

**Rezveratrollal végzett saját kezdeményezésű
humán klinikai vizsgálat eredményeinek elemzése
csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó
szívelégtelenségben**



Ph.D. értekezés

Szerző: Dr. Gál Roland

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Kísérletes Kardiológia program

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán
Témavezetők: Prof. Dr. Halmosi Róbert
Dr. Habon Tamás

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécs

2021

I. Tartalomjegyzék

I.	Tartalomjegyzék	1
II.	Rövidítések jegyzéke	3
III.	Bevezetés	5
1.	Szívelégtelenség	5
1.1.	Definíció és klasszifikáció	5
1.2.	Etiológia	5
1.3.	Epidemiológia, prognózis.....	6
1.4.	A szívelégtelenség patofiziológiája.....	6
1.5.	A szívelégtelenség gyógyszeres kezelése	8
1.6.	Új terápiás lehetőségek szívelégtelenségben.....	9
2.	Rezveratrol.....	9
2.1.	Rezveratrol és kardiovaszkuláris hatásai.....	9
2.2.	Rezveratrol és a szívelégtelenség.....	11
3.	Hemoreológia	11
3.1.	Hemoreológiai paraméterek	12
3.2.	Hemoreológiai változások szívelégtelenségben.....	12
IV.	Célkitűzések	14
V.	Eszközök és Módszerek	15
1.	A tanulmány felépítése, a vizsgált betegpopuláció jellemzői.....	15
2.	Beválasztási és kizárási kritériumok.....	16
3.	A betegek epidemiológiai jellemzői	17
4.	Az elvégzett vizsgálatok ütemezése	19
5.	Statisztikai analízis	20
6.	Vizsgálati módszerek.....	20
6.1.	Vérnyomásmérés, testsúly meghatározás.....	20
6.2.	Vérvétel, labordiagnosztika.....	20
6.3.	Szívultrahang vizsgálat	21
6.4.	Terhelhetőség vizsgálata (6 perces járásteszt)	21
6.5.	Légzésfunkciós vizsgálat.....	22
6.6.	Életminőség kérdőív.....	22
6.7.	mRNS izolálás, mRNS szekvencia katalógizálása és RNS szekvenálás	23
6.8.	RNS szekvenálás adatainak feldolgozása és elemzése	24
6.9.	Hemoreológiai mérések.....	24
6.9.1.	Vérvétel	24

6.9.2. A vizsgálat hemoreológiai paraméterek	24
6.9.3. Hematokrit meghatározás.....	24
6.9.4. Plazma és teljes vér viszkozitás mérése	25
6.9.5. Vörösvértest aggregáció mérése.....	25
6.9.6. Vörösvértest deformabilitás mérése	26
VI. Eredmények	27
1. A rezveratrol hatásai a vizsgált laboratóriumi paraméterekre	27
2. A gyulladásos paraméterek változása rezveratrol kezelés mellett.....	29
3. A szívelégtelenség specifikus biomarkereinek változása rezveratrol kezelés mellett.....	29
4. A BMI, a vérnyomás, a szívfrekvencia és az EKG paramétereinek változása rezveratrol kezelés hatására.	30
5. A rezveratrol hatása az echokardiográfiás paraméterekre	31
6. A rezveratrol hatása a betegek terhelhetőségére.....	34
7. A légzésfunkciós paraméterek változásai rezveratrol kezelés mellett.....	35
8. A rezveratrol hatása a szívelégtelen betegek életminőségére.....	35
9. Szekvencia analízis és a differenciál expresszió eredményei.....	36
10. Hemoreológiai változások rezveratrol kezelés hatására.....	37
10.1. Hemoreológiai paraméterek	37
10.2. A hemoreológiai paraméterek változása és a 6 perces járástávolság közötti összefüggések	39
VII. Diskusszió	41
1. A rezveratrol javítja a szívelégtelen betegek kardiális paramétereit a gyulladásos folyamatok mérséklésén keresztül.....	41
2. Hemoreológiai változások rezveratrol kezelés során csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenségben.....	45
VIII. Következtetések	48
IX. Új eredmények	49
X. Köszönetnyilvánítás.....	50
XI. Irodalomjegyzék	51
XII. Saját közlemények	61
1. A disszertáció témakörében publikált teljes közlemények.....	61
2. Egyéb teljes közlemények	61
3. Publikált absztraktok és poszterek.....	63

