

Nitrogén monoxid szerepe a  
szívbetegségek kezelésében és  
a sportban

Dr. Szelid Zsolt László PhD



TESTNEVELÉSI EGYETEM

Budapest  
2017



Nitrogén monoxid szerepe a  
szívbetegségek kezelésében és  
a sportban

Dr. Szelid Zsolt László PhD



TESTNEVELÉSI EGYETEM

Budapest  
2017



A Habilitációs Bizottság elnöke:  
Prof. Dr. Koller Ákos  
*egyetemi tanár*

A Sporttal Kapcsolatos Társadalomtudományi  
Munkabizottság vezetője:  
Pavlik Gábor  
*professzor emeritus*

Szakmai bírálók:  
Dr. Préda István  
*professzor emeritus (Semmelweis Egyetem)*  
Prof. Dr. Wilhelm Márta  
*egyetemi tanár (Pécsi Tudományegyetem)*

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés .....	7
2. Hipotézisek .....	9
3. Célok .....	9
4. Nitrogén monoxid szintetáz-3 myokardium géntranszfer szerepe az iszkémia-reperfúziós szívkárosodás megelőzésében .....	9
4.1. Nitrogén monoxid iszkémia reperfúzióban .....	10
4.2. Pre-klinikai géntranszfer modell .....	10
4.3. Kardioszelektív NOS-3 géntranszfer mérsékelte az iszkémia-reperfúziós károsodást .....	11
5. A nitrogén monoxid és az NO-mediált jelátvitel kardioprotektív hatásainak további vizsgálata iszkémia_reperfúzióban: inhalációs NO kezelés és foszfodieszteráz gátlás .....	13
5.1. Protokoll, vizsgálati csoportok .....	13
5.2. Szívizom károsodás vizsgálata .....	13
5.3. Szívizom károsodás csökkentése .....	14
5.4. Nitrogén monoxid származékok a plazmában .....	16
5.5. Az ino és tadalafil kezelés kombinációja mérsékli a leukocita infiltrációt.....	17
6. Nitrogén monoxid szintetáz-3 gén polimorfizmus (Glu298Asp) összefüggése a szív sport-adaptációjával élsportoló felnőttekben .....	18
6.1. Vizsgálati protokoll és csoportok .....	20
6.2. Teljesítménydiagnosztika és szív-MRI .....	20
6.3. Dns izolálás és genotipizálás .....	20
6.4. Statisztikai analízis .....	21
6.5. Vizsgált sportolók és kontroll egyének .....	21
6.6. Szív-morfológia és funkció .....	22
6.7. Genotípus eloszlás .....	22
6.8. Szív morfológia és funkció összefüggése a genotípussal .....	23
7. Összefoglalás .....	24
8. Felhasznált irodalom .....	27

*“A világ amit teremtettünk a gondolkodásunk eredménye;  
nem lehet megváltoztatni gondolkodásunk megváltoztatása nélkül.”  
(Albert Einstein)*

## 1. BEVEZETÉS

A nitrogén monoxid (NO) a kardiovaszkuláris rendszer egyik legfontosabb regulátor molekulája. Tudományos jelentőségét az a felismerés adta, amikor kiderült, hogy az NO az elsődleges felelőse az érrendszerben régóta ismert, és sejtelenesen csak „endothel derived relaxing factor (EDRF)” névvel jelölt általános vazodilatátor hatásnak. Az NO kardiovaszkuláris hatásmechanizmusának leírásáért 1998-ban Orvosi Nobel Díjat adtak.

A nitrogén monoxid molekula a szervezetben kétféle módon keletkezhet: egyrészt endogén nitrogén szintetázok (NOS) állíthatják elő L-argininből, másrészt pedig nitritből /nitrátból redukálódhat. A szintéziséért felelős NOS háromféle izoformáját ismerjük: endoteliális, neuronális és indukálható. Az endoteliális NOS (másnéven: NOS-3) szív-érrendszeri szabályozásra kifejtett jelentős hatása mára általánosan elfogadottá vált. Az NO hatását cGMP közvetített jelátvitellel, vagy attól függetlenül, (nitrozatív és S-nitrozilációs fehérje módosítások során) fejt ki. A cGMP jelentős másodlagos jelátvivő molekula, amit guanilát cikláz enzimek termelnek. Ezek egy része a citoplazmában található (sGC), más része pedig sejtmembránhoz kötött (pGC). A cGMP hatásának több közvetlen célpontja is van. Ezek közé tartoznak a protein kináz G (PKG), a ciklikus-nukleotid kapuzott ion csatornák (CNG), és a cGMP-t hidrolizáló foszfodieszterázok (PDE).

A kardiovaszkuláris NOS / sGC jelátvitelért nagyrészt a PKG család egy tagja, a PKGI $\alpha$  felel. A foszfodieszterázok a cGMP és cAMP lebontásáért felelős katabolikus enzimek. A PDE család öt tagjának van kardiovaszkuláris aktivitása, melyek közül szelektív gátlószerei miatt leggyakrabban és részleteiben a PDE-5 hatását vizsgálták.

A szívinfarktus jelenlegi hatékony kezelése során elzáródott coronária megnyitása történik, ami a korábban iszkémiás terület prompt referfúziójával jár. Egyre több adatunk van arra, hogy a hosszútávon jótékony hatás mellett ez a heveny oxigenizáció a sérült myocardiumban súlyos károsodásokat is okozhat és az iszkémiás szívkárosodás akár 40-50%-ért is felelős lehet. 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 (1).

A cGMP hatásmechanizmus (2, 3) a jelenlegi preklinikai és klinikai vizsgálatok alapján egyértelműen képes mérsékelni a szívinfarktus méretét. Preklinikai vizsgálatokban a NOS-3 myocardium géntranszfer, és az inhalált nitrogén monoxid kezelés (4), klinikai vizsgálatokban pedig a PDE-5 gátlók, (5, 6) és az inhalatív NO kezelés (iNO) (7) mérsékelte a szív iszkémia-reperfúziós károsodását.

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 verőtérfogát – ezeket a változásokat összességében sportszívnek nevezzük (8). A folyamatnak legfőbb mozgatórugói a serkentő hormonok (pl. az inzulin-szerű növekedési hormon). Ezen felül a mozgás által indukált endoteliális NOS aktivitásról ismert, hogy jelentősen 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.

Tudományos munkáim elsődleges célja a nitrogén monoxid (NO) jelátvitel patológiás és élettani kardiovaszkuláris adaptációban betöltött szerepének vizsgálata volt. Pre-klinikai kísérletes munkámat Belgiumban, a Leuveni Katolikus Egyetemen végeztem, ezt követően a szívinfarktust szenvedett betegek vizsgálatára a Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézetben, majd nagyrészt a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikáján került sor. Itt kezdtem el a munkámban ismertetett élsportolói vizsgálataimat is, amit a Testnevelési Egyetemen folytatok.

A vizsgálatok első részében pre-klinikai állatmodelleken myocardium géntranszfer segítségével növeltem a nitrogén monoxid szöveti koncentrációját. A lokálisan megnövekedett NO hatására a kontroll állatokhoz képest kisebb méretű szívinfarktus alakult ki, ami átmenetileg jobb szív-funkciót is eredményezett. Ezt követően a gyorsabb és hatékonyabb NO kezelés elérése céljából inhalált NO kezelést alkalmaztunk, ami munkatársaim kísérletében a korábbi eredményeimnek megfelelően ugyancsak csökkentette a szívinfarktus mértékét. Doktori hallgatóm (Dr. Lux Árpád) munkájában preklínikai modellben kombináltuk az inhalált NO kezelést az NO jelátviteli út csökkentéséért felelős enzim, a foszfodieszteráz-5 blokkolásával. Ennek hatására további szívinfarktus mérséklődést értünk el.

Az NO hatásmechanizmus terápiás jelentőségét ezt követően humán vizsgálatokban is tanulmányoztuk. A pre-klinikai vizsgálatokhoz hasonlóan az inhalált NO szívinfarktust mérséklő hatását vizsgáltuk egy nemzetközi együttműködésben elvégzett tanulmány keretében. Ennek a munkának publikálása folyamatban van, eredményei azonban a későbbiekben jelentősen megváltoztathatják a szívinfarktusos betegek első ellátásának terápiás algoritmusát.

A nitrogén monoxid folyamatos kardiovaszkuláris termeléséért felelős enzim, az endotheliális nitrogén monoxid szintetáz (eNOS, vagy NOS-3) genetikai varianciái nagy lakossági vizsgálatokban összefüggést mutattak számos szív- és érrendszeri rizikóval. Ennek kapcsán „egy-gén megközelítés” módszer segítségével vizsgáltam a NOS-3 gén egyik varianciájának összefüggését élsportolók szív adaptációjával. Ebben a munkámban egyértelmű összefüggést írtam le élsportolóknál a NOS-3 gén varianciájának jelenléte és a szív jobb kamrájának sportadaptációja között.



