1</sup>, Lux Árpád<sup>1</sup>, Hidi László<sup>1</sup>, Ruppert Mihály<sup>1</sup>, Kellermayer Dalma<sup>1</sup>, Kökény Gábor<sup>2</sup>, Szabó Gábor<sup>3</sup>, Merkely Béla<sup>1</sup>, Radovits Tamás<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézet, Budapest

<sup>3</sup>Heidelbergi Egyetem, Szívsebészeti Klinika, Im Neuenheimer Feld, Heidelberg, Németország

Levelezési cím: Dr. Radovits Tamás, PhD, Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika Kísérleti Kutató Laboratóriumok, 1122 Budapest, Városmajor u. 68., E-mail: radovitstamas@yahoo.com

A szív krónikus nyomásterhelése patológiás miokardiális hipertrófia kifejlődéséhez vezet, amelynek kialakulását szakirodalmi adatok alapján a cGMP intracelluláris szintjének emelkedése sikeresen képes megakadályozni. Jelen kísérleteink során ezért a cGMP termeléséért felelős enzimet, a szolubilis guanilát-ciklázst aktiváló cinaciguat krónikus adagolásának hatásait vizsgáltuk nyomásindukált patológiás szívizom-hipertrófia patkánymodelljén. A hasi aorta műtéti beszűkítésének (abdominális aortic banding, AAB) alkalmazásával hoztuk létre a bal kamra nyomásterhelését fiatal, hím Wistar-patkányokban; kontrollként sham operált állatokat használtunk. A kísérleti és kontrollcsoportok p.o. 10 mg/kg/nap cinaciguat (Cin) vagy placebo (Co) kezelést kaptak hat héten keresztül.

Nyomásterhelés hatására az AABCo-csoport állataiban a 6. hét végére szignifikáns mértékű patológiás miokardiális hipertrófia fejlődött ki, amelyet emelkedett relatív szívtömeg, átlagos szívizomsejt-átmérő, kollagéntartalom és apoptózis jelenléte jellemezett. Cinaciguat alkalmazásával a vérnyomás szignifikáns változtatása nélkül csökkenthető volt a hipertrófiára jellemző valamennyi morfológiai elváltozás, továbbá az AAB hatására a kardiális funkcióban, így a kontraktilitásban megfigyelhető eltérések kialakulása is elmaradt a kezelt csoportban.

Eredményeink alapján az sGC krónikus aktiválásával felerősített cGMP-jelátvitel hatékony, új stratégia lehet a patológiás miokardiális hipertrófia kifejlődésének prevenciójában.

**Kulcsszavak:** cGMP, patológiás miokardiális hipertrófia, cinaciguat, sGC-aktiváció

## Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload

Pathologic myocardial hypertrophy develops when the heart is chronically pressure-overloaded. Elevated intracellular cGMP-levels have been reported to prevent the development of pathologic myocardial hypertrophy, therefore we investigated the effects of chronic activation of the cGMP producing enzyme, soluble guanylate cyclase by Cinaciguat in a rat model of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. Abdominal aortic banding (AAB) was used to evoke pressure overload-induced cardiac hypertrophy in male Wistar rats. Sham operated animals served as controls. Experimental and control groups were treated with 10 mg/kg/day Cinaciguat (Cin) or placebo (Co) p.o. for six weeks, respectively. Pathologic myocardial hypertrophy was present in the AABCo group following 6 weeks of pressure overload of the heart, evidenced by increased relative heart weight, average cardiomyocyte diameter, collagen content and apoptosis. Cinaciguat did not significantly alter blood pressure, but effectively attenuated all features of pathologic myocardial hypertrophy, and normalized functional changes, such as the increase in contractility following AAB. Our results demonstrate that chronic enhancement of cGMP signaling by pharmacological activation of sGC might be a novel therapeutic approach in the prevention of pathologic myocardial hypertrophy.

**Keywords:** cGMP, pathologic myocardial hypertrophy, cinaciguat, sGC-activation

## Bevezetés

A patológiás szívizom-hipertrófia hosszan tartó fennállása a szívelégtelenség kialakulásának egyik legfontosabb oka, amelynek hátterében igen gyakran a bal kamra nyomástúlterhelése áll. Az ennek következtében kialakuló koncentrikus hipertrófia a szívizom kötőszövetes elemeinek felszaporodását is előidézi a diasztolés funkció károsodásának fokozatos kifejlődésével. A bal kamra e káros remodellációja megtartott ejekciós frakciójú szívelégtelenséghez (HFpEF) vezethet, amelyre – tekintettel arra, hogy a csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenséghez (HFrEF) hasonló kimenetelű és prevalenciájú, ám klinikai vizsgálatokkal kevésbé jól jellemzett (1) – az utóbbi időben egyre nagyobb figyelem irányul. A HFpEF-fel diagnosztizált betegek jelentős többsége magasvérnyomás-betegségben szenved (2). Jól ismert, hogy a hipertenzív szívbetegségben a kezdeti kompenzált, koncentrikus balkamra-hipertrófia az idő előrehaladtával manifeszt szívelégtelenség kialakulásához vezethet. Bár a HFrEF-ben szenvedő betegek számára hatékony, az elmúlt néhány évtizedben kifejlesztett gyógyszeres és eszközös terápiás lehetőségek állnak rendelkezésre (3), a HFpEF betegeket célzó klinikai vizsgálatok ez idáig neutrális eredménnyel zárultak (1, 3). A HFpEF növekvő közegészségügyi terhet jelent, hatékony kezelési mód hiányában ezért új terápiás megközelítések fejlesztése indokolt.

A cGMP a kardiovaszkuláris rendszer számos fiziológiai és patológiás folyamatának, így a szívizom remodellációjának is fontos intracelluláris szabályozója (4). Élettani körülmények között a szívizomsejtek elsődleges cGMP forrása a szolubilis guanilat-cikláz (sGC), amelyet a nitrogén-monoxid (NO) aktivál (5). A cGMP által közvetített jelet a szívizomsejten belül a cGMP-függő protein-kináz (PKG) fejt ki, amely a balkamra-hipertrófia és káros remodelláció egyik központi jelentőségű gátlójaként funkcionál (6, 7). Számos szív- és érrendszeri betegség vezethet az NO-cGMP-PKG-tengely patológiás működéséhez (8). Korábbi publikációkban kimutatták, hogy a cGMP intracelluláris szintjének emelkedése hatékonyan előzte meg a myocardium strukturális és funkcionális károsodását kísérletes iszkémia-reperfúziós modellekben. E hatás mind a cGMP-t bontó enzim, a foszfodiészteráz-5 (PDE-5) gátlásával (9), mind az azt termelő sGC-enzim stimulátorral vagy aktivátorral történő növelésével (10, 11) elérhető volt. A fentiek alapján a myocardium cGMP-szintjének emelése hatékony új terápiás lehetőségnek bizonyulhat a patológiás balkamra-hipertrófia kialakulásának megakadályozására.

Az NO-cGMP-PKG-jelátvitel károsodásának leküzdésére egy új gyógyszer csoportot, az sGC aktivátorait fejlesztették ki (12). Az elsőként jellemzett és egyben a legpotensebb szer ebben a csoportban a cinaciguat (BAY 58-2667) (13). Ez a hatóanyag abban az esetben is képes az sGC működését fokozni, amikor annak fi-

ziológiai NO-szenzora, egy hem prosztetikus csoport, nincs jelen az enzimen (13). Ennek jelentősége, hogy nitro-oxidatív stresszel járó patológiás állapotokban – többek között ilyen a cukorbetegség, az iszkémia-reperfúzió és a balkamra-hipertrófia is (8) – a hem-csoport oxidálódik, amely így alkalmatlanná válik az NO kötésére, illetve az enzimmről történő disszociációja is felgyorsul (14), ezáltal az sGC cGMP termelése megszűnik. A hem-csoport leválása a cinaciguat kötőhelyének felszabadulásával jár, amely így az enzimhez kötődve kifejtheti hatását (14). Ez, a potenciálisan betegségre szelektív hatásmód gyógyszeres terápiás eszköztárunk különösen ígéretes, új tagjaivá teheti az sGC aktivátorait.

A fentebb felsorolt ismeretanyagra alapozva jelen vizsgálatunkban a cinaciguat kardiovaszkuláris hatásainak karakterizálását tűztük ki célul nyomásindukált balkamra-hipertrófia patkánymodelljén. A nyomástúlterhelés előidézésére modellünkben a hasi aorta műtéti beszükitését (abdominális aortic banding-et, AAB) alkalmaztunk, amely egy jól jellemzett és széles körben használt eljárás rágcsálókban hipertónia és patológiás miokardiális hipertrófia indukálására (15–17).

## Anyagok és módszerek

A módszerek teljes leírása eredeti közleményünkben található (18).

Valamennyi kísérleti állat humánus gondozásban részesült a „Principles of Laboratory Animal Care” útmutatásainak megfelelően, amely a National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996) irányelveit tartalmazza. Valamennyi kísérleti procedúrát és az állatok kezelését az illetékes etikai bizottság előzetesen elbírálta és jóváhagyta. Fiatal felnőtt (10 hetes, 220–240 g testtömegű), hím Wistar-patkányokat (n=35) („Toxi-Coop” Zrt., Dunakeszi) állandó hőmérsékletű (22±2 °C), 12 h fény-sötét periódusú állatházban, ad libitum standard táp- és vízellátással tartottunk.