II. Rövidítések jegyzéke

A	késődiasztolés kamrai telődési sebesség
ACE	angiotenzin-konvertáló enzim
AI	aggregációs index
AMP	adenozin-monofoszfát
ARB	angiotenzin receptor-blokkoló
ARNI	angiotenzin receptor/neprilizin inhibitor
ATP	adenozin-trifoszfát
BMI	testtömegindex
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
COX	ciklooxygenáz
CRP	C-reaktív protein
CRT	kardiális reszinkronizációs terápia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
E	koradiasztolés kamrai telődési sebesség
e'	mitrális annulusz koradiasztolés elmozdulási sebessége
EF	ejekciós frakció
eGFR	becsült glomeruláris filtrációs ráta
EI	elongációs index
EKG	elektrokardiográfia
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
ESC	Európai Kardiológusok Társasága
FEV ₁	forszírozott kilégzési térfogat
FVC	forszírozott vitálkapacitás
GLS	globális longitudinális strain (rövidülés)
GOT	glutamát-oxálacetát-transzamináz
GPT	glutamát-piruvát-transzamináz
HDL	nagy denzitású lipoprotein
HFrEF	csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség
Htc	hematokrit
ICD	implantálható kardioverter defibrillátor
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IVC	inspiratórikus vitálkapacitás
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
LORCA	lézer asszisztált optikai rotációs sejt analízátor
M	Myrenne aggregációs index
MRA	mineralokortikoid-receptor antagonist
mRNS	hírvivő ("messenger") ribonukleinsav
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	nitrogén-monoxid
NT-proBNP	B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja
NYHA	szívelégtelenség funkcionális beosztása (I-IV)
Pa	pascal
PARP-1	poli (ADP-ribóz) polimeráz-1
PV	plazma viszkozitás

RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RES	rezveratrol
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
TAPSE	trikuszipidális annulusz szisztolé alatti kitérése
TNF	tumor nekrozis faktor
$t_{1/2}$	aggregációs féleletidő
VV	teljes vér viszkozitás
vvt	vörösvértest
6MWT	6 perces járásteszt
γ (gamma)	küszöb nyírási sebességgrádiens

III. Bevezetés

1. Szívelégtelenség

1.1. Definíció és klasszifikáció

Az Európai Kardiológusok Társasága (ESC) definíciója alapján a szívelégtelenség a szív olyan funkcionális vagy strukturális károsodása, amely elégtelenné teszi a szív szöveti igényeknek megfelelő oxigén szállítását, illetve csak emelkedett töltőnyomás révén képes kielégíteni azt. A klinikai definíció alapján a szívelégtelenség egy olyan szindróma, melyben a betegek típusos tünetei és az észlelhető fizikális eltérések a szív strukturális vagy funkcionális károsodása révén alakulnak ki [1].

A hagyományos terminológia alapján a szívelégtelenség meghatározása az ejekciós frakció (EF) mérésén alapul. Az EF a verővolumen (amely a végdiasztolés volumen és a végszisztolés volumen különbsége) és a végdiasztolés volumen hányadosa. Az EF nemcsak prognosztikus téren fontos tényezője a szívelégtelenségnek, hanem a pontos klinikai diagnózis felállításához és a terápia megválasztásához is nélkülözhetetlen.

A szívelégtelenség az EF alapján 3 nagy csoportra osztható: csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFrEF, EF<40%), mérsékelten csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFmrEF, EF: 40-49%) és megtartott szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFpEF, EF≥50%) [1].

A fentiekben túl a klinikai tünetek alapján történő osztályozásnak kiemelt szerepe van a terápiás hatékonyság lemerésében és a prognózisbecslésben. A NYHA funkcionális osztályozás a leginkább elterjedt klasszifikáció erre a célra. Az NYHA I-IV. közötti besorolás alapján gyors képet kapunk a beteg klinikai állapotáról, annak idő függvényében bekövetkező változásairól, emellett követhetjük a terápiánkra adott klinikai választ is [2].

1.2. Etiológia

A szívelégtelenség leggyakoribb etiológiai tényezőinek mind a férfiak, mind a nők körében a hipertónia és a koszorúér-betegség tekinthető, azonban számos egyéb kórkép is állhat a háttérben, melyek közül kiemelendő a billentyű betegségek, a infekciók, a toxikus ágensek (pl. alkohol abúzus), a kemoterápiás szerek (pl. antraciklin származékok) vagy

éppen a súlyos metabolikus rendellenességek okozta miokardiális károsodás. A szisztolés típusú szívelégtelenség mintegy 20%-ában morfológiai vagy környezeti faktor nem azonosítható a háttérben, ezekben az esetekben gyakran genetikai eltérések magyarázzák a betegség kialakulását (kardiomiopátiák) [3].

1.3. Epidemiológia, prognózis

A szívelégtelenség a kardiovaszkuláris halálozás egyik meghatározó tényezője, prevalenciája világszerte emelkedő tendenciát mutat. A növekvő prevalencia és incidencia hatására folyamatosan emelkedik hospitalizációs arány, valamint a szívelégtelenséggel összefüggő halálozás, és mindez jelentős ellátási költségeket ró az egészségügyre és az országok költségvetésére. A fejlett társadalmakban a felnőtt lakosság 1-2%-a szenved szívelégtelenségben, de 70 év felett az előfordulása már eléri a 10%-ot. Az évente diagnosztizált új esetek száma 1-5/1000 lakosra tehető, mely a statisztikák alapján évtizedenként megduplázódik. Érdekes adat, hogy egy 40 éves felnőttnek 20% az esélye, hogy élete folyamán szívelégtelensége alakuljon ki. Elemzések alapján a jelenleg az összes kórházi felvétel 5%-a szívelégtelenség miatt következik be [4,5].

Habár számos adat mutatja az utóbbi években a HFrEF prognózisának enyhe javulását, előrehaladott állapotban a betegség mortalitása még mindig meghaladja egyes daganat típusok halálozását (pl. hólyag-, emlő-, méh-, illetve prostatatumor). Számos európai klinikai vizsgálat alapján kijelenthető, hogy a betegség NYHA IV. stádiumában az 1 éves átlagos túlélés még ma is kevesebb mint 50%. Nemek tekintetében az összesített adatokat elemezve a nők prognózisa kedvezőbb [1,6].