## 2. HIPOTÉZISEK

- Az endotheliális nitrogén monoxid szintetáz (NOS-3) myokardium géntranszfer mérsékli az iszkémia-reperfúziós károsodás mértékét sertés modellben.
- Inhalált nitrogén monoxid és foszfodieszteráz kezelés kombinációja szinergista kardioprotektív hatást fejt ki iszkémia-reperfúziós preklinikai állatmodellben
- Élvsportoló felnőttekben a nitrogén monoxid biológiai hozzáférhetőségének változása a NOS-3 gén Glu298Asp polimorfizmusának jelenléte kapcsán összefüggést mutat a bal- és jobb kamrai morfológiai és funkcionális adaptációval.

## 3. CÉLOK

- Hatékony perkután géntranszfer technológia és releváns iszkémia-reperfúziós sertés állatmodell kifejlesztése.
- Géntranszfert követően az iszkémia reperfúziós modellben a kardioprotektív hatások igazolása: in vivo hemodinamikai monitorozással és post-mortem hisztológiai feldolgozással (nekrózis méretének vizsgálata, leukocita infiltráció).
- Releváns iszkémia-reperfúziós kisállat (egér) modell kifejlesztése.
- Inhalációs NO kezelés módszerének kifejlesztése kisállatokban.
- Kardioprotektív hatások igazolása a kísérleti modellen: in vivo echocardiográfiával és nyomás-térfogató katéterrel, plazma nitrogén monoxid származékok mérésével, valamint poszt-mortem szívizom nekrosis és leukocita infiltráció vizsgálatával.
- Hasonló állóképességi és erő komponenssel rendelkező élvsportolók kiválasztása.
- Teljesítmény diagnosztikai vizsgálattal az élvsportolók és a kontroll (nem sportoló) személyek aktuális fitességi állapotának meghatározása és a csoportok pontosabb elkülönítése.
- Szív MRI vizsgálattal a keringési sport-adaptáció meghatározása, bal és jobb kamra tekintetében.
- A Glu298Asp genetikai variancia meghatározása valamennyi vizsgált személyben, annak összevetése a szív morfológiai és funkcionális értékelésével.

## 4. NITROGÉN MONOXID SZINTETÁZ-3 MYOKARDIUM GÉNTANSZFER SZEREPE AZ ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS SZÍVKÁROSODÁS MEGELŐZÉSÉBEN

A szívizom iszkémia és infarktus legfontosabb kezelési stratégiái jelenleg a hatékony koronária-intervenciós eljárások, amelyek a sérült szövet azonnali reperfúzióját eredményezik. A súlyosan iszkémiás szívizom heveny reperfúziója azonban perkután koronária revaszkularizáció, bypass műtét, thrombolízis kezelés, vagy szívtranszplantációt követően - paradox módon - további szöveti sérülést okozhat. Ezeket hívjuk összefoglaló néven iszkémia-reperfúziós károsodásoknak.

A szívizom iszkémiás és reperfúziós károsodás megelőzésének és kezelésének hatékony módszere

a lokális biológiai hatást lehetővé tevő szívizom-géntranszfer technológia (9). Az NO termelésért felelős legfontosabb kardiovaszkuláris enzim, a NOS-3 transzgén expressziója mellett az NO kardioprotektív hatása jól mérhető.

#### 4.1. Nitrogén monoxid iszkémia reperfúzióban

Myocardium iszkémia-reperfúzió során az intersticiális NO koncentrációja átmenetileg emelkedik, majd a hosszabb idejű (>30 perc) iszkiémiát követően a nyugalmi szint alá csökken. Ennek fő oka az endogén NOS-3 promotor aktivitás és mRNS-stabilitás csökkenése az elnyújtott idejű iszkémia alatt felszaporodó citokin (pl. TNF $\alpha$ ) hatására. Ez végső soron csökkenti a szöveti NO hozzáférhetőségét. Az iszkémia-reperfúzió során időközben felszaporodó reaktív oxigén gyökök DNS fragmentációt és apoptózist eredményeznek.

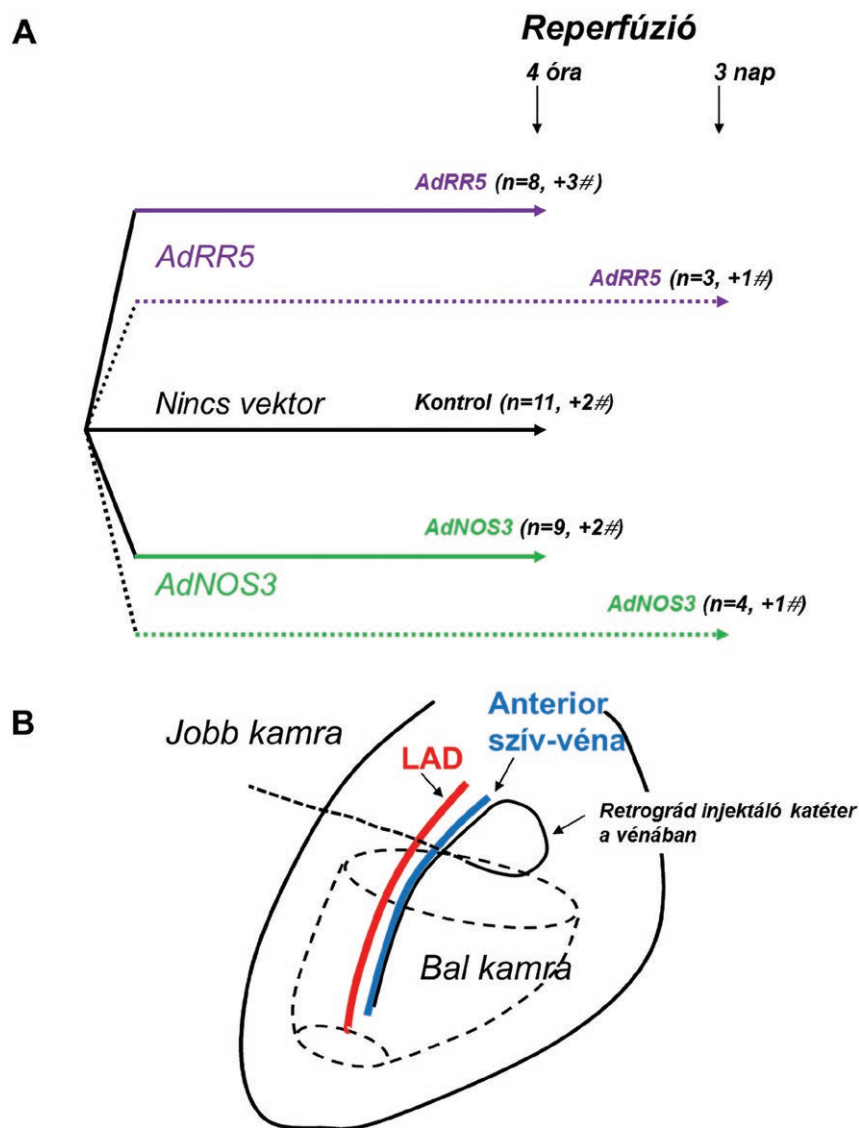
Az NO szöveti koncentrációjának lokális emelésével módosíthatóvá válik az iszkémia-reperfúziós károsodás mértéke (10). Erre utalnak azok a vizsgálatok, amelyekben az endogén NOS-3 gyógyszeres gátlása mellett a csökkent lokális NO koncentráció I/R-t követően rosszabb bal kamrafunkciót és nagyobb kiterjedésű szívinfarktust eredményezett. Ezzel ellentétben azonban az NO biológiai hozzáférhetőségét növelő stratégiák, szívizom-specifikus NOS-3 gén felül-expressziója egerekben (11) és sertésekben (12), a NOS-3 szöveti expressziót fokozó kezelések (13), az NO-donorok alkalmazása, az NO inhalációs kezelés, NOS szubsztrát, vagy kofaktor adagolása csökkentette az infarktus mértékét és mérsékelte a posztinfarktusos bal kamrai remodelációt. A fő probléma azonban az, hogy a gyógyszeres kezelés hatására megnőtt NO fél életideje rövid, a folyamatos intravaszkuláris injektálás mellett pedig a szisztémás mellékhatások (hypotenzió, nitrát tolerancia) mellett eltörpülhetnek a lokálisan szívizomra gyakorolt előnyös hatásai.

#### 4.2. Pre-klinikai géntranszfer modell

A kardiovaszkuláris és azon belül a myocardium géntranszfer kapcsán három alapvető kérdés van. Egyrészt definiálni szükséges a géntranszfer során alkalmazott vektort, másrészt a szöveti bejuttatás módját, harmadrészt pedig hogy milyen lokális transzgén expresszióját kívánjuk elérni.

Szívben hatékony géntranszfert leginkább adenovírus (Ad-5) vektorral értek el, de alkalmaztak adeno-asszociált vírust és plazmid vektorokat is. A szöveti bejuttatás preklinikai modellekben elsőként sebészi (nyitott mellkasfal), majd perkután katéteres módon történt. Iszkémia-reperfúzióban több transzgén expressziójával is történtek vizsgálatok (VEGF 165, Hsp90).