### Az aorta abdominalis műtéti beszükitése

Akklimatizációt követően patkányainkban a hasi aorta veseartériák és a mesenterica superior közötti műtéti szűkítését (AAB, n=19), vagy Sham operációt (Sham, n=16) végeztünk pentobarbitál (60 mg/kg i.p.) anesztéziában, a korábban leírtaknak megfelelően (16, 19). Az állatok posztoperatív fájdalomcsillapítás céljából ébredés után, valamint az első, illetve második posztoperatív napon p.o. meloxicamot (1,5 mg/kg) kaptak.

### Kísérleti csoportok

Öt nappal az operációt követően mind a Sham, mind az AAB-állatokat kontroll (Co) vagy kezelt (Cin) csoportba osztottuk (ShamCo, n=8; ShamCin, n=8; AABCo, n=10; AABCin, n=9). A kezelt állatok 0,5%-os metilcellulóz oldatban szuszpendált cinaciguatot (10 mg/kg p.o.)

kaptak gyomorszondán át, míg a kontroll állatok csak a vivőanyagot kapták 6 héten át naponta. A beadott mennyiséget a hetente háromszor mért testtömegnek megfelelően változtattuk.

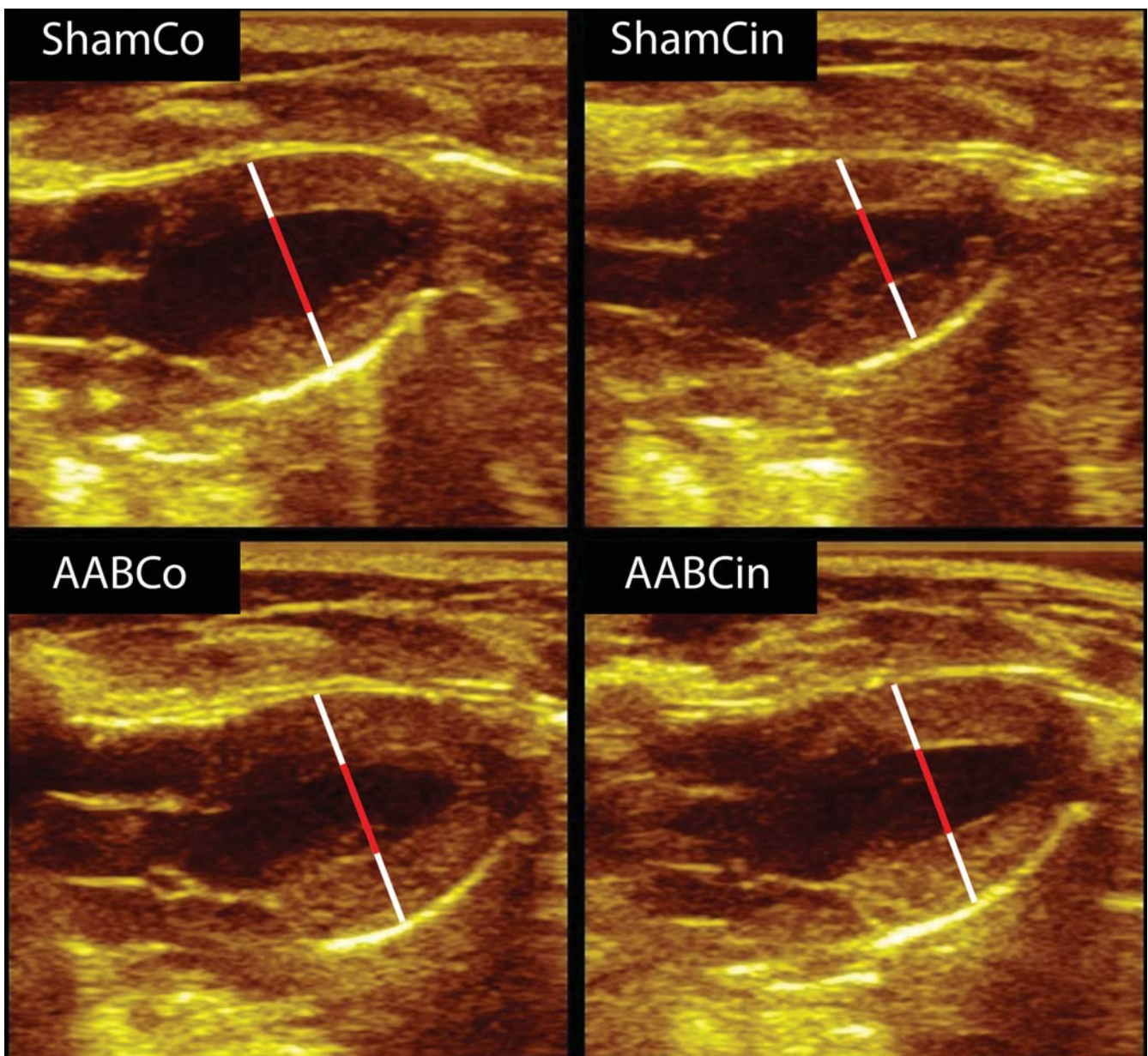
### Echokardiográfia

A műtét utáni 3. és 6. héten szívultrahang-vizsgálatot végeztünk a miokardiális hipertrofia mértékének megállapítására (20). Kétdimenziós B-módú, rövid-, illetve hossztenyelyi felvételeket készítettünk pentobarbitál (60 mg/kg ip.) anesztéziában egy 13-MHz frekvenciájú lineáris transzducerrel (GE 12L-RS, GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) felszerelt ultrahangkészülék (Vivid i, GE Healthcare) segítségével. A felvételeket (1. ábra) a csoportbeosztást nem ismerő vizsgáló ele-

mezte képanalizáló szoftver (EchoPac, GE Healthcare) alkalmazásával. Valamennyi mérési eredményünket 3 egymást követő szív ciklus átlagából számoltuk. E paramétereiből az alábbi mutatókat számítottuk: frakcionális rövidülés (FS), ejekciós frakció (EF), végdiasztolés (LVEDV), illetve végszisztolés (LVESV) bal kamrai térfogatok, verővolumen (SV) és bal kamrai izomtömeg (LVM). Az LVM értékét a testtömegre normalizálva kaptuk az LVM-indexet (LVMi).

### Hemodinamikai mérések: bal kamrai nyomás-térfogat (PV) analízis

Valamennyi állatban PV-analízist végeztünk a korábban leírtaknak megfelelően (20). Összefoglalva, pentobarbitál anesztéziát (60 mg/kg ip.) követően patká-



**1. ÁBRA.** Reprezentatív diasztolés képek a 6. héten készült ultrahangvizsgálatról. A fehér jelek a falakat, a vörösek az üreget jelzik. Jól látható a falvastagság változása AABCo-állatainkban a ShamCo- és AABCin-csoportokhoz képest



nyainkon tracheotomiát végeztünk, majd intubáltuk és lélegeztettük őket. 2-Fr átmérőjű nyomás-konduktancia mikrokatétert (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, USA) vezetünk a bal kamrába, majd a bal kamrai nyomás- és térfogatviszonyokat folyamatosan regisztráltuk. Adatainkból speciális analizáló program (PVAN, Millar Instruments) segítségével a későbbiekben részletezett paramétereket számítottuk. A kísérletek végzetével állatainkat kivérettetéssel eutanizáltuk.

### Szervtömegmérések

Eutanáziát követően az állatok szívét, máját és tüdejét azonnal hideg fiziológiás sóoldatba helyeztük, majd tömegüket megmértük. Az állatok testméretében adódó természetes variabilitás kiküszöbölésére a szervek tömegét a jobb tibia hosszára normalizáltuk (21).

### Szövettan és immunhisztokémia

4%-os pufferolt formalinnal fixált, 5 µm vastag szív metszeteinket hematoxillin-eozin, Picrosirius vörös, cGMP immunhisztokémia, illetve terminális dezoxinukleotid-transzferáz dUTP nick-end labelling (TUNEL) módszerrel festettük. A fénymikroszkópos elemzést Zeiss mikroszkóp (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Jena, Németország) segítségével végeztük, a digitális képeket képkalkoló szoftverrel rögzítettük (QCapture Pro 6.0, QImaging, Surrey, BC, Kanada).

### Biokémiai mérések

A cGMP plazmaszintjének meghatározásához EIA kitet használtunk a gyártó utasításai szerint (Amersham cGMP EIA Biotrak System, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

### Kardiális mRNS és immunblot analízis

Sokkfagyasztott bal kamra mintáinkból RNS-t, illetve fehérjét izoláltunk. Kvantitatív valósidejű PCR-vizsgálatunk során (StepOne-Plus Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) az alábbi targetek kifejeződését mértük: miozin nehézlánc alfa- és béta-izoforma (MHC $\alpha$ , MHC $\beta$ ), endoteliális NO-szintáz (NOS3), pitvari nátriuretikus faktor (ANP), B-sejtes limfóma 2 (Bcl-2), 70 kDa hősokk-fehérje (HSP70), szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPáz izoforma 2a (SERCA2a) és foszfolambán (Pln). Western blot eljárással a következő markerek fehérje-expresszióját vizsgáltuk: PKG, vazodilatátor-stimulált foszfoprotein (VASP) és foszfo (p)-VASP, Pln és foszfo (p)-Pln, amelyek a PKG aktivitásának jelzői. Kapott értékeinket a glicerinaldehid-3-foszfat-dehidrogenáz (GAPDH) szintjére normalizáltuk.

### Gyógyszerek

Valamennyi felsorolt gyógyszert a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be a cinaciguat kivételével, mely a Bayer AG (Wuppertal, Németország) ajánlása.