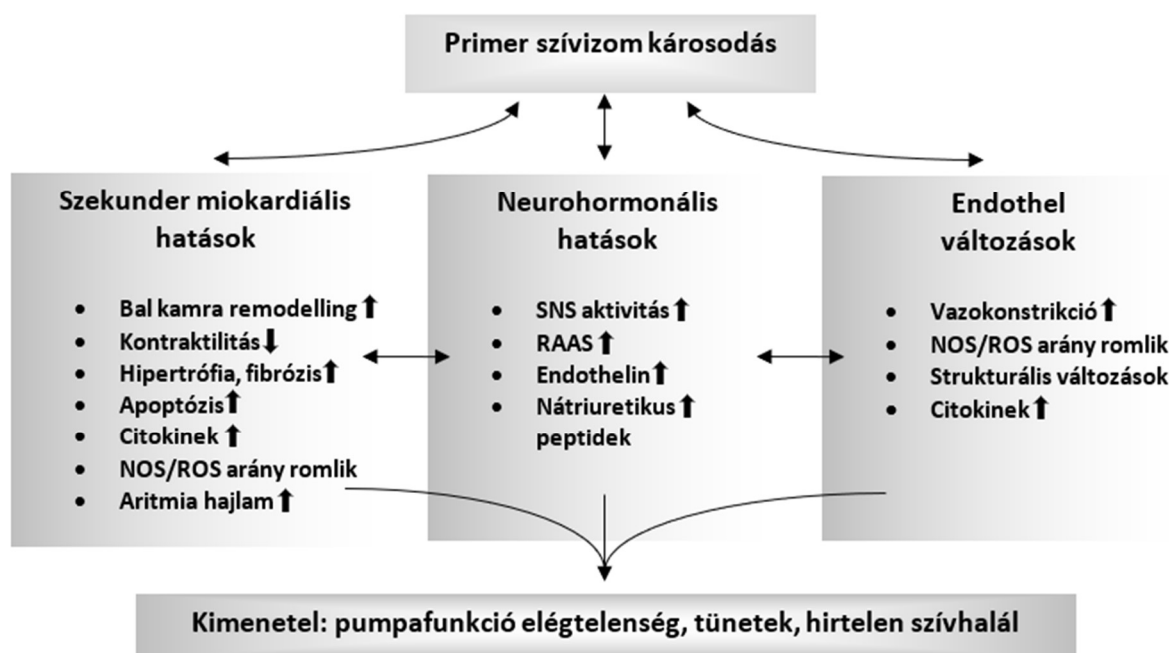
1.4. A szívelégtelenség patofiziológiája

A szívelégtelenséget bármely olyan tényező kiválthatja, amely csökkenti a szívműködésének hatékonyságát annak direkt károsítása vagy a szív fokozott megterhelése révén (volumen vagy nyomás). A szívelégtelenség általában a pumpafunkciót károsító úgynevezett „index” eseményt követően jelentkezik először (pl. vérnyomáskiugrás, iszkémiás esemény, infekció, ritmuszavar). A pumpafunkció iniciális károsodását követően számos kompenzatórikus mechanizmus aktiválódik, ezek közé tartozik a szimpatikus (adrenerg) idegrendszer, a RAAS és egyes hormonális ágensek (agyi nátriuretikus peptid). Rövidtávon ezek a rendszerek képesek ellensúlyozni a károsodást, fenntartani a

pumpafunkciót, ezért ekkor még a beteg tünetmentes maradhat. Idővel azonban ezen mechanizmusok hosszas aktivációja úgynevezett másodlagos szervkárosodást idéz elő, a kialakuló bal kamrai kóros remodelling pedig a betegség progresszióját vonja maga után. A fent leírt folyamatok eredményeként a betegnél a kezdetben észlelt tünetmentes állapot lassan megszűnik, a szívelégtelenség már tüneteket is okoz. A magas szimpatikus aktivitás deszenzibilizálja a β -adrenerg receptorokat (β -AR), fokozza a miociták hipertrófiáját, nekrozisát, apoptózisát, valamint intersticiális fibrózishoz vezet a szívben. A vesében artériás és vénás vazokonstriktiót idéz elő, tovább növeli a RAAS aktivációt, ezáltal só és víz retenciót okoz, mellyel ellensúlyozza a nátriuretikus peptidek hatását [7].

A fent ismertetett folyamatokon túl kísérletes és klinikai vizsgálatok sora igazolta a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) szerepét a szívelégtelenség kialakulásában. Az oxigén-szabadgyökök direkt módon károsítják a kontraktilitást, továbbá a hipertrófiában szerepet játszó jelátviteli és transzkripciós faktorok aktivitására is jelentős hatással bírnak, fokozzák az apoptózist, emellett növelik a fibroblasztok proliferációját és aktiválják a mátrix metalloproteinázokat. Ráadásul a nukleáris PARP-1 aktiválásán keresztül a ROS-ek rontják a mitokondriumok energia termelését, ezáltal promotálják a sejthalált és fokozzák a gyulladós folyamatokat (pl. citokinek termelődését). Mindezek a mechanizmusok szintén maladaptív hipertrófiához (kóros remodelling) és szívelégtelenséghez vezetnek [8,9].