Vizsgálataimban ugyancsak sertés modellt vizsgáltam, melynek során ketamin-propofol anesztézia mellett az altatott állatok sinus coronariusán keresztül az anterior szív-vena retrográd katéterezésére került sor. A transzkatéteresen injektált adenovírus-5 vektor az állatok egyik csoportjában humán NOS-3 gént tartalmazott (AdNOS-3), a másik csoportban nem tartalmazott transzgént (AdRR5). A génterápiát követő 3. napon ismételt katéterezés során az elülső lefutó coronária artéria (LAD) középső szegmentumának ballonos okklúziójára került sor 45 percen át, amit 4 óras, vagy 3 napos reperfúzió követett (14).



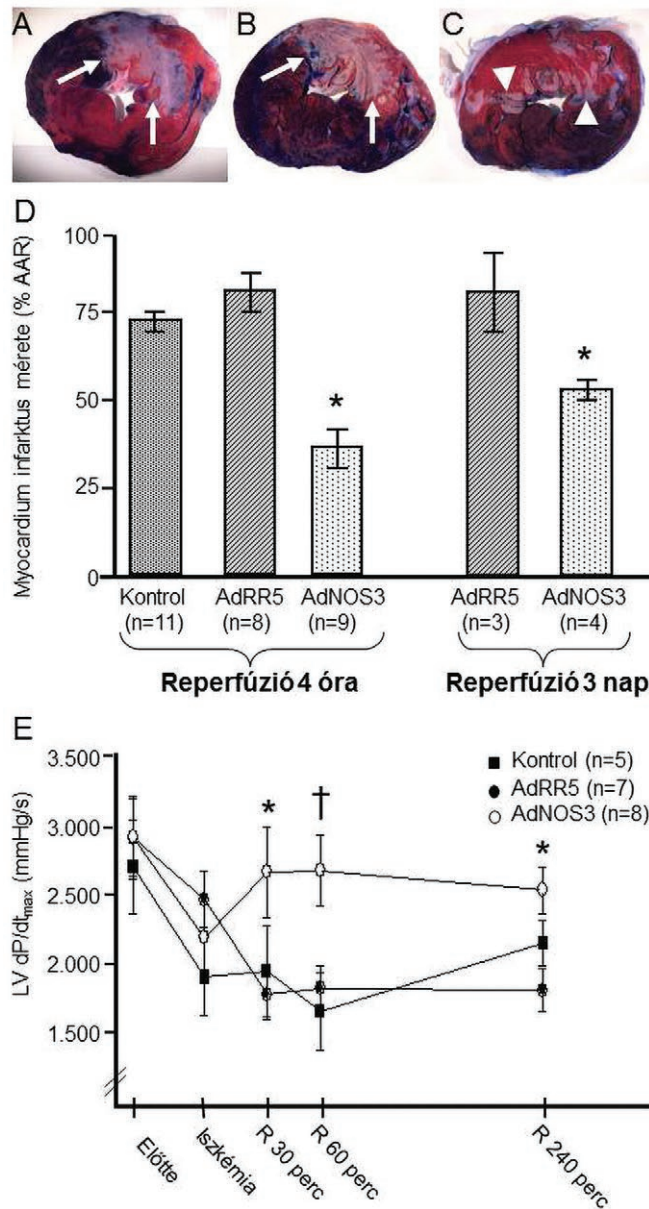
**1. ábra** Vizsgálati csoportok és géntranszfer protokoll (14. ref módosítva)

Felső kép (A): A kísérletes protokollban résztvevő állatok csoportosítása. A retrográd koronária vénás injektálással elvégzett géntranszfer követően három nappal 45 perces iszkémiát indukáltunk, amit 4 óras, vagy 3 napos reperfúzió követett. A vizsgálati állatok száma csoportonként került meghatározásra. A #-el a csoportban a vizsgálat során elhalálozott állatok száma került leírásra.

Alsó kép (B): A szívben elvégzett géntranszfer az anterior szív-vénán keresztül történt, majd azt követően a hasonló szívizom területért felelős elülső lefutó koronária artéria (LAD) ballonos elzárása révén történt az iszkémia indukciója.

### 4.3. Kardioszelektív NOS-3 géntranszfer mérsékelte az iszkémia-reperfúziós károsodást

Vizsgálataimban az anterior szív-véna retrográd injektálása mellett adenovírus-mediált géntranszfer történt humán NOS-3 gént (AdNOS-3), valamint transzgént nem tartalmazó vektorral. A két géntranszferen átesett csoport mellett az iszkémia-reperfúziós protokollt kontroll állatokban is elvégeztem. A bal kamra elülső falából vett hisztológiai mintákban a NOS-3 transzgén kapott állatokban jelentősen emelkedett a szöveti NOS-3 fehérje expressziója a kontroll és a transzgént nem tartalmazó vektorral injektált állatokhoz képest.



**2. ábra.** Szívinfarktus mérete és bal kamrafunkció változása iszkémia-reperfúziós során a vizsgálati csoportokban (14. ref módosítva)

Felső panelek (A-C): Reprezentatív makroszkópos képek a szívizom infarktus méretéről (TTC felületi festés) kontroll (A), AdRR5- (B), valamint AdNOS3-kezelt (C) állatokban. Az életképest szívizom vörösre, a nekrotikus pedig fehérre színeződik.

Középső panel (D): A szívizom infarktus mérete a rizikónak kitett szívizom (AAR=area at risk) százalékában kifejezve kontroll, AdRR5- és AdNOS3-kezelt sertésekben. \*  $P < 0.05$  versus kontroll és AdRR5 4 órás és versus AdRR5 3 napos reperfúziót követően.

Alsó panel (E): Bal kamra szisztolés funkció ( $dp/dt_{max}$ ) kontroll (zárt négyzet), AdRR5 és AdNOS3 állatokban kezdetben, iszkémia alatt, valamint 30 és 60 perces és 4 órás reperfúzióban. \*  $P < 0.05$  versus AdRR5. †  $P < 0.05$  versus kontroll és AdRR5.

Az emelkedett lokális NOS-3 expresszió fokozott NO termelést is jelentett, amit az AdNOS-3 injektált állatokban mért emelkedett szöveti DAF2-DA fluoreszcencia, valamint az emelkedett NOx plazmaszint is igazolt. A NOS-2 fehérje szívizom-expressziója ugyanakkor hasonló volt valameny nyi csoportban. Kontroll és AdRR5 vektort kapott állatokban az I/R során jelentős mértékű (AAR ~75%-a) transzmurális myocardium infarktus alakult ki, csökkent bal kamrafunkció mellett.

NOS-3 transzgénnel injektált állatokban mérsékelt mértékű szívinfarktus kialakulását észleltük (AAR 31%-a) 4 órás reperfúziót követően. NOS-3 géntranszfert követően a makroszkóposan igazolt mérsékeltbb nekrozis mellett a szívizom-specifikus nekrozis markerek expressziója is csökkent (14). A bal kamra szisztolés és diasztolés funkciója, különösen a reperfúzió kezdeti szakaszában ugyancsak jobbnak bizonyult a NOS-3 transzgénnel injektált csoportban.

## **5. A NITROGÉN MONOXID ÉS AZ NO-MEDIÁLT JELÁTVITEL KARDIOPROTEKTÍV HATÁSAINAK TOVÁBBI VIZSGÁLATA ISZKÉMIA\_REPERFÚZIÓBAN: INHALÁCIÓS NO KEZELÉS ÉS FOSZFODIESZTERÁZ GÁTLÁS**

A nitrogén monoxid kezelés jelenleg ismert leghatékonyabb módja a klinikai gyakorlatban az inhalációs terápia. Ez a kezelés a pulmonális nyomás csökkentése mellett parakrin hatásokkal is bír a szívizomzatra. A leuveni munkacsoport korábbi vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy sertés iszkémia-reperfúziós modellben magas dózisú (80 parts per million) NO inhaláció mérsékli a bal kamrai szívinfarktus méretét (4). A kardioprotektív hatást humán vizsgálatokban is sikerült igazolni (7), azonban nagy klinikai vizsgálatok eredményei még nem ismertek. Az inhalációs NO kezelés nagy előnye az NO donorokkal szemben, hogy lényegében nincs szisztémás hypotóniát okozó hatása (4), valamint a kezelés időtartama jól meghatározható az inhalált gáz rövid fél életideje miatt. Jelen vizsgálatokban PhD hallgatómmal (Dr. Lux Árpád) az inhalációs kezelés mellett a biológiai hatásért felelős cGMP lebontásáért felelős foszfodieszteráz-5 inhibitorát, a tadalafilt (15) is vizsgáltuk.

### **5.1. Protokoll, vizsgálati csoportok**

Az iszkémia-reperfúziós (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. Az egereket négy kezelési csoportba randomizáltuk és három napig (3d), vagy négy hétig (4w) követtük: kezeletlen kontroll (CON), inhalált nitrogén monoxid (iNO), tadalafil (TAD) és kombinált kezelés (iNO+TAD). Az iNO kezelés a reperfúzió előtt 30 perccel kezdődött és az azt követő 20. percre tartott. A tadalafilt egy órával az I/R előtt közvetlenül a gyomorba adtuk (4 mg/kg). A cGMP szinteket egy külön vizsgálati populációnál mértük (16).