### Statisztikai analízis

Adataink statisztikai analíziséhez kétutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk („aortic banding” és „cinaciguat kezelés” faktorokat használva), amellyel a faktorok ( $p_{\text{band}}$ ,  $p_{\text{treat}}$ ) egyéni hatása és azok „banding $\times$ kezelés” interakciója ( $p_{\text{int}}$ ) is meghatározható. Tukey-féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk a csoportok közötti különbségek kimutatására. Párosított *t*-tesztet végeztünk az azonos csoporton belüli időbeli különbségek összehasonlítására ultrahangvizsgálataink során. Valamennyi adatunkat átlag $\pm$ standard hibaként tüntettük fel. A különbségeket statisztikailag akkor vettük szignifikánsnak, amennyiben teljesült, hogy  $p < 0,05$ .

### Eredmények

#### Echokardiográfia

A 3. posztoperatív héten végzett szívultrahang-vizsgálat során AABCo állatainkban a ShamCo-csoporthoz képest szignifikánsan megnövekedett bal kamrai falvastagságokat, relatív falvastagságot (RWT) és LVM-értéket igazoltunk a kamrai üregátmérők szignifikáns eltérése nélkül (1. táblázat). A hipertrófia mértéke a vizsgálat második felében tovább növekedett az AABCo-csoportban (1. táblázat, 1. ábra), amelyhez a ShamCo-csoportban mértnél szignifikánsan nagyobb végszisztolés kamrai átmérő (LVESD) is kapcsolódott. A cinaciguattal kezelt aortaszűkített állatokban az AABCo-csoporthoz képest szignifikánsan kisebb bal kamrai diasztolés falvastagság, LVM és LVMi igazolódott mindkét mérési időpontban (1. táblázat). Szignifikánsan csökkent az AABCin-állatokban a bal kamra hátsó falának szisztolés vastagsága az AABCo-csoporthoz képest a 6. hétre, míg az EF, illetve az FS egyik csoportban sem változott szignifikánsan a vizsgálat időtartama alatt (1. táblázat).

#### Test- és szervtömeg

Az állatok testtömegében nem volt különbség a csoportok között. A tibiahosszra normalizált szív-tömeg (HW/TL) szignifikánsan magasabbnak adódott az AABCo-állatokban, mint akár a ShamCo-, akár az AABCin-csoportokban (2. táblázat). A tüdő relatív nedves tömege (LuW/TL) szignifikánsan nagyobb volt az AABCo-patkányokban, mint a ShamCo-csoportban, míg az AABCin-állatokban ez a paraméter nem tért el az utóbbtól (2. táblázat).

#### Hemodinamikai mérések

Az alapvető hemodinamikai paraméterek, mint a szívfrekvencia (HR), EF, SV, CO, vagy LVESV, továbbá az előterhelés paraméterei, úgymint bal kamrai végdiasztolés volumen (LVEDV) és -nyomás (LVEDP) nem különböztek szignifikánsan a csoportok között (2. táblázat).

A bal kamrai szisztolés nyomás (LVESP) és az artériás középnyomás (MAP) mindkét AAB-csoportban szig-

1. TÁBLÁZAT. Echokardiográfiás mérések

	3. hét						6. hét						
	ShamCo	ShamCin	AABCo	AABCin	P <sub>band</sub>	P <sub>treat</sub>	ShamCo	ShamCin	AABCo	AABCin	P <sub>band</sub>	P <sub>treat</sub>	P <sub>int</sub>
AWTd (mm)	1,92±0,04	1,85±0,02	2,27±0,05*	2,04±0,05**	<0,0001	0,021	2,03±0,02	1,97±0,02 <sup>§</sup>	2,40±0,04**	2,21±0,03** <sup>§§</sup>	<0,0001	0,0004	0,010
AWTs (mm)	2,87±0,09	3,00±0,03	3,39±0,08*	3,20±0,05	<0,0001	0,841	3,09±0,08	3,11±0,04	3,49±0,07*	3,33±0,06*	<0,0001	0,852	0,027
PWTd (mm)	1,78±0,04	1,78±0,04	2,15±0,05*	1,89±0,06#	<0,0001	0,041	1,88±0,03	1,72±0,03	2,32±0,04**	2,05±0,07** <sup>§§</sup>	<0,0001	0,001	0,112
PWTs (mm)	2,87±0,12	2,94±0,07	3,16±0,09*	2,97±0,04	0,016	0,832	2,80±0,05	2,80±0,04	3,29±0,07*	3,03±0,07**	<0,0001	0,127	0,014
LVEDD (mm)	6,43±0,08	6,35±0,09	6,78±0,18	6,54±0,12	0,066	0,234	6,54±0,11	6,65±0,13	7,04±0,15	6,48±0,18*	0,122	0,087	0,049
LVEDS (mm)	3,59±0,08	3,30±0,05	3,92±0,20	3,60±0,10	0,021	0,050	3,56±0,12	3,52±0,12 <sup>§</sup>	4,19±0,14**	3,74±0,12	0,002	0,064	0,159
RWT (%)	0,58±0,01	0,57±0,01	0,66±0,02*	0,60±0,02	0,034	0,130	0,59±0,01	0,56±0,02	0,67±0,02*	0,64±0,01*	<0,0001	0,076	0,759
LVM (g)	0,81±0,03	0,76±0,01	1,15±0,06*	0,90±0,04#	<0,0001	0,003	0,88±0,03 <sup>§</sup>	0,85±0,02 <sup>§</sup>	1,33±0,05**	1,00±0,04 <sup>§§</sup>	<0,0001	<0,0001	0,001
LVMi (mg/g)	2,35±0,06	2,35±0,03	3,38±0,14*	2,90±0,12**	<0,0001	0,058	2,09±0,05 <sup>§</sup>	2,05±0,05 <sup>§</sup>	3,15±0,09*	2,57±0,06** <sup>§§</sup>	<0,0001	0,0002	0,001
FS (%)	44±2	47±1	42±1	44±1	0,180	0,061	44±1	46±1	41±1	43±1	0,009	0,128	0,821
EF (%)	62±2	66±1	62±1	69±2**	0,310	0,002	66±2	69±1	62±1*	69±2#	0,232	0,013	0,339

Indexek: d: diasztolés, s: szisztolés; AWT: eltűsíté falvastagság, PWT: hátsófal vastagság; LVEDD: bal kamrai végdiasztolés átmérő, LVEDS: bal kamrai végdiasztolés átmérő; RWT: relatív falvastagság; LVM: bal kamrai izomtömeg, LVMi: bal kamrai izomtömeg-index; FS: frakcionális rövidülés; EF: ejekciós frakció; P<sub>band</sub>: az 'aortic banding', mint faktor p-értéke; P<sub>treat</sub>: a 'cinaciguat kezelés', mint faktor p-értéke; P<sub>int</sub>: interakciós p-érték \*p<0,05 vs. ShamCo; #p<0,05 vs. AABCo; §p<0,05 vs. 3. hét

nifikánsan magasabb volt, mint a ShamCo-állatokban, mely paraméterek értékét a cinaciguat kezelés nem befolyásolta (2. táblázat).

A bal kamra kontraktilitását jellemző klasszikus paraméter, a dP/dt maximális értéke (dP/dt<sub>max</sub>) szignifikánsan magasabbnak bizonyult az AABCo-állatokban, mint a ShamCo-patkányokban (2. táblázat). A bal kamra elő- és utóterhelésétől független kontraktilitás-paraméterei, mint a végszisztolés elasztancia (E<sub>es</sub>) és a vér munka-végdiasztolés térfogat összefüggés meredeksége (PRSW, 2. ábra), hasonló eltérést mutattak az AABCo- és ShamCo-csoportok között, azonban a kontraktilitás szignifikáns csökkenését jelezték az AABCin-állatokban az AABCo-csoporthoz képest. A dP/dt<sub>max</sub>-végdiasztolés volumen összefüggés (dP/dt<sub>max</sub>-EDV) hasonló tendenciát mutatott (2. ábra).

Míg a diasztolés funkciót jellemző bal kamrai aktív relaxáció időkonstansa (τ) AABCo állatokban szignifikánsan megemelkedett, addig az AABCin-csoportban nem tért el a ShamCo-patkányokban megfigyelt értéktől (2. táblázat).

### Szövettan, immunhisztokémia, biokémiai mérések

A morfológiai változások mikroszkóppal is megfigyelhetők voltak. AAB hatására szignifikánsan megemelkedett a szívizomsejtek átlagos átmérője, amely a cinaciguat kezelés hatására szignifikáns mértékben csökkent (3. ábra, A és E). Picrosirius vörössel festett metszeteink kvantitatív analizisével kimutattuk, hogy a bal kamrai myocardium szubendokardiális területein szignifikánsan megemelkedett a kötőszövetes elemek mennyisége AABCo-patkányainkban a ShamCo-csoportban megfigyelthez képest, amelyet a cinaciguat kezelés szintén szignifikáns mértékben csökkentett (3. ábra, B és F). TUNEL-festés igazolta, hogy az AABCo-patkányok bal kamrai szívizomzatában szignifikánsan magasabb az apoptotikus sejtmagok száma, mint a ShamCo- vagy az AABCin-állatok myocardiumában (3. ábra, C és G).

cGMP immunhisztokémiával festett metszeteink analízise során az AABCin-állatok myocardiumában szignifikánsan erősebb festődést tapasztaltunk, mint akár a ShamCo-, akár az AABCo-csoport metszetein (3. ábra, D és H). Hasonlóképpen, a plazma cGMP-szintje is szignifikánsan magasabb volt AABCin-patkányainkban, mint a ShamCo- és AABCo-állatokban (4. ábra).