Összefoglalva elmondható, hogy a szívelégtelenség egy szisztémás, multifaktoriális állapotnak tekinthető, melyben komplex strukturális, neurohormonális, sejtszintű és molekuláris változások együttesen vezetnek a szimpatikus aktivitás fokozódásához, a keringési redisztribúcióhoz, a folyadék volumen túltöltöttséghez, ezen folyamatok pedig végül a klinikai tünetek és a fizikális eltérések megjelenéséhez vezetnek (1. ábra) [10].



1. ábra. A. szívelégtelenség patofiziológiája. NOS: nitrogén-monoxid szintáz, RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer, ROS: reaktív oxigén szabadgyök, SNS: szimpatikus idegrendszer.

1.5. A szívelégtelenség gyógyszeres kezelése

A betegség gyógyszeres terápiája szempontjából keményvégpontú klinikai vizsgálatokkal igazolt hatékony kezeléssel csak HF_rEF tekintetében rendelkezünk, a HF_mrEF és HF_pEF populációban a nagy áttörés még várat magára. A jelenleg érvényben lévő ajánlások értelmében a krónikus szívelégtelen betegek gyógyszeres kezelésének alapját azok a hatóanyagok alkotják, melyek igazoltan csökkentik a betegség mortalitását, javítják az életminőséget és csökkentik a hospitalizációk számát. Ismereteink alapján a kezelés legfontosabb sarokkövei közé a béta-blokkolók, a neurohumorális gátlószerek (ACE-inhibitorok/ARB-k/ARNI) és az MRA-k tartoznak, emellett bizonyos esetekben elfogadott indikációval rendelkeznek az ivabradin is [1, 11-15]. Az utóbbi évek nagy sikertörténetének tekinthető az SGLT2-gátlók megjelenése a terápiás palettán, melyek várhatóan a jelenleg alkalmazott standard kezelés mellett komoly szintű evidenciával fognak megjelenni az idei évben várható ESC szívelégtelenség ajánlásban [16,17].

Tüneti kezelés tekintetében mindenképpen meg kell említeni a diuretikumokat (kacs-diuretikumok, tiazidok), válogatott esetekben a digoxin alkalmazását, valamint a

hidralazin/izoszorbid dinitrát kombinációját, bár ezek kapcsán jól ismert, hogy a prognózist érdemben nem befolyásolják [1].

A gyógyszeres kezelésen felül nem szabad megfeledkeznünk a szívelégtelenség eszközös, intervenciós és sebészi kezelési modalitásairól, illetve ultimium refugiumként a szívtranszplantációról sem, ezek részletezésétől azonban eltekintenek [1].

1.6. Új terápiás lehetőségek szívelégtelenségben

Bár az ismertett hatóanyagok legtöbbje mellett szignifikánsan javult a betegek mortalitása HFrEF-ben, a betegség hosszú távú kimenetele továbbra is rossznak tekinthető [1,5,11-15], így mindenképpen szükséges további, új terápiás lehetőségek feltárása. A jelenleg vizsgálat alatt álló, újonnan alkalmazott molekulák mind az állatkísérletes, mind a humán klinikai vizsgálatokban többek között olyan támadáspontokon keresztül fejtik ki hatásukat, mint a miokardiális kontraktilitás (pl. omecantiv mecarbil) [18], a citokinek (pl. anti-TNF α), a miokardiális metabolizmus (pl. perhexiline), vagy éppen az oxidatív stressz [19,20], melyek összességében ígéretes, alternatív megközelítései lehetnek a szívelégtelenség jövőbeni terápiájának. Biztató eredmények láttak napvilágot a 2020-as évben a solubilis guanil cikláz (sGC) stimulátorok (cGMP indukálta vazorelaxáció) közé sorolt vericiguat-tal is [21].

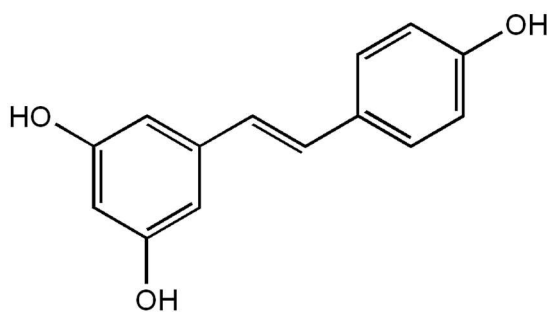
2. Rezveratrol

2.1. Rezveratrol és kardiovaszkuláris hatásai

Francia paradoxonként vált ismertté az a megfigyelés, mely szerint a francia populáció körében jóval alacsonyabb a szív- és érrendszeri betegségek előfordulása összehasonlítva más hasonló fejlettségű és rizikóprofillal rendelkező országokkal. Tudományos körökben a jelenséget leginkább a franciák nagyobb arányú vörösbor fogyasztásával magyarázzák [22].