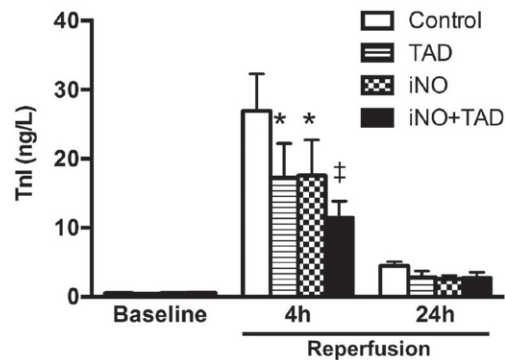
### **5.2. Szívizom károsodás vizsgálata**

Transztorakális szívvultrahang 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). Három nap után invazív vérnyomásmérést, négy hét után pedig invazív nyomás-konduktancia méréseket végeztünk. Nyugalmi nyomás-térfigat 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. Három nappal az I/R után, a jobb nyaki ütőéren keresztül kék szövet-festéket adtunk 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 reperfúzió során mértük meg.

### 5.3. Szívizom károsodás csökkentése

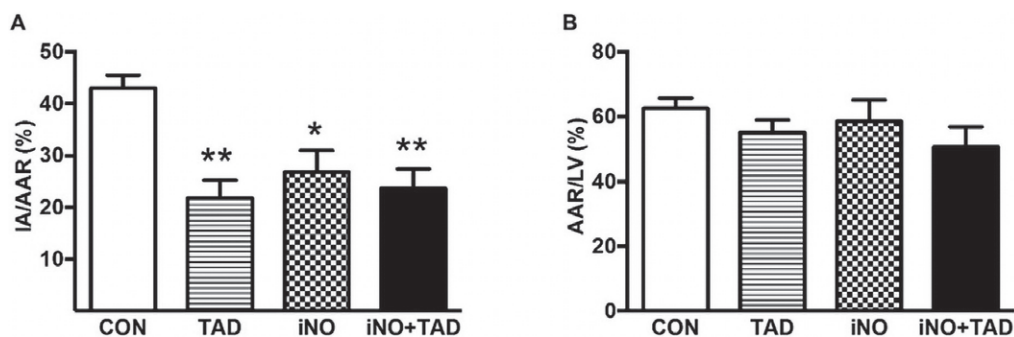
Az iNO (n=9; 17.6±5.1 ng/l) és TAD (n=7; 17.3±5.0 ng/l) mellett a CON (n=9; 24.6±5.3 ng/l) állatokhoz viszonyított és 4 óra után elért TnI plazmaszint csökkenést a kombinált kezelés tovább fokozta (n=9; 11.4±2.4 ng/l, 3. Ábra).



3. ábra Troponin I plazmaszintek változásai (16. ref. módosítva).

A biomarker felszabadulás 4 óra után csúcsosodott és 24 óra után normalizálódott. A TAD (n=7), iNO (n=9) és iNO+TAD (n=9) kezelések a CON-hoz (Kontroll) 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 kamra területének ~57%-át tette ki, de nem rontotta 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±4%, 22±3% és 24±4% vs, CON 43±2%-kal (n=7),  $P < 0.05$ ). (4. Ábra).

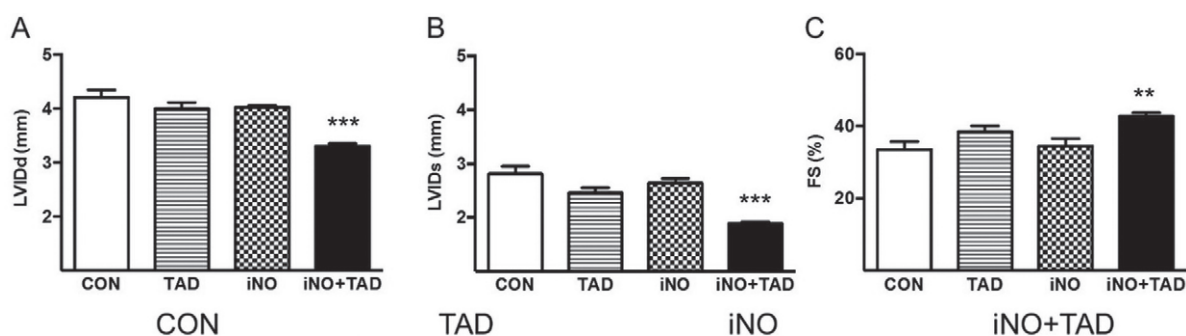


4. ábra A TTC festett minták planimetriás analízise (16. ref. módosítva).

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 nitrogén 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 (5. 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 verő-munkával. Egy, az előterheléstől független mutató, a PRSW (preload-recruitable 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/dtmin és izovolumetriás relaxációs idő ( $\tau$ )) a kezelési stratégia nem befolyásolta (2. Táblázat).



5. ábra A szerkezeti változások szívultrahangos mérése (16. ref módosítva).

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.

1. táblázat Bal kamrai szívizom vastagságok a vizsgált csoportokban (16. ref. módosítva)

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

IVSd és IVS<sub>s</sub> – diasztolés és szisztolés kamrai szeptum vastagság, LVPWd és LVPW<sub>s</sub> – diasztolés és szisztolés hátsófal vastagság, WT<sub>IVS</sub> 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

**2. táblázat** Nyomás-térfogat analízis 4 hét után (16. ref módosítva)

	CON	TAD	iNO	iNO-TAD
	(n=11)	(n=13)	(n=12)	(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 <sub>max</sub> (mmHg/s)	8795±946	9956±646	11899±879	10617±969
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-7498±538	-8248±586	-8930±822	-7837±396
t	5.2±0,2	5.2±0.2	5.0±0.3	5.1±0.2

HR – szívfrekvencia (lperc); 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 kapcsolat; dP/dt<sub>max</sub> és dP/dt<sub>min</sub> - időegység alatt bekövetkező nyomásváltozás maximális és minimális értéke; t – tau az izovolometriás 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

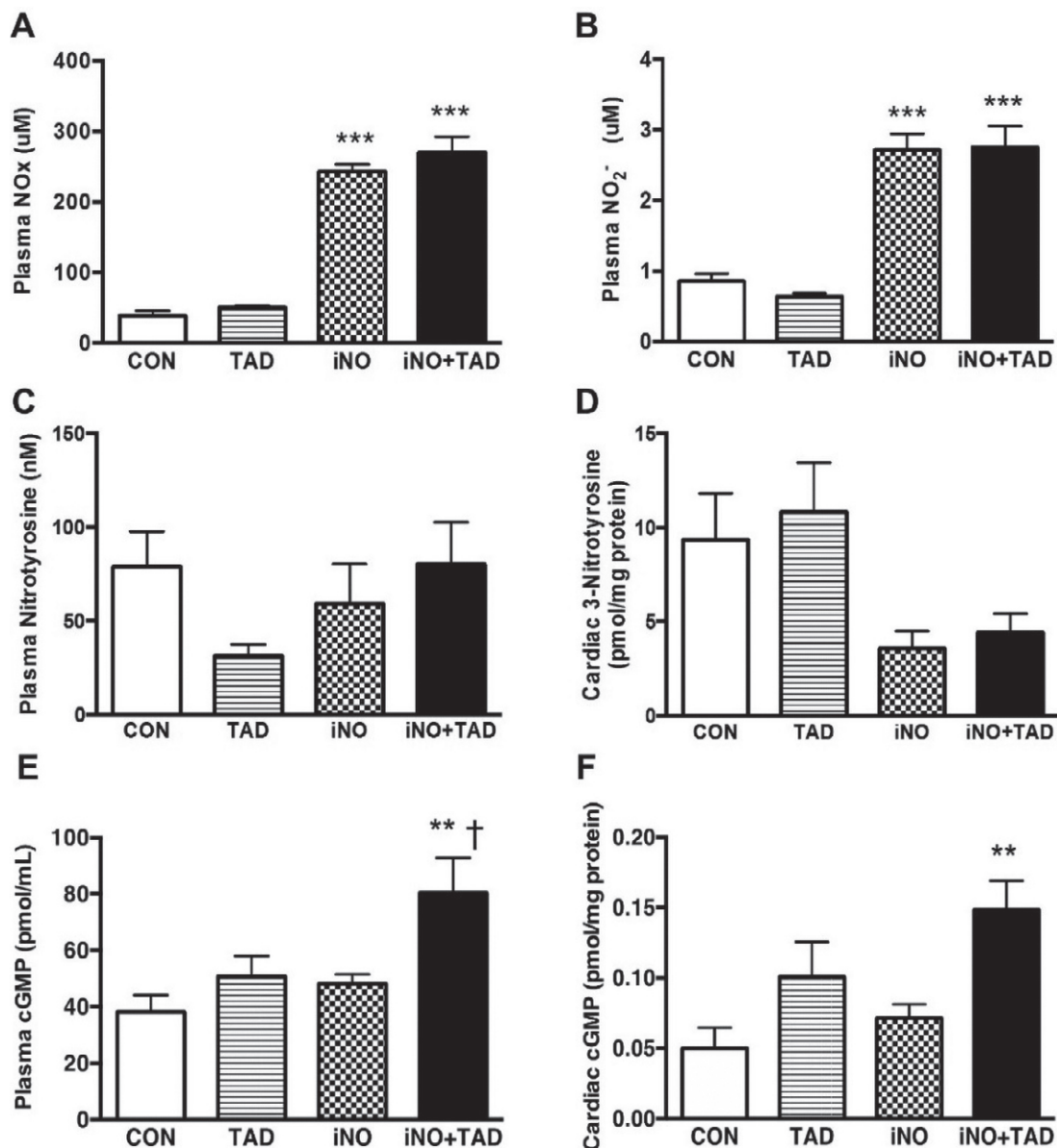
#### 5.4. Nitrogén monoxid származékok a plazmában

Az NO inhaláció után mért plazma NO<sub>x</sub> 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).