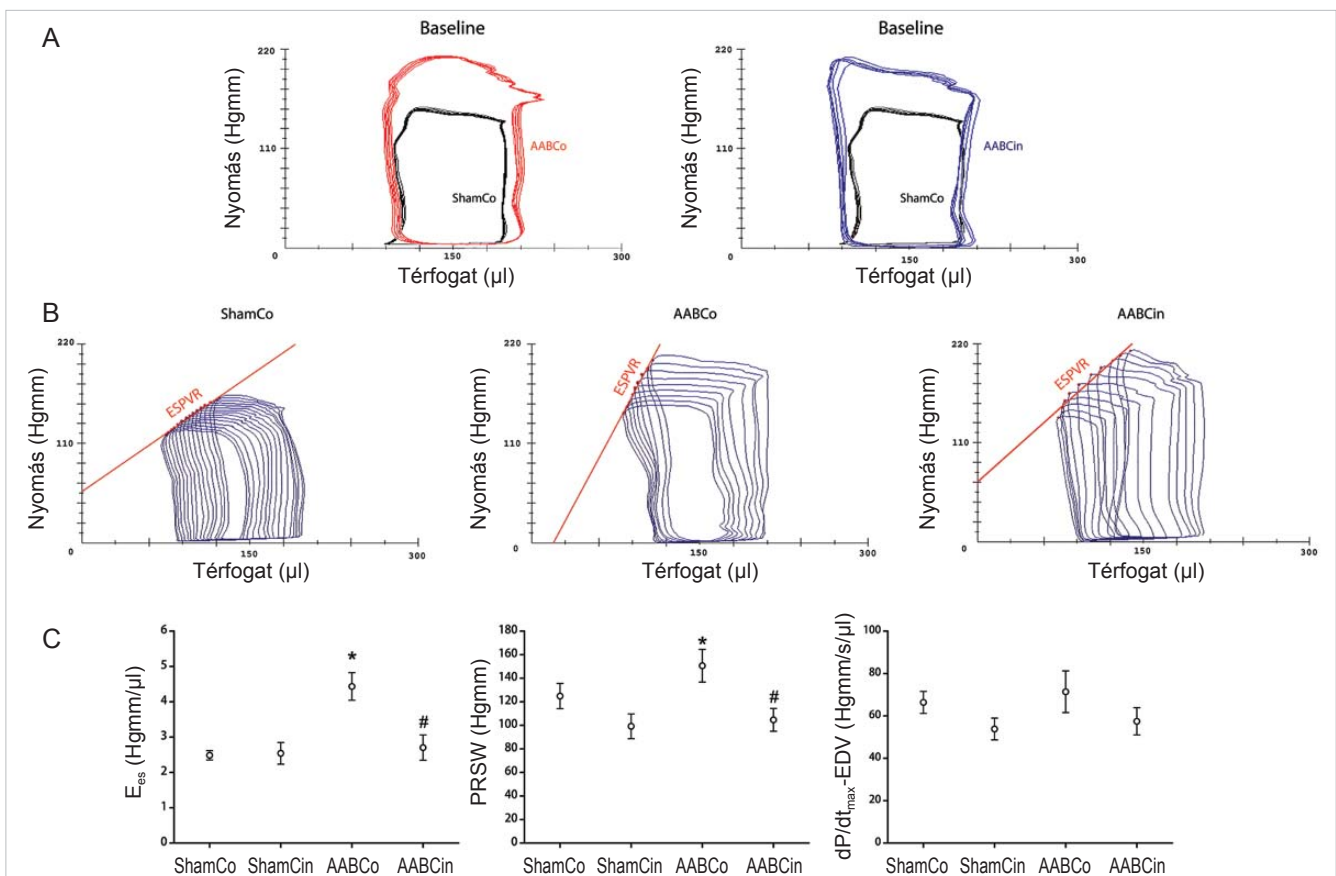
### mRNS-analízis

A bal kamra nyomástúlerhelésének eredményeképpen szignifikánsan emelkedett az ANP és NOS3 kifejeződése (5. A ábra), illetve csökkent a MHCalfa és MHC-beta expresszió-aránya (5. A ábra), amely változások a magzati génprogram reaktiválódására utalnak AABCo-patkányainkban. Cinaciguat kezelés hatására a NOS3 relatív expressziója, valamint a MHCalfa/MHC-beta expresszió-aránya normalizálódott (5. A ábra),

**2. TÁBLÁZAT.** Szervtömegek és alapvető hemodinamikai paraméterek

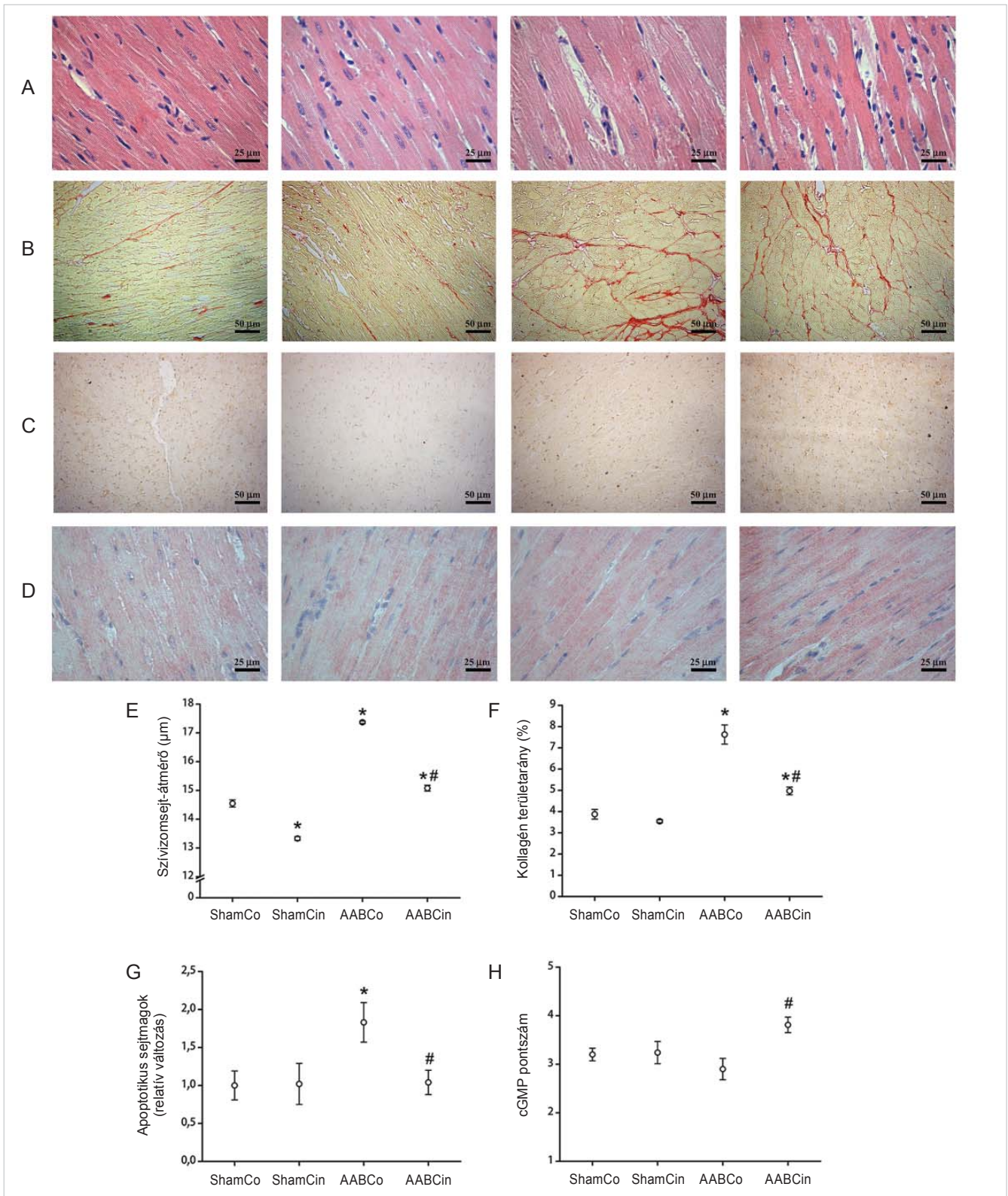
	ShamCo	ShamCin	AABCo	AABCin	P <sub>band</sub>	P <sub>treat</sub>	P <sub>int</sub>
HW/TL (mg/mm)	29,3±0,8	28,1±0,9	38,4±1,5*	33,5±0,7**	<0,0001	0,008	0,094
LuW/TL (mg/mm)	39,2±1,1	39,5±1,3	43,9±0,9*	41,9±1,8	0,007	0,733	0,278
HR (l/min)	433±15	412±17	435±11	444±17	0,255	0,679	0,309
MAP (Hgmm)	134±5	127±5	183±7*	177±5*	<0,0001	0,218	0,902
ESV (μl)	103±8	91±8	97±7	96±8	0,959	0,400	0,436
EDV (μl)	221±19	190±13	233±11	199±16	0,790	0,094	0,728
LVESP (Hgmm)	140±4	138±3	191±14*	185±6*	<0,0001	0,610	0,903
LVEDP (Hgmm)	4,7±0,5	4,1±0,4	4,5±0,3	4,9±0,6	0,248	0,741	0,484
SV μl)	145±14	128±7	156±10	135±7	0,390	0,066	0,857
EF (%)	60±1	61±2	61±1	61±1	0,489	0,685	0,854
CO (ml/min)	63,3±6,7	52,4±3,1	67,6±4,6	56,5±1,8	0,373	0,025	0,984
SW (Hgmm*μl)	16,49±1,76	14,29±1,19	20,92±1,64	17,67±1,40	0,017	0,088	0,736
E <sub>a</sub> (Hgmm/μl)	1,03±0,10	1,06±0,07	1,28±0,13	1,39±0,07	0,008	0,479	0,668
τ <sub>G</sub> (ms)	11,21±0,49	11,33±0,75	16,30±1,65*	13,65±0,66	0,001	0,225	0,185
dP/dt <sub>max</sub> (Hgmm/s)	8589±460	8200±543	10 999±430*	10 374±648	0,0001	0,338	0,822