A vörösbor nagy mennyiségben tartalmaz polifenol vegyületeket (pl. rezveratrol, katechin, kvercetin), a kardioprotektív hatásért azonban elsősorban a vörösbor rezveratrol (RES) tartalmát teszik felelőssé. A RES (3,5,4'-trihydroxystilbene) egy non-flavonoid polifenol, egy természetes fitoalexin, mely sokféle növényben (pl. szőlő, mogyoró, áfonya) fellelhető és az őket ért környezeti stressz hatására termelődik [23]. Két fő kémiai

konformációja (cisz- és transz-rezveratrol) közül a transz-rezveratrol tekinthető a biológiailag aktív formának (2. ábra). A RES kardioprotektív hatásának hátterében számos mechanizmus állhat, melyek közül mindenképpen fontos kiemelni az oxidatív stressz mérséklését, a gyulladással és hipertrófiát indukáló jelátviteli szignálok blokkolását, valamint a kalcium anyagcsere javítását [24-28].



2. ábra. A transz-rezveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) kémiai szerkezete.

Az elmúlt évtizedekben számos vizsgálattal igazolták, hogy az oxidatív stressz során termelődő ROS fontos szerepet játszanak különböző kardiális patológiás folyamatok kialakulásában, mely közül kiemelendő az iszkémia-reperfúziós károsodás, a kóros remodelling jelensége és a szívelégtelenség [8,29]. Sejtkultúrák és állatkísérletes modellek során emellett az is bebizonyosodott, hogy a RES kifejezett védő szereppel bír az oxidatív stresszel szemben, mely elsősorban gyökfogó hatásának tulajdonítható. [30-33]. A gyökfogó tulajdonságán felül a RES más útvonalakon keresztül is ki tudja fejteni antioxidáns hatását. A RES a NAD⁺-dependens histon/protein deacetyláz sirtuin 1 (SIRT 1 gén kódolja) és az AMPK (AMP aktivált protein kináz) aktiválása révén pozitívan befolyásolja a mitokondriális biogenezist kardiomiocitákban, mely az oxidatív foszforiláció gyorsulásához és nagy energiájú foszfátok (kreatin-foszfát, ATP) fokozott termelődéséhez vezet. A fentiek eredményeként hatékonyabb védelem alakul ki az oxidatív stresszel szemben a szívizom sejtekben, valamint fokozódik a kontraktilitás [27,28,34]. Az endoteliális és vaszkuláris funkciók szintén javulást mutatnak RES kezelés mellett, melynek hátterében a koleszterin és triglicerid szintek csökkenése, az endoteliális NO szintáz aktivációjának fokozódása és az emelkedő NO (értágító hatás) szint éppúgy szerepet játszik, mint a RES jelentős gyulladáscsökkentő hatása [35-38].

A fenti hatásmechanizmusok felelősek elsősorban azért, hogy számos állatkísérletes vizsgálat igazolta a RES kedvező hatásait olyan patológiás folyamatokban, mint a miokardiális iszkémia, a miokarditisz, a kardiális hipertrófia és remodelling, valamint a szívelégtelenség [25,39-41].

2.2. Rezveratrol és a szívelégtelenség

Szisztolés szívelégtelenségben a szívmusclek kontraktilitása csökken, emellett krónikus, enyhe fokú gyulladás is jelen van, mely tovább súlyosbítja a meglévő szívelégtelenséget. Az elmúlt évtizedekben több tudományos közleményben publikálták a gyulladásos citokinek (például TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18) és a ROS megnövekedett szintjét krónikus szívelégtelenségben. Ezek a patológiás állapotok egyaránt szerepet játszanak a szívizom (remodelling, hipertrófia, fibrózis stb.), valamint a perifériás érrendszer és az endotél károsodásában [8,42,43]. Munkacsoportunk korábban posztinfarktusos patkánymodellben igazolta a RES bevitelnek a szívelégtelenség kialakulásával szembeni protektív hatását. A RES nemcsak javította a bal kamra funkciót, hanem csökkentette miokardiális fibrózist, az oxidatív stresszt és egyes proinflammatorikus proteinek jelenlétét (COX-2, iNOS) [44]. Más kutatócsoportok hasonló eredményeket írtak le különböző állatkísérletes modellekben, azonban humán klinikai vizsgálattal a RES célzottan szívelégtelenségre kifejtett hatását még nem igazolták [23,25]. Itt kell megemlítenünk, hogy kutatócsoportunk publikált egy humán klinikai tanulmányt 2012-ben, ahol krónikus koronária szindrómás betegpopulációban alkalmazott kis dózisú (napi 10 mg) RES kezelés mellett ugyan javult a diasztolés bal kamra funkció, azonban a szisztolés bal kamra funkció tekintetében kedvező tendencia mellett nem láttunk szignifikáns javulást [45].

3. Hemoreológia

A hemoreológia a vér áramlásánál foglalkozó tudományág, amely a vér áramlási viszonyait és alkotóelemeinek fizikai tulajdonságait vizsgálja. Számos multicentrikus tanulmány igazolta, hogy a hemoreológiai tényezők romlása önálló rizikófaktorként kezelendő a kardiovaszkuláris kórképekben [46-48].

3.1. Hemoreológiai paraméterek

A legfontosabb hemoreológiai paraméterek közé tartozik a hematokrit (Htc), a fibrinogén, a plazma és teljes vér viszkozitás (PV, VV), a vörösvértest (vvt) aggregáció és a vvt deformabilitás.