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. (6. Ábra).



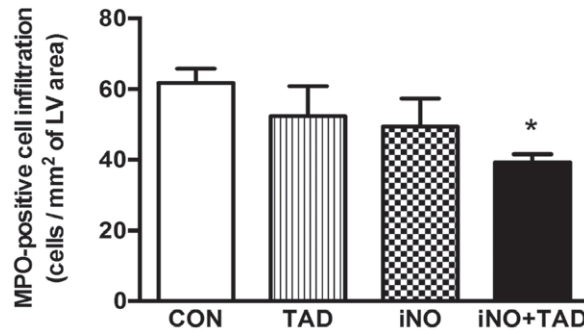


**6. ábra** NO eredetű oxidációs termékek, 3-nitrotirozin szintek és cGMP szintek a plazmában és a szív-szövetben (16. ref módosítva)

Plasma NOx (nitrátok, nitrit és S-nitrosozo vegyületek, A panel) és nitrit szintek (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 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 enzim immunoassay-vel 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 = inbalált nitrogén monoxid, iNO+TAD = kombinációs kezelés \*\*\* P<0.0001 vs CON és TAD, \*\* P<0.01 vs CON, † P<0.05 vs iNO

### 5.5. Az iNO és tadalafil kezelés kombinációja mérsékli a leukocita infiltrációt

Három nap után a mid-ventrikuláris keresztmetszeti felszínhez viszonyított MPO-pozitív sejt-szám jelentősen alacsonyabb volt az iNO+TAD kezelt egerekben. (P=0.02 vs CON, 7. Ábra).



7. ábra Myeloperoxidáz pozitív (MPO) sejt-infiltráció 3 nappal az I/R után (16. ref módosítva)

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*

## 6. NITROGÉN MONOXID SZINTETÁZ-3 GÉN POLIMORFIZMUS (Glu298Asp) ÖSSZEFÜGGÉSE A SZÍV SPORT-ADAPTÁCIÓJÁVAL ÉLSPORTOLÓ FELNŐTTEK-BEN



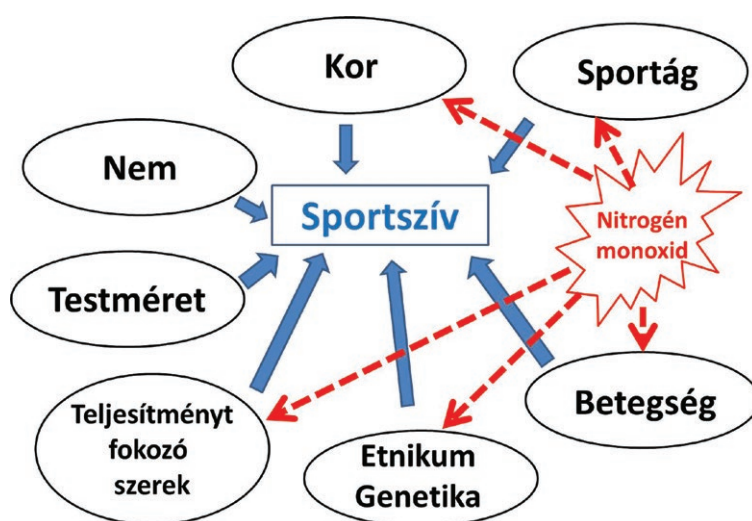
8. ábra Hipertrófiás cardiomyopatia (HCM) és sport-adaptációval összefüggő bal kamra átalakulás (sportszív) elkülönítési lehetőségei

+: jellemző rá, -: nem jellemző rá, HCM: Hipertrófiás Cardiomiopátia

A rendszeres intenzív fizikai aktivitás szív- és keringésadaptációval jár. A keringésadaptáció legmarkánsabb helye a szív, amelyben a sport-adaptáció megnövekedett bal- és jobb kamrai szívizomzatot, valamint emelkedett nyugalmi verővolument jelent (17, 18). A rendszeres, nagy intenzitású fizikai aktivitás által okozott hipertrófia nagy mértékben hasonlíthat a patológiás szívizom

megvastagodásra. A patológiás hipertrófia legfontosabb oka a hipertrófiás kardiomyopátia, ami a sportolói hirtelen szívhalál leggyakoribb oka is fiatal (<35 év) élsportolóknál. A patológiás és a sportadaptációval összefüggő hipertrófiát számos szempont alapján el tudjuk elkülöníteni, amiben nagy segítséget nyújthatnak a képalkotó vizsgálatok, elsőként a szívultrahang (8. ábra).

A sportszív kialakulása jelentősen függ a sportág és az edzések terhelési típusától. A szív adaptációja alapján jól megkülönböztetünk állóképességi és erő komponenst. Néhány korábbi vizsgálat a teljes szívizom tömeg és a maximális oxigén felvételi kapacitás között pozitív összefüggést írt le. A teljes szív térfogatot újabban a maximális teljesítmény egyik független jelzője sportolóknál és nem sportolóknál egyaránt (19). Állóképességi sportolóknál az intenzív edzőmunka a jobb kamrát arányában jobban terheli meg, mint a bal kamrát, ez azonban függ a sportág típusától is (20, 21).



**9. ábra** Sportszív kialakulását befolyásoló tényezők és a nitrogén monoxid szerepe

*Kék nyíl: hatással van rá, Piros szaggatott nyíl: befolyásolja a hatást*

A nitrogén monoxid, ahogy azt az előzőekben is láttuk, fontos kardiovaszkuláris regulátor molekula. Ismert, hogy befolyásolja a kóros szívizom átalakulást (pl. szívinfarktust). Az NO azonban nem csak a patológiás, hanem a fiziológias keringésadaptációt is modulálja. Befolyásolja ugyanis a tüdő-keringést, valamint a szívizom- és a vázizom funkcióját is. Az utóbbi években a sportszív kialakulásának vizsgálata a bal kamra adaptációja mellett a jobb kamra átalakulását is fókuszba állította és kiderült, hogy bizonyos állóképességi sportágak esetében a jobb kamra átalakulása lényegesen markánsabb, mint a szisztémás kamráé (21, 22). A nitrogén monoxid in vivo elsősorban a szívizom, a simaizmok és a harántcsíktolt izmok regulátor molekulája, amely befolyásolhatja a fizikai teljesítményt.

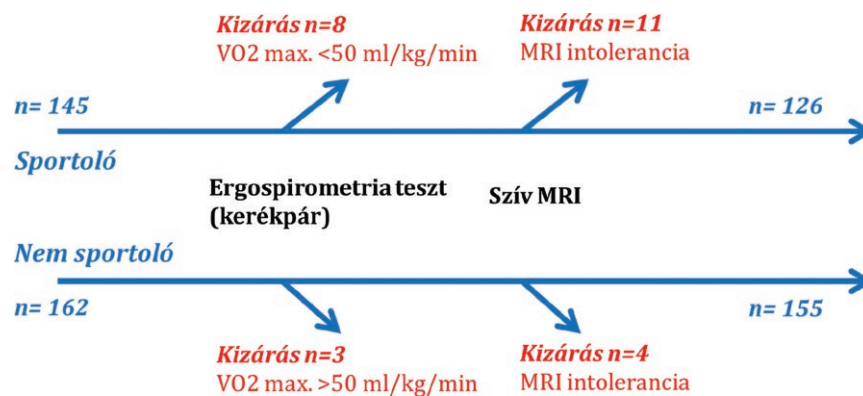
A nitrogén monoxid folyamatos termelődéséért felelős nitrogén monoxid szintetáz-3 (NOS-3) enzim genetikai variációit korábban főként betegség-rizikóval való összefüggésében vizsgálták. A 894 G/T variáns esetében, amely a 298-as kodonban Glu-Asp szubsztitúciót okoz, csökkent lokális nitrogén monoxid termelődéssel járhat.

Az „Asp” homozigótákat korábbi tanulmányok összefüggésbe hozták fokozott carotis artéria atherosclerosis, hipertóniával, iszkémiás szívbetegséggel (23), valamint dilatatív cardiomiopáthiával. A NOS-3 298 polimorfizmust ugyanakkor összefüggésben lehet a terheléssel is, hiszen „Asp” allél hordozókban szubmaximális terhelés mellett magasabb verővolumen és alacsonyabb pulzust észleltek edzett nőkben (24). Triatlon sportolóknál a „Glu” homozigóták esetében mértek rövidebb teljesítési időket, a nem-sportoló populációhoz képest azonban az eddigi tanulmányok nem találtak allélfrekvencia eltérést az élsportoló között (25).

Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy élsportolóknál az NO biológiai hozzáférhetőségét befolyásoló NOS-3 298 variancia összefüggésben lehet a sportszív morfológiájával, azon belül elsősorban a szívizom hipertrófiájával.