HW/TL: tibiahosszra normalizált szívtömeg; LuW/TL: tibiahosszra normalizált tüdőtömeg; HR: szívfrekvencia; ESV: végszisztolés volumen, EDV: végdiasztolés volumen; LVSP: bal kamrai szisztolés nyomás, LVEDP: bal kamrai végdiasztolés nyomás; MAP: artériás középnyomás, SV: verővolumen; EF: ejekciós frakció; CO: perctérfogat; SW: verőmunka; E<sub>a</sub>: artériás elasztancia; τ<sub>G</sub>: a bal kamra aktív relaxációjának időkonstansa Glantz módszere szerint (tau); dP/dt<sub>max</sub>: a nyomásváltozás maximális sebessége; P<sub>band</sub>: az „aortic banding”, mint faktor p-értéke; P<sub>treat</sub>: a 'cinaciguat kezelés', mint faktor p-értéke; P<sub>int</sub>: interakciós p-érték; \*p<0,05 vs. ShamCo; \*\*p<0,05 vs. AABCo



**2. ÁBRA.** A cinaciguat normalizálja a megemelkedett kontraktilitást nyomástúlterhelés során. A nyomás-térfogat viszonyok kiindulási alapparaméterei nem különböztek az AABCo- és az AABCin-csoportok között (A). A v. cava inf. okklúziója során regisztrált PV-hurkok (B), és egyidejűleg mért értékekből számolt kontraktilitás-paraméterek (C) azonban megmutatják, hogy a cinaciguat hatására az AAB-t követően kialakuló megnövekedett kontraktilitás szignifikánsan csökken. AAB: abdominális aortic banding; PRSW: verővolumen-végdiasztolés összefüggés; E<sub>es</sub>: végszisztolés elasztancia; dP/dt<sub>max</sub>-EDV: dP/dt<sub>max</sub>-végdiasztolés és volumen összefüggés; P<sub>int</sub>: interakciós p-érték \*p<0,05 vs. ShamCo; #p<0,05 vs. AABCo





**3. ÁBRA. A szövettani eltérések cinaciguat hatására mérséklődnek.** A csoportok közötti különbségeket bal kamrai metszetekről készült reprezentatív felvételeken mutatjuk be: hematoxin-eozin (A) és Picrosirius vörös festés (B), TUNEL (C) és cGMP immunhisztokémia (D). Az átlagos szívomsejt-átmérő (E) és a bal kamrai szívizom szubendokardiális területein a kötőszövetes elemek mennyisége (F) szignifikánsan megemelkedett az AABCo-csoportban a ShamCo-állatokhoz képest, amely eltéréseket a cinaciguat kezelés szignifikánsan csökkentette. Az AABCo-állatok szívében TUNEL-festéssel szignifikáns emelkedés volt kimutatható az apoptotikus sejtmagok számában a ShamCo- és AABCin-csoportokhoz képest (G). A cGMP-pontérték (H) szignifikánsan magasabb volt az AABCin-állatokban, mint az AABCo-patkányokban.  $p_{int}$ : interakciós p-érték; \* $p < 0,05$  vs. ShamCo; # $p < 0,05$  vs. AABCo

míg az ANP expressziójában AAB hatására megfigyelhető emelkedés nem változott (5. A ábra). Továbbá, a cinaciguat-kezelt AAB-állatokban szignifikánsan megemelkedett a SERCA2a és a Pln miokardiális expressziójának aránya (5. A ábra).

A cinaciguat-kezelés az antiapoptotikus szignálutak felerősítésében is szerepet játszhat, amelyet a Bcl-2 expressziójának szignifikáns, míg a HSP70 expressziójának erős tendenciális megemelkedése támaszt alá AABCin-patkányaink szívizommintáiban (5. B ábra).

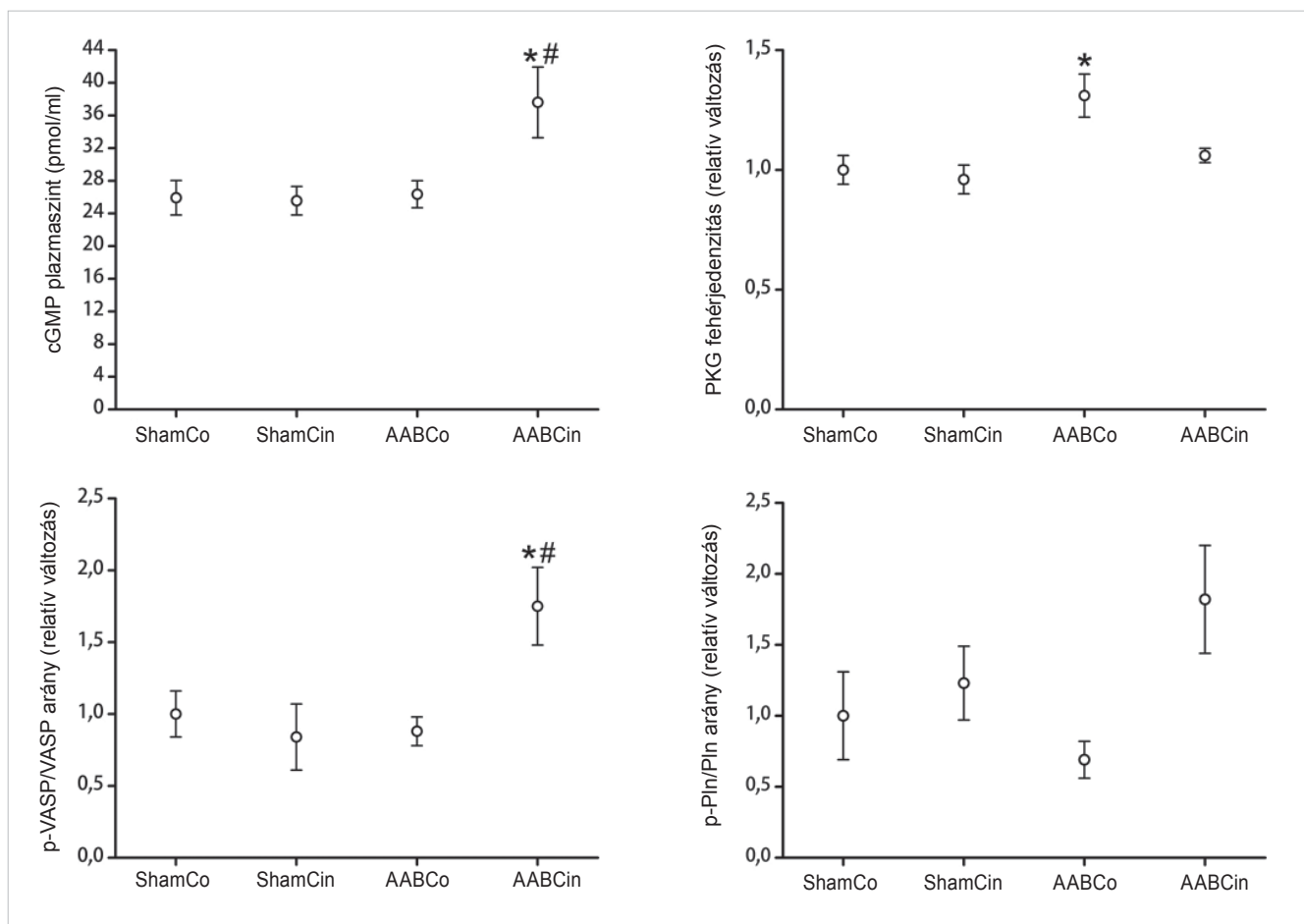
### Immunblot-analízis

A PKG proteindenzitása szignifikánsan magasabb volt az AABCo-patkányok bal kamrájából származó mintákban, mint a ShamCo- és AABCin-állatok hasonló mintáiban (4. ábra). Ugyanakkor a PKG aktivitásának kimutatására széles körben alkalmazott VASP és Pln foszforilációs arány csak az AABCin-állatok szívizommintáiban emelkedett meg (4. ábra).

### Megbeszélés

Jelen munkánkban elsőként számoltunk be róla, hogy az intracelluláris cGMP szintjének emelése *in vivo* hatékonyan előzte meg a nyomásindukált patológiás miokardiális hipertrofia kialakulását. Párhuzamosan a szignifikáns morfológiai javulással, az sGC krónikus aktiválása cinaciguat alkalmazásával a funkcionális eltéréseket is normalizálta AAB-t követően.