A napi klinikai gyakorlatban a leginkább ismert és használt paraméter a htc, mely a legtöbb reológiai tényezővel összefüggésben áll. Alacsony értéke esetén a vér nem tud elegendő oxigént szállítani, míg magas htc esetén nő a vérviszkozitás, romlik a mikrocirkuláció, mely szintén rontja a szövetek oxigénellátását [48].

A viszkozitás a folyadékok belső súrlódása, melyet az adott hőmérsékleten az áramlást fenntartó nyírófeszültség és a létrehozott sebességgrádiens hányadosa mutat meg. Emelkedett viszkozitás során megnő a perifériás ellenállás, nagyobb terhelés hárul a szívre és akár a szövetek vérellátásának károsodásához is vezethet. A PV-t a hőmérséklet, a plazma lipid szintek és a plazmafehérjék (főként a fibrinogén) befolyásolják, míg a VV-re a Htc, a PV, a vvt aggregáció és a vvt deformabilitás van hatással [49,50].

A vvt aggregáció a vér hemoreológiai paramétereinek egyik fontos meghatározója. A kóros mértékben összezsapzódott vvt-k a kapilláris szintű áramlási ellenállást jelentős mértékben képesek fokozni, ezáltal károsítják a mikrocirkulációs keringést és a szöveti perfúziót. Az aggregabilitás mértékét főként a htc és a plazmafehérjék (legjelentősebb a fibrinogén) szintje határozza meg. Klinikai gyakorlatban a magas plazmafehérje szint miatt fokozott vvt aggregációt és süllyedést tapasztalhatunk például myeloma multiplex, szepszis, autoimmun kórképek és tumoros betegségek esetén. Emelkedett plazmafehérje szint nélkül is fokozott vvt aggregáció mérhető különböző kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris kórképekben és a cukorbetegségben is [51-54].

A vvt-k deformabilitása lehetővé teszi a keringés során fellépő nyíróerőknek megfelelő alakváltoztatást, a kapillárisokon való áthaladást. A deformabilitást nagyban befolyásolja a vvt morfológiája, a vvt belső viszkozitása, a membránstrukturája, a felület-térfogat arány. Az említett tényezőket számos genetikai és környezeti faktor (pl. oxidatív stressz) megváltoztathatja [55].

3.2. Hemoreológiai változások szívelégtelenségben

A perifériás erek és a koronáriák komplex károsodása szívelégtelenségben a beszűkült keringésen, a sérült szabályozó mechanizmusokon és egyéb, a fentiekben már leírt

folyamatokon (ROS, gyulladáscitokinek) túl részben a hemoreológiai faktorok kóros változásainak tudható be. A kedvezőtlen reológiai folyamatok révén csökken az oxigén utilizáció, mely hozzájárul a szívelégtelenség tüneteinek fokozódásához és a betegség progressziójához [56-58].

A vvt aggregáció és deformabilitás a szervezet egészében fontos faktorai a kapilláris szintű keringésnek, beleértve természetesen a koronáriák mikrocirkulációs keringését is. Számos más klinikai állapothoz hasonlóan (pl. koszorúér betegség, cukorbetegség, vénás trombembolia), szívelégtelenség esetén is fokozódik a vvt aggregáció, mely negatívan befolyásolja a vér áramlási tulajdonságait. A fentiek alapján a vvt aggregáció csökkentése a kardiovaszkuláris betegségek szempontjából pozitív hatással bírhat [45,59-61]. Ezen túlmenően, amikor szívelégtelenségben a vaszkuláris autoregulációs tartalék kimerül, a kóros hemoreológiai eltérések - amelyek egészséges egyéneknél könnyen kompenzálhatók – még inkább káros hatásokat eredményeznek. Ráadásul, a reológiai tényezők kedvezőtlen változásait jóval korábbi, a kardiovaszkuláris betegségek klinikai manifesztációja előtti stádiumban is leírták már [57,58,62].

Fontos kiemelni, hogy a vvt-k kifejezetten érzékenyek az oxidatív stresszre, mivel gyakorlatilag az első vonalban érintkeznek a káros stimulussal, mely kedvezőtlen morfológiai, funkcionális és metabolikus változásokat eredményez az eritrocitákban [63]. Az aggregáció és a deformabilitás a celluláris tulajdonságok mellett nagyban függ a sejtkörnyezet mechanikai és fiziko-kémiai tényezőitől (pl. fibrinogén, nagy molekula súlyú globulin jelenléte) melyekre a fent említett kedvezőtlen folyamatok szintén komoly hatással bírnak [64].

IV. Célkitűzések

A disszertáció alapjául egy saját tervezésű, egycentrumos, kettősvak, randomizált, placebo-kontrollált humán klinikai vizsgálat szolgált. A vizsgálat során előre tervezett módon, ugyanazon betegpopuláción két eltérő kérdésre kerestük a választ, melyet két tudományos közlemény formájában publikáltunk.

Vizsgálatunk egyik fő célkitűzése a RES hatásainak vizsgálata volt a betegek kardiális funkciójára, kiemelten a bal kamra funkcióra, emellett tanulmányoztuk a betegek terhelési kapacitását, életminőségét, a specifikus biomarkerek változásait, valamint a gyulladós folyamatok alakulását RES kezelés mellett csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenségben.