### 6.1. Vizsgálati protokoll és csoportok

Magasan kvalifikált magyar atlétákat (n=145) és hasonló etnikai valamint szociális háttérrel rendelkező, kor és nem szerint egyeztetett edzetlen embereket (n=162) vizsgáltunk.



10. ábra Vizsgálati csoportok és protokoll (26. ref. módosítva)

### 6.2. Teljesítménydiagnosztika és szív-MRI

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. 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 testfelszín a Mosteller formulával számoltuk ki.

### 6.3. DNS izolálás és genotipizálás

Proteáz alapú technikával teljes perifériás vérből genomialis 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.

## 6.4. Statisztikai analízis

A folyamatos változókat átlag $\pm$ SD, a kategórikus változókat n(%) formában tüntettük fel. A két csoport közötti összehasonlításokat t próbával és  $\chi^2$  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.

## 6.5. Vizsgált sportolók és kontroll egyének

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 nőkéét és az edzetlen személyekét. (3. táblázat)

**3. táblázat** A sportolók és edzetlen személyek jellemzői (26. ref módosítva)

	Sportolók		
	Összes (n=126)	Férfiak (n=94)	Nők (n=32)
Kor (év)	25.9 $\pm$ 5.5	26.9 $\pm$ 5.7	24.9 $\pm$ 5.3
Magasságt (m)	1.87 $\pm$ 0.11 *	1.95 $\pm$ 0.04 †	1.77 $\pm$ 0.07 ‡
Súly (kg)	85.2 $\pm$ 15.6 *	97.5 $\pm$ 8.3 †	72.3 $\pm$ 10.2 ‡
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 $\pm$ 2.6	25.8 $\pm$ 2.2	23.4 $\pm$ 2.5
BSA (m <sup>2</sup> )	2.18 $\pm$ 0.28 *	2.38 $\pm$ 0.1 †	1.89 $\pm$ 0.3 ‡
	Nem-sportolók		
	Összes (n=155)	Férfiak (n=109)	Nők (n=46)
Kor (év)	27.4 $\pm$ 5.2	27.1 $\pm$ 5.1	28.0 $\pm$ 5.7
Magasság (m)	1.76 $\pm$ 0.11	1.83 $\pm$ 0.07	1.67 $\pm$ 0.09
Súly (kg)	70.5 $\pm$ 15.3	81.4 $\pm$ 13.6	59.9 $\pm$ 7.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 $\pm$ 4.3	24.1 $\pm$ 4.6	21.6 $\pm$ 3.9
BSA (m <sup>2</sup> )	1.94 $\pm$ 0.3	2.08 $\pm$ 0.3	1.74 $\pm$ 0.2

\*  $p<0.01$  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. ( $p<0.05$ ).

## 6.6. 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 VO<sub>2</sub> 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.

## 6.7. 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.

**4. táblázat** A résztvevők szív-MRI paraméterei (26. ref. módosítva)

	Sportoló			Nem-sportoló		
	Összes	Férfi	Nő	Összes	Férfi	Nő
N	126	94	32	155	109	46
LVEF (%)	58.5±6.3	57.8±4.3	60.4±9.7	59.4±4.3	59.5±4.4	58.4±4.2
LVEDVi (ml/m <sup>2</sup> )	116.2±17.4 *	121.4±14.9 ‡	102.4±16.2	92.9±12.9	97.3±11.1 ‡	84.4±13.2
LVESVi (ml/m <sup>2</sup> )	48.8±11.2 *	51.4±9.6 ‡	41.9±12.1	37.8±7.6	39.5±7.3 ‡	35.4±8.0
LVMi (g/m <sup>2</sup> )	81.1±19.6 *	88.1±15.9 ‡	62.4±16.0	61.3±13.9	68.1±10.4 ‡	47.0±10.1
LVSVi (ml/m <sup>2</sup> )	67.6±8.3 *	69.8±8.1 ‡	61.6±5.6	54.8±7.8	57.8±6.8 ‡	49.0±6.8
RVEF (%)	57.9±6.2	57.1±4.0	60.2±9.9	58.5±4.8	58.2±4.9	58.2±4.4
RVEDVi (ml/m <sup>2</sup> )	121.5±19.6 *	127.8±17.4 ‡	106.0±17.3	95.5±15.2	100.7±14.1 ‡	85.7±13.4
RVESVi (ml/m <sup>2</sup> )	53.2±11.3 *	55.8±10.9 ‡	46.6±9.9	39.8±9.6	42.6±9.9 ‡	35.3±7.3
RVSVi (ml/m <sup>2</sup> )	68.2±10.2 *	70.7±9.5 ‡	61.5±9.2	56.7±7.0	58.3±6.4 ‡	52.4±7.7
RVMi (g/m <sup>2</sup> )	29.9±6.1 *	32.5±4.6 ‡	23.5±5.4	24.4±4.3	25.3±3.5 ‡	20.1±3.0

*n* – résztvevők száma; LV – bal kamrai, LVEF – LV ejekciós frakció; LVEDVi – LV vég-diasztolés térfogat index; LVESVi – LV vég-szisztolés térfogat index; LVMi – LV tömeg index; LVSVi – LV verőtér-fogat volume index; RV – jobb kamrai, RVEF – RV ejekciós frakció; RVEDVi – RV vég-diasztolés térfogat index; RVESVi – RV vég-szisztolés térfogat index; RVSVi – RV verőtér-fogat 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.

## 6.8. Szív morfológia és funkció összefüggése a genotípussal

A nyugalmi RVSVi ( $60 \pm 9$  vs.  $62 \pm 12$  ml/m<sup>2</sup>,  $p=0.047$ ) és RVMi ( $26 \pm 6$  vs.  $27 \pm 6$  g/m<sup>2</sup>,  $p=0.019$ ) a Glu homozigótákkal 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 homozigótáknál. ( $31.7 \pm 5.5$  vs.  $27.4 \pm 6.0$  g/m<sup>2</sup>,  $p<0.01$  és  $71.1 \pm 9.6$  vs.  $64.3 \pm 9.8$  ml/m<sup>2</sup>,  $p<0.001$ ).

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

**5. táblázat** Genotípusokhoz tartozó szív-MRI paraméterek (26. ref. módosítva)

	Sportolók (VO <sub>2</sub> max >50ml/kg/min)		Nem-sportolók (VO <sub>2</sub> max <50ml/kg/min)		P
	Glu/Glu	Glu/Asp + Asp/Asp	Glu/Glu	Glu/Asp + Asp/Asp	
N	64	62	84	71	-
LVEF (%)	58.3±8.1	58.7±4.5	59.1±2.4	60.0±6.7	0.688
LVEDVi (ml/m <sup>2</sup> )	115.1±20.5 *	117.0±14.9 *	92.1±14.6	94.4±9.3	<0.001
LVESVi (ml/m <sup>2</sup> )	49.2±13.3 *	48.5±9.3 *	37.8±7.8	37.9±7.6	<0.001
LVMi ( g/m <sup>2</sup> )	77.9±23.1 *	83.5±16.2 *	60.3±15.3	63.2±11.2	<0.001
LVSVi (ml/m <sup>2</sup> )	66.4±7.6 *	68.5±8.7 *	54.1±7.6	56.1±8.2	<0.001
RVEF (%)	57.7±8.1	58.1±4.4	58.3±4.1	58.4±5.8	0.427
RVEDVi (ml/m <sup>2</sup> )	117.8±19.9 *	124.4±19.1 *	95.6±17.6	95.4±9.8	<0.001
RVESVi (ml/m <sup>2</sup> )	53.0±10.5 *	53.4±12.1 *	40.4±11.0	38.7±6.5	<0.001
RVSVi (ml/m <sup>2</sup> )	64.3±9.8 #*	71.1±9.6 *	56.6±6.7	56.8±7.8	<0.001
RVMi ( g/m <sup>2</sup> )	27.4±6.0 #*	31.7±5.5 *	25.3±4.7	23.3±3.4	<0.001

*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 térfogat index; RVESVi – RV vég-szisztolés térfogat index; RVSVi – RV verőtér fogat index; RVMi – RV tömeg index  
 Variancia analízissel szignifikáns különbséget igazoltunk a vizsgált csoportok között. Post hoc teszttel verifikáltuk a sportolókban 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).

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Első vizsgálataim során a nitrogén monoxid kardiális hatásait tanulmányoztam iszkémia-reperfúziós során pre-klinikai állatmodelleken. A lokálisan a szívizomban megemelkedett NO-t az első vizsgálatokban szívizom géntranszfer segítségével értük el.

A második vizsgálati protokollban ugyancsak iszkémia-reperfúziós állatmodellben vizsgáltuk a gáz kardiális hatásait, ezúttal azonban inhalációs nitrogén monoxid kezelést alkalmaztunk, amit az NO biológiai hatásának felerősítését is hivatott foszfodieszteráz-5 gátló tadalafil per os kezelésével egészítettünk ki.

A harmadik vizsgálati programban klinikai vizsgálat történt, egészséges élsportolóknál vizsgáltuk a nitrogén monoxid szintetáz-3 egyik genetikai varianciájának összefüggését a sportszív morfológiájával, elsősorban a jobb kamrával.