*In vivo* a szívizomsejtek fokozott utóterhelésre adott hipertrofiás válaszában fő triggere a szarkolemma megnyúlásból eredő feszülése (22, 23). A közelmúltban közzétett *in vitro* eredmények rámutattak, hogy a cinaciguat képes a hipertrofia csökkentésére újszülött patkány szívizomsejteken (24), alapul szolgálva ezzel hipotézisünkhöz, miszerint az NO-cGMP-PKG jelátvitel krónikus aktiválása képes lehet a szívizomsejt-hipertrofiát csökkenteni, függetlenül a szívet érő hemodinamikai terheléstől. Az NO-cGMP-PKG útvonal jelentő-



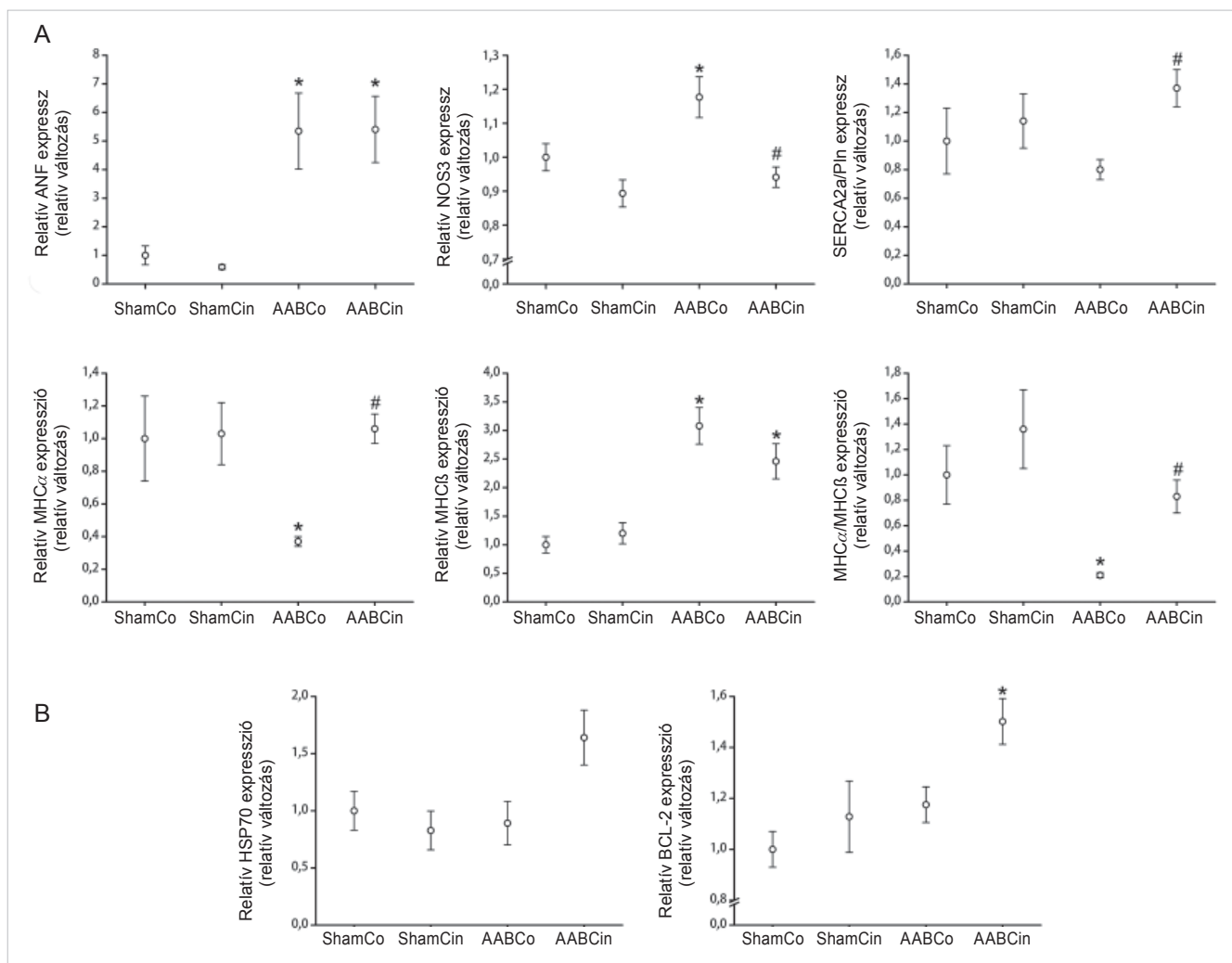
**4. ÁBRA. A cinaciguat hatása a cGMP-jelátvitelre nyomástüreltelés során.** A cinaciguat patológiás körülmények között fellépő erőteljes sGC aktiváló hatását megerősítettük a plazma cGMP-szintjének mérésével, amely az AABCin-patkányokban szignifikánsan megemelkedett. A cGMP aktiválja a PKG-t, amely aztán foszforilálja a VASP- és Pln-fehérjéket, amelyek foszforilációs aránya a PKG aktivitásának széles körben elfogadott markerei. AABCin-állatainkban mindkét mutató értéke növekedett, igazolva ezzel a PKG aktivitásának növekedését az enzim mennyiségének jelentős változása nélkül. PKG: protein-kináz G; Pln: foszfolambán; VASP: vazodilatátor stimulált foszoprotein;  $p_{int}$ : interakciós p-érték; \* $p < 0,05$  vs. ShamCo; # $p < 0,05$  vs. AABCo



ségét az adhatja, hogy számos fontos mechanizmust szabályoz, úgymint a  $Ca^{2+}$ -hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakat, valamint a troponin I (25) és számos ioncsatorna foszforilációját (26). Jelen eredményeink összhangban vannak az sGC-aktiváció fentebb említett antihipertrófiás hatásával. Mindezekon felül a korábban publikált *in vivo* tanulmányokban nem lehetett kizárni, hogy a cinaciguat miokardiális hipertrofiát csökkentő hatása valójában az azt kiváltó primer betegsége (pulmonalis hipertónia [27] és urémia [28]) gyakorolt jótékony hatásának eredménye. Ezzel szemben modellünkben a patológiás helyzetet előteremtő változást a gyógyszer hatása nem képes kompenzálni, így igazoltuk, hogy a cinaciguat primer antihipertrófiás hatással rendelkezik *in vivo*. A cinaciguat e hatása független

a bal kamra hemodinamikai terhelésétől, amelynek hátterében a cinaciguat által megemelt intracelluláris cGMP-szint és a következményes PKG-aktiváció állhat. E megállapításunkat alátámasztja a szívizomzat és a vérplazma megnövekedett cGMP-tartalma (3. D, H ábra, és 4. ábra), valamint a VASP és a PIn emelkedett foszforilációs aránya (4. ábra), amelyek a PKG fokozott aktivitására utalnak (29, 30).

A patológiás körülmények között oxidált, így inaktív sGC funkciókiesése a patológiás balkamra-hipertrofia kialakulásában jelentős szerepet játszik (31); a plazma cGMP-szintje modellünkben mégsem különbözött az AABCo- és a ShamCo-csoportok között. A jelenség hátterében a nátriuretikus peptidek (mint az ANP, 5. A ábra) expressziójának fokozódása, illetve receptoruk, a



**5. ÁBRA. A génexpresszió változásai cinaciguat kezeléssel megakadályozhatók. A:** AAB hatására a magzati génprogram reaktivációja ment végbe, amelyet alátámaszt az ANP, MHCbéta, NOS3 emelkedett, és az MHCalfa csökkent kifejeződése. A NOS3, MHCalfa kifejeződését és az MHC-izomformák expressziós arányát normalizálta a cinaciguat kezelés. A SERCA2a/PIn expressziós aránya szignifikánsan emelkedett az AABcIn-állatokhoz képest. **B:** mind a HSP70, mind a Bcl-2 kifejeződése jelentősen emelkedett az AABcIn-csoportban, amely az antiapoptotikus jelátvitel felerősítésére utal ezen állatokban. ANP: pitvari nátriuretikus faktor; Bcl-2: B-sejtes lymphoma 2; HSP70: 70kDa hőszokk-fehérje; MHCalfa/béta: miozin nehézlánc alfa- és béta-izomforma; NOS3: endotheliális nitrogénmonoxid-szintáz; PIn: foszfolambán; SERCA2a: szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz izomforma 2a; p<sub>int</sub>: interakciós p-érték; \*p<0,05 vs. ShamCo; #p<0,05 vs. AABCo

partikuláris GC (pGC) következményesen fokozott cGMP-generálása állhat (32). Ez a hatás az sGC inaktiválódására adott, annak kiesett cGMP-termelését elégtelenül kompenzáló reakcióként értelmezhető. A pGC továbbá nem feltétlenül képes az sGC funkcióját direkt módon pótolni; az sGC, illetve pGC által termelt cGMP sejten belüli kompartmentalizációja eltér (33). A cinaciguattal kezelt, Sham operált csoportban a cGMP-plazmaszint emelkedésének elmaradása jól mutatja a szer patológiás állapotra szelektív hatását: míg az oxidált, hem proszteritikus csoportját elvesztett, így inaktív sGC-t erőteljesen aktiválva szignifikánsan növelte a cGMP szintjét az AABCin-állatokban, a redukált hemet tartalmazó, így működőképes enzimformára nem gyakorolt számottevő hatást (4. ábra).

A 6. hét végére szignifikáns koncentrikus balkamra-hipertrófia jött létre az AABCo-patkányokban, amelyet alátámaszt az RWT emelkedett értéke. Ezzel szemben az elülső és hátsó fal diasztolés vastagsága, valamint a bal kamrai végdiasztolés átmérő szignifikánsan kisebbnek adódtak az AABCin-csoportban, mint az AABCo-állatokban (1. táblázat). Ezzel összhangban az ultrahangos méréseinkből becsült LVMI a hipertrófia szignifikáns csökkenését mutatta cinaciguat hatására (1. táblázat). Eredményünk korrelál a PDE-5-inhibitor sildenafilről korábban közölt adatokkal. A sildenafil szintén növelte az intracelluláris cGMP szintjét, és csökkentette a hipertrófia mértékét (9). Posztmortem szervtömegméréssel is alátámasztottuk megfigyelésünket: az AABCo-patkányok szignifikánsan nagyobb abszolút és relatív szívűtömeget rendelkeztek, mint a ShamCo-állatok. Ezen eredményünk egyezik az ebben a modellben korábban megfigyeltekkel (34). A szívűtömeg e növekedését a cinaciguat kezelés szignifikánsan csökkentette (2. táblázat), amely egyértelműen utal a szer antihipertrófiás hatására.