Tanulmányunk során kiemelt célunk volt egy alvizsgálat formájában azon hipotézisünk igazolása, hogy a RES kedvezően befolyásolja a hemoreológiai paramétereket, ezáltal a mikrocirkulációs keringést csökkent szisztolés bal kamra funkcióval rendelkező szívelégtelen populációban. A hemoreológiai paraméterek közül htc, plazma és teljes vér viszkozitás, vvt aggregáció és deformabilitás meghatározása történt, emellett összefüggést kerestünk a vizsgált paraméterek és a betegek terhelhetősége között.

V. Eszközök és Módszerek

1. A tanulmány felépítése, a vizsgált betegpopuláció jellemzői

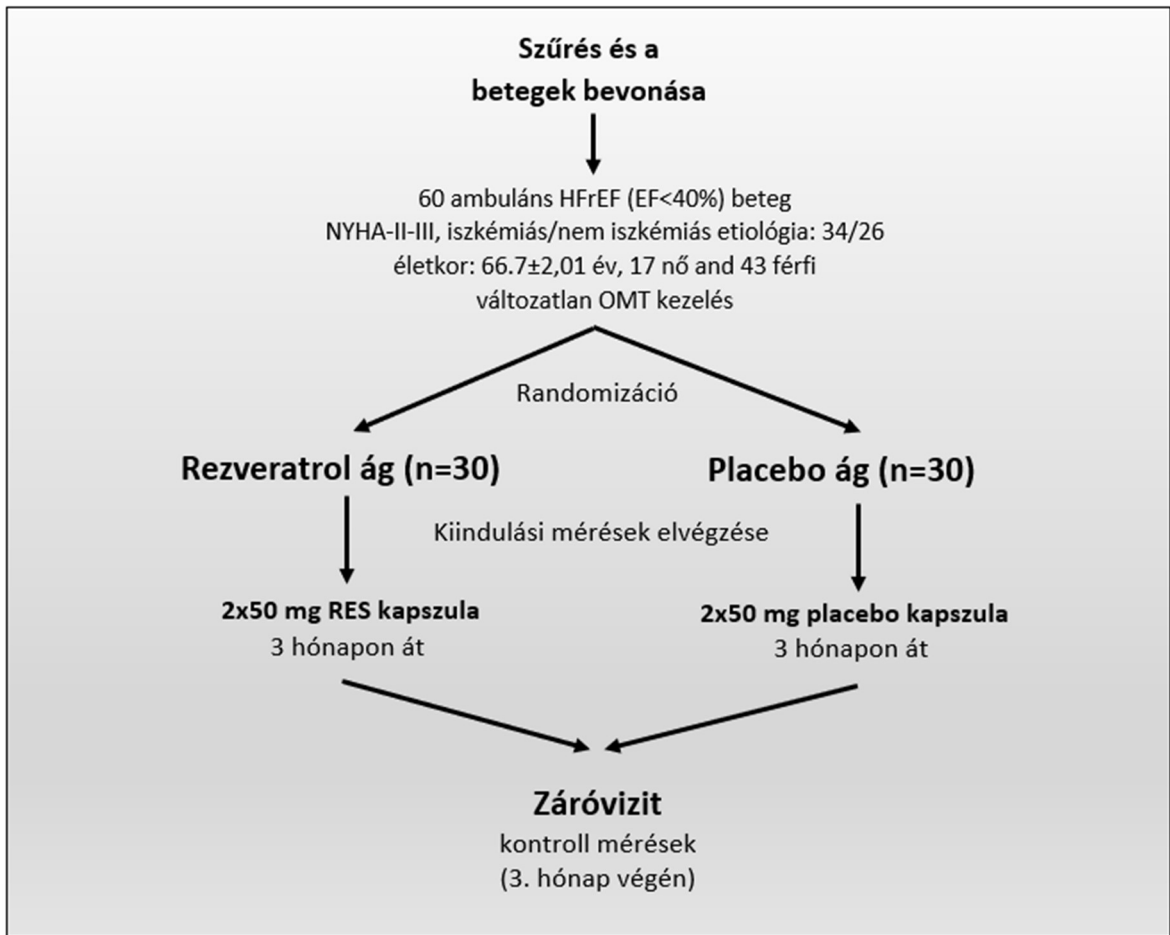
A disszertáció alapját képező egycentrumos, kettősvak, randomizált, placebo-kontrollált, saját tervezésű humán klinikai vizsgálat strukturáját a 3. ábra foglalja össze. A vizsgálat elvégzése a Helsinki Deklaráció (1996), az ICH-GCP (International Conference on Harmonization Good Clinical Practice), valamint a hazai és azon belül a helyi szabályozásokkal harmonizálva történt. A protokollt a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatás-Értékelési Bizottsága jóváhagyta (protokoll engedély száma: 5830). A vizsgálatba történő bevonáskor a betegek írásos beleegyezésüket adták.

Munkánk során 60 olyan ambuláns beteg (életkor: $66,7 \pm 2,01$ év, 17 nő and 43 férfi) került bevonásra 2016.03.01 és 2017.11.30 között, akiknél csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (ejekciós frakció 40% alatti) igazolódott és funkcionális stádiumuk a NYHA II-III osztálynak felelt meg. A résztvevőket két csoportra randomizáltuk (RES csoport és placebo csoport): az egyik ágon ($n=30$ fő) 100 mg (2x50 mg) RES kapszulát, míg a másik ágon placebot kaptak (2x1 kapszula) a betegek 3 hónapon keresztül.