A nitrogén monoxid a pre-klinikai iszkémia-reperfúziós modellekben egyértelműen kardioprotektív hatással bírt. A géntranszferrel kezelt állatokban a szöveti NO koncentráció emelése az NO-val nem kezelt állatokhoz képest kisebb méretű infarktusz károsodást okozott, csökkentette a lokális leukocita infiltrációt, az apoptózist, valamint átmenetileg javította a bal kamra funkciót is.

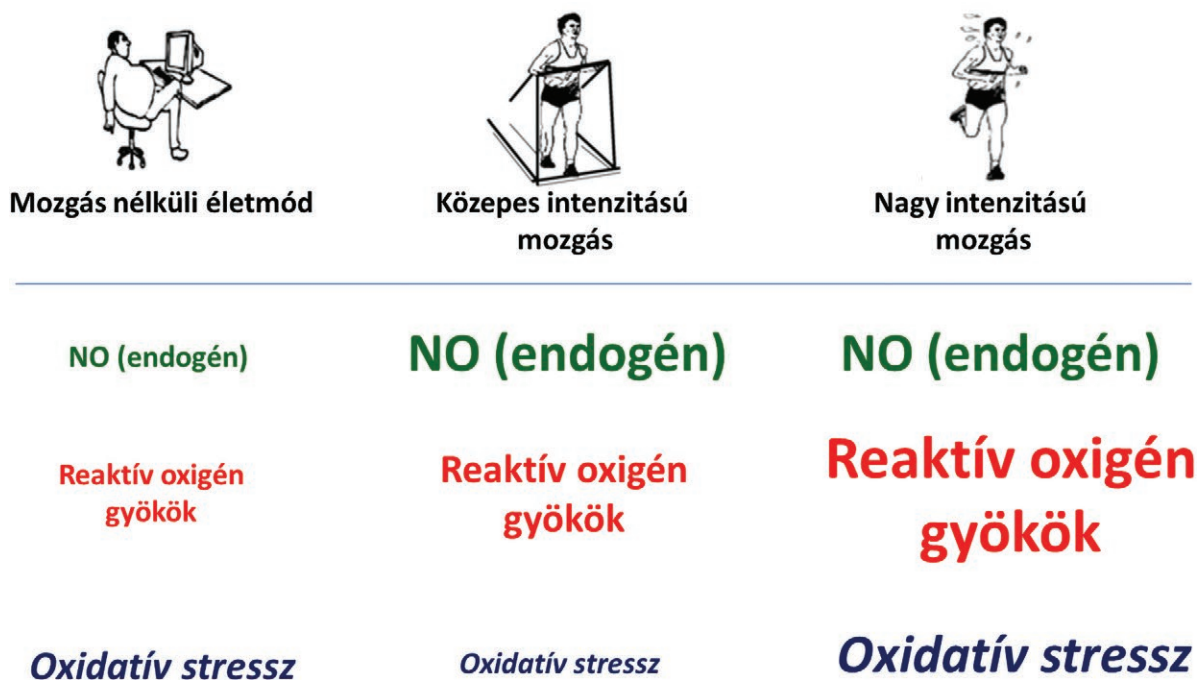
Az inhalációs NO-val kezelt állatokban ugyancsak kardioprotektív hatást igazoltunk, ami tadalafilt kombinálása mellett tovább javult. A kombinált kezelés a mono-terápiákhoz képest mérsékelte az akut szakban mérhető troponin kiáramlást és gyulladást okozó beszűrődést. Az inhalált NO és a kombinált kezelés is csökkentette a bal kamra tágulatát és megőrizte a regionális balkamra funkciót. Invaszív nyomásméréseink az iNO+TAD kezelt csoportban igazolták az összehúzóerő teljesítmény fokozódását és a verőtér fogat 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.

Harmadik, klinikai vizsgálati programunkban élsportolók szív MRI vizsgálatát végeztük el. A sportolói fiziológiás kardiális adaptáció és a kóros szívizombetegségek elkülönítése a sportkardiológiai diagnosztika egyik legfontosabb kérdése (27). Ebben a programban az ergo-spirometriával elvégzett teljesítménydiagnosztikai vizsgálat az élsportoló és a kontroll csoport egyértelmű elkülönítését célozta meg. Fehérvérsejtekből meghatározásra került a nitrogén monoxid szívizomban való termelődéséért felelős legfontosabb gén, a NOS-3 egyik genetikai varianciája (Glu298Asp).

A nitrogén monoxid hatásai nem csak patológiás körülmények között mutatkoznak meg, hanem fiziológiás adaptáció során is fontos szerepet kapnak. A fizikai aktivitás javítja az endogén nitrogén monoxid biológiai hozzáférhetőségét, ami fokozott szabadgyök kötő hatása révén befolyásolja a felszabaduló oxigén szabadgyökök hatását és az oxidatív stressz mértékét. A nagy intenzitású, főként állóképességi sporttevékenység fokozza a reaktív oxigéngyökök termelését (11. ábra).



A rendszeres, fokozott intenzitású sport mellett kialakuló keringési adaptáció mértékét befolyásolni képes a nitrogén monoxid biológiai hozzáférhetősége. Mivel az NO legfontosabb in vivo forrásának számító NOS-3 enzim genetikai varianciái befolyásolják az NO biológiai hozzáférhetőségét és a kardiovaszkuláris remodelációt (19), ezáltal azt feltételeztük, hogy ezek hatással lehetnek a sportszív kialakulásának mértékére.



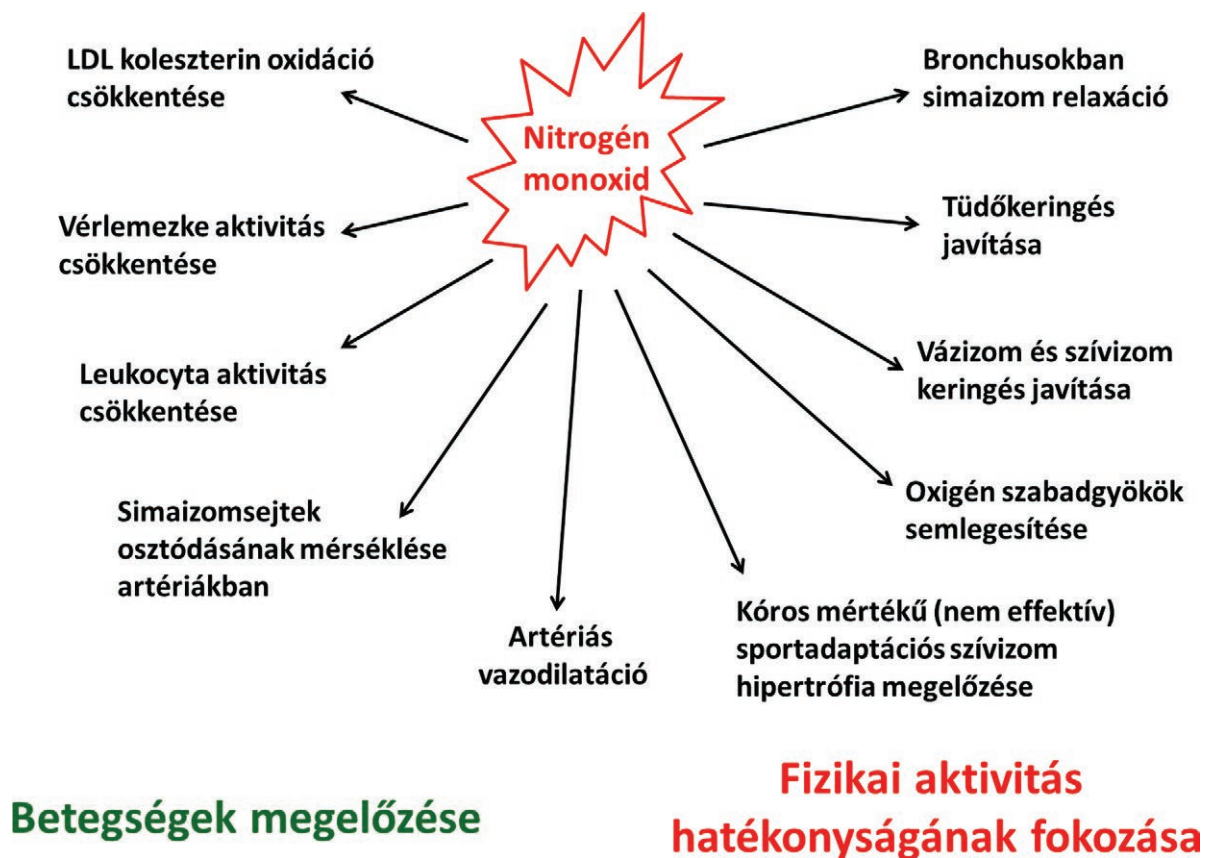
**11. ábra** A különböző fizikai aktivitási szintek mellett kialakuló endogén nitrogén monoxid és reaktív oxigén gyökök (ROS) szintje és az oxidatív stressz mértéke a szervezetben

*A különböző betűméretek a fizikai aktivitás csoportok közötti relatív mértékeket jelölik.*

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. A jobb kamrai testfelszínre számított relatív verővolumen és jobb kamrai szívizom tömeg Asp allélt hordozó sportolóknak magasabbnak mutatkozott, mint Glu homozigóta élsportolóknak. 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.