Az utóterhelés krónikus fokozódása a myocardium kompenzatorikus átépülését vonja maga után. Az él-sportolóknak jelentkező fiziológiás miokardiális hipertrófiával szemben patológiás stimulusok, mint a magas vérnyomás, hatására maladaptív változások mennek végbe a szívűtömegek szerkezetében (35). Mikroszkópos szinten szignifikánsan megnövekedett átlagos szívűtömeget-átmérőt és szubendokardiális kollagén-mennyiséget találtunk AABCo-patkányainkban a ShamCo-csoportéhoz képest (3. ábra, A, B, E és F). Cinaciguat hatására szignifikánsan csökkent mindkét eltérés mértéke AAB-t követően (3. ábra, A, B, E és F); eredményünk jól korrelál az LVMI és a szívűtömegekben megfigyelhető csökkenéssel vizsgálatunk ezen állataiban (1. és 2. táblázat), illetve korábbi közlemények adataival is (9, 36).

A patológiás balkamra-hipertrófiára jellemző egyik kulcsfontosságú szubcelluláris eltérés a magzati génprogram reaktivációja (37). Valóban, AABCo állatainkban a miozin nehézlánc fiziológiásan kifejeződő alfa-izoformája helyett a béta-izoforma expressziója

került előtérbe; e magzati génprogramra jellemző, felnőttkorban patológiás eltérést (38) a cinaciguat kezelés teljes mértékben megelőzte az AABCin-csoportban (5. A ábra). Figyelemreméltó eredmény ez annak tükrében, hogy a hasonló MAP miatt a bal kamra terhelése e két csoportban azonos volt (2. táblázat). Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a cinaciguatot a közelmúltban megjelent több közleményben is kritikával illeték humán klinikai vizsgálatokban megfigyelt erőteljes vérnyomáscsökkentő hatása miatt (39, 40). Ezzel kapcsolatban hangsúlyozandó, hogy más farmakoterápiás szerekhez hasonlóan a cinaciguat farmakokinetikáját is jelentősen befolyásolja az adagolás módja, és míg a humán vizsgálatokban a szert intravénásan adták, addig jelen kísérletek során orálisan adagoltuk. Mindezzel összhangban 10 mg/kg cinaciguat egyszeri orális dózisa csupán enyhén és átmenetileg befolyásolja a szisztémás vérnyomást (13, 41). Továbbá, a szer e dózisa krónikus orális adagolás mellett sem befolyásolta jelentősen az artériás vérnyomást sem pulmonális hipertónia állatmodelljein (27), sem pedig diabéteszes cardiomyopathia patkánymodelljén (42). Orálisan adagolt Ataciguat és GSK2181236A, két további sGC-aktívátor esetében is hasonló eredményekről számoltak be a közelmúltban patkány szívinfarktus modellben, illetve spontán hipertenzív, stroke-ra hajlamos patkányok esetén (10, 43). Jelen eredményeink korrelálnak a korábbi irodalmi adatokkal, amennyiben kutatócsoportunk sem észlelt vérnyomásváltozást 24 órával az orálisan adagolt cinaciguat utolsó beadása után. További bizonyítékként szolgál a cinaciguat-kezelés ellenére is magas MAP jelenlétére az AAB-állatokban az ANP erőteljesen emelkedett expressziója (5. A ábra), amely a bal kamra fokozott falfeszülésére, így fokozott mechanikus hipertrófiás stimulusra utal mindkét csoportban.

A szívűtömegek szarkolemmájának excesszív feszülése programozott sejthalál indukálására is képes lehet (44). Eredményeink megfelelnek a korábban leírtaknak, az AABCo-állatokban szignifikánsan több apoptotikus sejtmagot mutattunk ki TUNEL-festés segítségével, mint a ShamCo-csoportban (3. ábra, C és G). Ez cinaciguat-kezeléssel teljes mértékben megelőzhető volt, amelyre magyarázatként szolgálhat az antiapoptotikus jelátvitel megerősítése (5. B ábra).

Összefoglalva, a cinaciguat-kezelés eredményeképp szignifikáns javulást találtunk a patológiás balkamra-hipertrófiára jellemző morfológiai eltérésekben mindhárom megfigyelhető (úgy mint makroszkópos, mikroszkópos, illetve molekuláris) szinten.

Ahogy fentebb részleteztük, a bal kamra krónikus túlterhelése patológiás morfológiai változásokat okoz a myocardiumban. Ezen változások kezdetben a megnövekedett utóterhelés ellensúlyozására képes, funkcionálisan kompenzált állapothoz vezetnek megtartott kontraktilitással. Hosszabb fennállás esetén azonban a bal kamra dekompenzálódik, dilatál, amely csökkent szisztolés funkcióhoz, majd tünetes szívelégtelenség-

hez vezethet (45). Állatainkban szívultrahanggal megtartott szisztolés funkciót találtunk mind a 3., mind a 6. héten (1. táblázat), amely az AABCo- és AABCin-állatok kompenzált hipertrofiáját jelzi. Az AABCo-csoportban szignifikánsan emelkedett LVESD azonban előrejelezheti a bal kamra dilatációját és a szisztolés diszfunkció megjelenését. A cinaciguat ezt az eltérést ugyancsak megelőzte (1. táblázat).

Az invazív hemodinamikai vizsgálatok során regisztrált PV-adataink analízise pontosabb betekintést nyújt a szív teljesítőképességébe. Az  $E_{es}$  (a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés egyenesének meredeksége) a kamrai kontraktilitást a kamra terhelésétől függetlenül leíró paraméter. A PRSW értéke (amely a SW és a EDV lineáris összefüggésének meredeksége) a kamra terhelésétől, méretétől és tömegétől is függetlenül képes a kontraktilitás érzékeny jelzésére (20). E paraméterek a kontraktilitás emelkedését mutatták AABCo-patkányainkban a ShamCo-csoporthoz képest, azonban a cinaciguattal kezelt AAB-állatok esetén (2. táblázat és 2. ábra) nem változtak. Ezen eredményeinket részben magyarázhatja a cinaciguat fentebb, illetve korábbi közleményekben (46, 47) ismertetett antihipertrofiás hatása. További lényeges faktorok lehetnek a szerhátmechanizmusában a PKG aktiválódása által létrehozott funkcionális változások: az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák inaktivációja, illetve a késői egyenirányító  $K^{+}$ -csatornák aktivációja egyaránt hozzájárulhat az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció csökkenéséhez (26). Mindezen felül a troponin I PKG általi foszforilációja csökkentheti a szívizomsejtek szarkomereinek  $Ca^{2+}$ -érzékenységét (25). Bár a gyógyszer teljesen nem képes az adaptív hipertrofiás válasz megelőzésére (1. és 2. táblázat, 3. ábra, A és E), vélhetőleg képes a bal kamra túlzott hipertrofiás válaszána mérséklésére, amely a megnövekedett utóterheléshez való alkalmazkodás szempontjából szükségtelen (48). A cinaciguat csökkenti továbbá a patológiás hipertrofia valamennyi jellemző eltérését: a fibrózist (3. ábra, B és F), apoptózist (3. ábra, C és G), illetve a magzati génprogram reaktiválódását (5. A ábra).

A hipertenzív szívbetegség egyik jellegzetessége, hogy a diasztolés diszfunkció lényegesen korábban jelentkezik, mint a szisztolés elégtelensége; klinikailag ez HF-pEF fenotípusban nyilvánul meg. A bal kamrai diasztolés diszfunkció hátterében mind a compliance, mind az aktív relaxáció romlása állhat (49). AABCo-állatainkban a bal kamra szubendokardiális területein megfigyelhető megnövekedett kollagéntartalom (3. ábra, B és F) ellenére az LVEDP nem változott a ShamCo-patkányokhoz viszonyítva (2. táblázat), amely arra utal, hogy a hipertenzív szívbetegség e korai fázisában a bal kamrai compliance zavara még nem volt számottevő. Megfigyelésünk egyezik az irodalomban Derumeaux és munkatársai által jegyzett adatokkal (36). A kollagén meny-

nyiségének növekedése, mint arra ugyanezen szerzők rámutattak, a bal kamra teljes falvastagságára kiterjedt, amennyiben a nyomásterhelés hosszú ideig állt fenn (36). A  $\tau$  ugyanakkor, amely a bal kamra aktív elernyedésének érzékeny paramétere, szignifikánsan megnőtt AABCo-állatainkban, amely az aktív relaxáció zavarát tükrözheti (2. táblázat). Az AABCin-csoportban ezzel szemben diasztolés funkciózavar jele egyetlen vizsgált paraméterben sem mutatkozott, amelynek hátterében az AABCo-patkányokhoz képest a SERCA2a és a PIn (5. A ábra) megnövekedett expresszió-aránya, illetve a PIn emelkedett foszforilációs hányada állhat (4. ábra). Mindkét felsorolt tényező hozzájárulhat a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -szint csökkenésének felgyorsításához a diasztolés korai fázisában, megőrizve ezzel az aktív relaxáció sebességét (50, 51).

A diasztolés diszfunkció elsőként a kisvérköri keringésben okoz pangást (52). Ezzel összhangban AABCo-állataink relatív, nedves tüdőtömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a ShamCo-csoporté, míg az AABCin-patkányok e paramétere nem tért el a ShamCo-csoportban megfigyelttől (2. táblázat).

## Következtetések

Kutatócsoportunk elsőként igazolta *in vivo*, hogy az sGC krónikus aktiválása cinaciguat segítségével megelőzi a patológiás miokardiális hipertrofia kialakulását, függetlenül a bal kamra hemodinamikai terhelésétől. Megfigyeltük továbbá az sGC-aktiváció jótékony hatását morfológiai, funkcionális és molekuláris szinten egyaránt. Eredményeink fényében az sGC aktivátorai a patológiás miokardiális hipertrofia hatékony, új gyógyszerreinek bizonyulhatnak a jövőben.

*Jelen közlemény Németh et al. Sci Rep 2016; 5: 37166. közleményének (18) felhasználásával készült a Nature Publishing Group engedélye (Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)) alapján.*

## Köszönetnyilvánítás

*Ez a projekt a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH (OTKA 105555 és NVKP\_16-1-2016-0017 – Nemzeti Szívprogram, prof. Merkely Béla) és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (dr. Radovits Tamás) támogatásával valósult meg. A cinaciguat Johannes-Peter Stasch (Bayer Pharma AG, Németország) nagylelkű ajándéka. Biró Henriett, Fritz Gábor, Alt Gábor, Fazekas Krisztina és Gregor Viktória munkáját a szerzők hálással köszönik. A szerzők köszönetüket fejezik ki továbbá Meltzer Anna, Merkely Gergő, Sayour Alex Ali, Szabó Lilla és Török Marianna ex vivo elvégzett kísérletek során nyújtott munkájukért.*



## Irodalom

1. Kelly JP, Mentz RJ, Mebazaa A, et al. Patient selection in heart failure with preserved ejection fraction clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65: 1668–1682. 10.1016/j.jacc.2015.03.043
2. Steinberg BA, Zhao X, Heidenreich PA, et al. Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes. *Circulation* 2012; 126: 65–75. 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.080770
3. Emdin CA, Callender T, Cao J, et al. Meta-Analysis of Large-Scale Randomized Trials to Determine the Effectiveness of Inhibition of the Renin-Angiotensin Aldosterone System in Heart Failure. *Am J Cardiol* 2015; 116: 155–161. 10.1016/j.amjcard.2015.03.052
4. Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 216–238. 10.1016/j.pharmthera.2009.02.009
5. Takimoto E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 2012; 76: 1819–1825. 10.1253/circj.CJ-12-0664
6. Zhang ML, Takimoto E, Hsu S, et al. Myocardial Remodeling Is Controlled by Myocyte-Targeted Gene Regulation of Phosphodiesterase Type 5. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 2021–2030. 10.1016/j.jacc.2010.08.612
7. Frantz S, Klaiber M, Baba HA, et al. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J* 2013; 34: 1233–1244. 10.1093/eurheartj/ehr445
8. Pachter P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315–424. 10.1093/eurheartj/ehr445
9. Takimoto E, Champion HC, Li MX, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2005; 11: 214–222. 10.1038/nm1175
10. Fraccarollo D, Galuppo P, Motschenbacher S, et al. Soluble guanylyl cyclase activation improves progressive cardiac remodeling and failure after myocardial infarction. Cardioprotection over ACE inhibition. *Basic Res Cardiol* 2014; 109: 421. 10.1007/s00395-014-0421-1
11. Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, et al. Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury. *Circulation* 2009; 120: 677–686. 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.870774
12. Evgenov OV, Pachter P, Schmidt PM, et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 755–768. 10.1038/nrd2038
13. Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 773–783. 10.1038/sj.bjp.0704778
14. Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 191: 309–339. 10.1007/978-3-540-68964-5\_14
15. Obayashi M, Yano M, Kohno M et al. Effect of angiotensin II receptor antagonism on vascular hypertrophy and aortic impedance in abdominal aortic-banded rat. *Am J Hypertens* 1999; 12: 381–387. 10.1016/S0895-7061(98)00266-0
16. Gao S, Long CL, Wang RH, et al. K(ATP) activation prevents progression of cardiac hypertrophy to failure induced by pressure overload via protecting endothelial function. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 444–456. 10.1093/cvr/cvp099
17. Seymour AM, Giles L, Ball V, et al. In vivo assessment of cardiac metabolism and function in the abdominal aortic banding model of compensated cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2015; 106: 249–260. 10.1093/cvr/cvv101
18. Németh BT, Mátyás C, Oláh A, et al. Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. *Sci Rep* 2016; 37166. 10.1038/srep37166
19. Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Li S, et al. Myocardial reverse remodeling after pressure unloading is associated with maintained cardiac mechanoeconomics in a rat model of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 311: H592–603. 10.1152/ajpheart.00085.2016
20. Radovits T, Oláh A, Lux Á, et al. Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305: H124–134. 10.1152/ajpheart.00108.2013
21. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 43: H941–947.
22. Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 23–37. 10.1016/S0008-6363(00)00076-6
23. Zhang X, Javan H, Li L, et al. A modified murine model for the study of reverse cardiac remodeling. *Exp Clin Cardiol* 2013; 18: e115–117.
24. Irvine JC, Ganthavee V, Love JE, et al. The Soluble Guanylyl Cyclase Activator Bay 58-2667 Selectively Limits Cardiomyocyte Hypertrophy. *PLoS ONE* 2012; 7: e44481. 10.1371/journal.pone.0044481
25. Kaye DM, Wiviott SD, Kelly RA. Activation of Nitric Oxide Synthase (NOS3) by Mechanical Activity Alters Contractile Activity in a Ca<sup>2+</sup>-Independent Manner in Cardiac Myocytes: Role of Troponin I Phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 398–403. 10.1006/bbrc.1999.0346
26. Bai CX, Namekata I, Kurokawa J, et al. Role of nitric oxide in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac myocytes. *Circ Res* 2005; 96: 64–72. 10.1161/01.RES.0000151846.19788.E0
27. Dumitrascu R, Weissman N, Ghofrani HA, et al. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 2006; 113: 286–295. 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581405
28. Kalk P, Godes M, Relle K, et al. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 853–859. 10.1038/sj.bjp.0706792
29. Sartoretto JL, Jin BY, Bauer M, et al. Regulation of VASP phosphorylation in cardiac myocytes: differential regulation by cyclic nucleotides and modulation of protein expression in diabetic and hypertrophic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1697–1710. 10.1152/ajpheart.00595.2009
30. Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, et al. Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 643–650. 10.1007/s00395-010-0097-0
31. Tsai EJ, Liu Y, Koitabashi N, et al. Pressure-overload-induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylyl cyclase in the heart modulates enzyme stimulation. *Circ Res* 2012; 110: 295–303. 10.1161/CIRCRESAHA.111.259242
32. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res* 2003; 93: 700–709. 10.1161/01.RES.0000094745.28948.4D
33. Castro LRV, Verde I, Cooper DMF, et al. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 2006; 113: 2221–2228. 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.599241
34. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, et al. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990; 86: 1913–1920. 10.1172/JCI114924
35. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 255–262. 10.1111/j.1440-1681.2007.04585.x
36. Derumeaux G, Mulder P, Richard V, et al. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation* 2002; 105: 1602–1608. 10.1161/01.CIR.0000012943.91101.D7
37. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol* 2006; 209: 2320–2327. 10.1242/jeb.02084
38. Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, et al. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 1987; 79: 970–977. 10.1172/JCI112908
39. Erdmann E, Semigran MJ, Nieminen MS, et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *Eur Heart J* 2013; 34: 57–67. 10.1093/eurheartj/ehs196
40. Gheorghide M, Greene SJ, Filippatos G, et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator: results from the randomized, controlled, phase IIb COMPOSE programme in acute heart failure syndromes. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 1056–66. 10.1093/eurjhf/hfs093
41. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 2006; 116: 2552–2561. 10.1172/JCI28371
42. Mátyás C, Németh BT, Oláh A, et al. The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 31: 145. 10.1186/s12933-015-0309-x
43. Costell MH, Ancellin N, Bernard RE, et al. Comparison of soluble guanylate cyclase stimulators and activators in models of cardiovascular disease associated with oxidative stress. *Front Pharmacol* 2012; 3: 128. 10.3389/fphar.2012.00128
44. Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 1995; 96: 2247–2259. 10.1172/JCI118280
45. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, et al. Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy: Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Attenuates the Transition to Heart Failure. *Circulation* 1995; 91: 2642–2654. 10.1161/01.CIR.91.10.2642
46. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 589–600. 10.1038/nrm1983
47. Takimoto E, Koitabashi N, Hsu S, et al. Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 408–420. 10.1172/jci35620
48. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 2002; 105: 85–92. 10.1161/hc102.101365
49. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* 2002; 105: 1503–1508. 10.1161/hc1202.105290
50. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, et al. Restoration of Contractile Function in Isolated Cardiomyocytes From Failing Human Hearts by Gene Transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999; 100: 2308–2311. 10.1161/01.CIR.100.23.2308
51. Tsuji T, del Monte F, Yoshikawa Y, et al. Rescue of Ca<sup>2+</sup> overload-induced left ventricular dysfunction by targeted ablation of phospholamban. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H310–H317. 10.1152/ajpheart.00975.2008
52. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000; 102: 470–479. 10.1161/01.CIR.102.4.470