A nitrogén monoxid jelátviteli mechanizmusai tehát jelentősen befolyásolják mind a kóros, mind pedig a fizioológias kardiális átalakulásokat. A nitrogén monoxid, mint terápiás lehetőség, azonban számos buktatót rejt magában, hiszen az NO biológiai hozzáférhetőségét a valóságban nehéz javítani. Az inhalációs NO jelenleg a leginkább alkalmas terápiás eszköz ezen a téren. Akut szívinfarktuszban szenvedő betegekben már zajlanak vizsgálataink arra vonatkozóan, hogy inhalációs NO terápia milyen körülmények között képes mérsékelni szívkárosodást (NOMI vizsgálat,

ClinicalTrials.gov identifier: NCT00568061). Sportolókban a genetikai varianciák diagnosztikája segítséget nyújthat az adott személy nyugalmi keringésadaptációjának megértéséhez, mivel a NOS-3 genetikai varianciák befolyásolhatják a keringésadaptációt. A vizsgálatunkban azt láttuk, hogy az NO biológiai hozzáférhetőségét csökkentő allél jelenléte nagyobb jobb kamrai szívműködés eredményezett, magasabb vérőlvolumen mellett. Ez a megfigyelés egyébként egybevág a korábbi pre-klinikai eredményekkel, amelyek mérsékelt myocardium hipertrófiát írtak le az NO hatás fokozódása mellett. A nyugalmi mérések során tehát vélhetően azt látjuk, hogy az NO mérsékelni képes a fokozott (kóros) sport-adaptációs hipertrófiát. A nyugalmi vérőlvolumen párhuzamos emelkedésének megértése további, főként terhelés során vizsgálandó képalkotó vizsgálatokat tesz szükségessé. A genetikai varianciák összefüggésben lehetnek a sportolói állóképességgel is és ezért a későbbiekben akár a sportági kiválasztásban is szerepe lehet. Ennek eldöntésére azonban nagyszámú sportoló keresztmetszeti vizsgálata, majd rendszeres után követése szükséges.



12. ábra A nitrogén monoxid hatásai a betegségek megelőzésében és a fizikai aktivitás során

## 8. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Brunner F, Maier R, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B (2003) Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovascular research* 57:55-62
2. Carden DL and Granger DN (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190:255–266.
3. Claessen G, Claus P, Ghysels S, Vermeersch P, Dymarkowski S, LA Gerche A, et al. Right Ventricular Fatigue Developing during Endurance Exercise: An Exercise Cardiac Magnetic Resonance Study. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46: 1717–1726. doi:10.1249/MSS.0000000000000282
4. Fraccarollo D, Widder JD, Galuppo P, Thum T, Tsikas D, Hoffmann M, Ruetten H, Ertl G, Bauersachs J (2008) Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction. *Circulation* 118:818-827
5. Garcia-Dorado D, Agullo L, Sartorio CL, Ruiz-Meana M (2009) Myocardial protection against reperfusion injury: The cGMP pathway. *Thrombosis and haemostasis* 101:635-642
6. Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, and Guazzi MD (2011) PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail* 4:8–17.
7. Hand BD, McCole SD, Brown MD, Park JJ, Ferrell RE, Huberty A, et al. NOS3 gene polymorphisms and exercise hemodynamics in postmenopausal women. *Int J Sports Med.* 2006;27: 951–958. doi:10.1055/s-2006-923901
8. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999;100: 1515–1520.
9. Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD (2004) Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res* 94:1256-1262
10. Kupatt C, Hinkel R, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Raake P, El Aouni C, Thein E, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P (2007) Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* 49:1575-1584
11. LA Gerche A, Heidbüchel H, Burns AT, Mooney DJ, Taylor AJ, Pflüger HB, et al. Disproportionate Exercise Load and Remodeling of the Athlete's Right Ventricle. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43: 974–981. doi:10.1249/MSS.0b013e31820607a3
12. Liu X, Huang Y, Pokreisz P, Vermeersch P, Marsboom G, Swinnen M, Verbeken E, Santos J, Pellens M, Gillijns H, Van de Werf F, Bloch KD, Janssens S (2007) Nitric oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology* 50:808-817
13. Lukowski R, Krieg T, Rybalkin SD, Beavo J, and Hofmann F (2014) Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 35:404–413.
14. Lux A, Pokreisz P, Swinnen M, Caluwe E, Gillijns H, Szelid Z, Merkely B, Janssens SP.

- Concomitant Phosphodiesterase 5 Inhibition Enhances Myocardial Protection by Inhaled Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Feb;356(2):284-92. doi: 10.1124/jpet.115.227850. Epub 2015 Nov 30.
15. Maron BJ, Maron BA. Revisiting athlete's heart versus pathologic hypertrophy: ARVC and the right ventricle. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2017 Apr; 10(4):394-397.
  16. Nagasaka Y, Fernandez BO, Garcia-Saura MF, Petersen B, Ichinose F, Bloch KD, Feelisch M, and Zapol WM (2008) Brief periods of nitric oxide inhalation protect against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 109:675–682.
  17. Perseghin G, De Cobelli F, Esposito A, Lattuada G, Terruzzi I, La Torre A et al. Effect of the sporting discipline on the right and left ventricular morphology and function of elite male track runners: a magnetic resonance imaging and phosphorus 31 spectroscopy study. *Am Heart J.* 2007; 154: 937-942.
  18. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, LeWinter MM, Rouleau JL, Bull DA, and Mann DL, et al.; RELAX Trial (2013) Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* 309: 1268–1277.
  19. Scharang J, Schneider G, Urhausen A, Rochette V, Kramann B, Kindermann W. Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 1856-1863.
  20. Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, Schoepf UJ, Uder M, Lell MM. Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J.* 2010; 159: 911–918. doi:10.1016/j.ahj.2010.02.027
  21. Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, Schoepf UJ, Uder M, Lell MM. Cardiac magnetic resonance assessment of the left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J.* 2010; 159: 911-918.
  22. Sesti C, Florio V, Johnson EG, and Kloner RA (2007) The phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil reduces myocardial infarct size. *Int J Impot Res* 19:55–61.
  23. Steding K, Engblom H, Buhre T, Carlsson M, Mosén H, Wohlfahrt B, et al. Relation between cardiac dimensions and peak oxygen uptake. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010; 12:8.
  24. Szelid Zs., Pokreisz P., Liu X, Vermeersch P, Marsboom G, Gillijns H, Pellens M, Verbeken E, Van de Werf F, Collen D, Janssens SP. Cardiospecific Nitric Oxide Synthase 3 Gene Transfer Protects against Myocardial Reperfusion Injury. *Basic Research in Cardiology* 2010 Mar;105(2):169-79.
  25. Szelid Zs., Sinnaeve P., Vermeersch P., Gillijns H, Pellens M., Laurysens V., Van Pelt N., Flammeng W., Sergeant P., Herijgers P., Pokreisz P., Van Zonneveld A.-J., Verbeken E., Collen D., Janssens S. Preexisting Anti-Adenoviral Immunity and Regional Myocardial Gene Transfer: Modulation by Nitric Oxide, Human Gene Therapy, 2002, Vol. 13, #18, p. 2185-95.
  26. Szelid Z, Lux Á, Kolossváry M, Tóth A, Vágó H, Lendvai Z, Kiss L, Maurovich-Horvat P, Bagyura Z, Merkely B. Right Ventricular Adaptation Is Associated with the Glu298Asp Variant of the NOS3 Gene in Elite Athletes. *PLoS One.* 2015 Oct 30;10(10):e0141680. doi: 10.1371/journal.pone.0141680. eCollection 2015.
  27. Wolfarth B, Rankinen T, Mühlbauer S, Ducke M, Rauramaa R, Boulay MR, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and elite endurance athlete status: the Genathlete study. *Scand J Med Sci Sports.* 2008;18: 485–490. doi:10.1111/j.1600-0838.2007.00717.x

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki azoknak, akik szakmai utamon eddig segítettek. Mindenekelőtt édesapámnak, dr. Szelid Zsolt Péternek, aki az orvosi pályaválasztásomat motiválta. Köszönöm a sok támogatást családomnak.

A kardiológiai szakma rejtelmeiben először kutatóként dr. Szilárd Mónika, majd egykori főnököm, Janssens Stefan professzor úr segített sokat. A kardiológiai klinikai szemléletem alakításában elsőként dr. Polák Gyula és dr. Dékány Péter főorvos urak támogattak. A komplex kardiológiai kutatási-oktatási és gyógyítói szemléletem kialakításában, valamint sport-kardiológiai módszertan elsajátítása terén Merkely Béla professzor úrnak és a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika munkatársainak tartozom köszönettel.

Annak érdekében, hogy ne csüggedjek, vagy vesszek el a kardiológiai kutatásban, a sporttudományban és a gyakorlati sporttal kapcsolatos orvosi tevékenységben, jó barátaimat: dr. Pokreisz Pétert, dr. Soós Pált, dr. Bagyura Zsoltot, Sziva Ágneszt és dr. Pánics Gergelyt illeti a köszönet.

Köszönöm továbbá a Testnevelési Egyetemnek, hogy befogadott szakmai közösségébe.