A vizsgálat során elsőként randomizációs, majd 3 hónap múlva záróvizit történt, emellett egy közbülső, 1. hónapos vizitet is beiktattunk. A mérési módszereket a vizsgálat tervezése során előre meghatároztuk, utólagos protokoll módosítás nem történt.

A vizitek alatt egyfelől önbevallás, másfelől a visszahozott dobozok maradék kapszuláinak átszámolása alapján ellenőriztük a betegek együttműködését („compliance”). Fontos kiemelni, hogy a résztvevők gyógyszerelésében az utánkövetés alatt nem történt változás (2. táblázat), valamint végig stabil klinikai állapotúak voltak (szívelégtelenség miatti hospitalizáció nem volt az utánkövetés során).

Mind a RES, mind a placebo kapszulát az ARGINA Kft-től (Fót, Magyarország) szereztük be. A felhasznált RES kapszula a kereskedelemben is szabadon beszerezhető, a forgalomba hozatalra hivatalos engedéllyel rendelkezik.



3. ábra. A vizsgálat felépítése.

2. Beválasztási és kizárási kritériumok

A beválasztási és kizárási kritériumokat a 1. táblázatban ismertettük. A bevonás alapját a 40% alatti ejekciós frakcióval rendelkező, stabil szívelégtelen betegség képezte. A fő kizárási kritériumok közé tartozott a randomizáció előtt 30 napon belül bekövetkezett kardiovaszkuláris vagy cerebrovaszkuláris esemény, valamint ugyancsak 30 napon belül elvégzett jelentős sebészeti/invazív/intervenciós beavatkozás. Emellett nem kerültek bevonásra a beszűkült vesefunkcióval (becsült glomerulus filtrációs ráta (eGFR) <20 mL/1,73 m²/perc) vagy károsodott májfunkcióval (GOT vagy GPT \geq 2x a normál értéknek) rendelkező betegek sem.

1. táblázat. Beválasztási és kizárási kritériumok.

Beválasztási kritériumok	Kizárási kritériumok
<ul style="list-style-type: none"> • Stabil szívelégtelen beteg • Bal kamra EF <40% • NYHA II-III funkcionális osztály • NT-proBNP szint >125 pg/ml • OMT kezelés az aktuális “ESC irányelvek” alapján • Aláírt beleegyező nyilatkozat 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 hónapon belüli hospitalizáció • LVEF \geq40% • NYHA IV funkcionális osztály • 18 év alatti vagy 85 év feletti életkor • Érzékenység a kapszula bármely összetevőjére • A randomizáció előtt 30 napon belüli szívsebészeti vagy intervenciós beavatkozás • Szisztolés vérnyomás >180 Hgmm vagy <90 Hgmm, illetve diasztolés vérnyomás >90 Hgmm • Szívfrekvencia >110/perc vagy <50/perc • eGFR <20 mL/1,73 m²/perc • Májfunkciós eltérés (GOT vagy GPT \geq 2x a normál érték felső határának kiinduláskor) • Adott időben más klinikai vizsgálatban történő részvétel

eGFR: becsült glomeruláris filtrációs ráta; ESC: Európai Kardiológusok Társasága); EF: bal kamra ejekciós frakció; GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz; GPT: glutamát-piruvát-transzamináz; NT-proBNP: B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja; NYHA: a szívelégtelenség funkcionális beosztása; OMT: optimális gyógyszeres kezelés.

3. A betegek epidemiológiai jellemzői

A bevont betegek csoportokra bontott kiindulási jellemzői a 2. táblázatban kerültek ismertetésre. Demográfiai szempontból és a szívelégtelenség etiológiája tekintetében a RES és a placebo csoport között nem volt szignifikáns különbség.

A résztvevők a bevonáskor az Európai Kardiológusok Társasága (ESC) aktuális szívelégtelenség kezelési irányelvei szerinti kezelésben részesültek, a HFrEF-nél elfogadott optimális gyógyszeres terápiát alkalmaztuk, mely magában foglalta az ACE-gátlók, az ARB-k, a béta-receptor blokkolók, az MRA-k és bizonyos esetekben az ivabradin alkalmazását. ARNI kezelésben a bevont betegek közül ekkor még senki nem részesült [1].

2. táblázat. A betegek epidemiológiai jellemzői az egyes csoportokban.

	Rezveratrol (n=30)	Placebo (n=30)
Életkor (év)	65,81±1,91	67,53±2,12
Nem	22 (73%)	21 (70%)
Ejekciós frakció (%)	30,06±1,04	31,70±1,27
NT-proBNP (pg/ml)	2998±507	3139±446
Szérum kreatinin (µmol/l)	99,77±4,42	104,47±4,82
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	132,47±3,4	128,77±3,8
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	79,10±2,33	80,13±2,66
Szívfrekvencia (ütés/perc)	72,20±2,75	76,93±2,5
<u>Etiológiai faktorok</u>		
Iszkémiás szívbetegség	17 (56,7 %)	17 (56,7 %)
Nem iszkémiás eredet (alkohol, kemoterápia, miokarditisz)	13 (43,3 %)	13 (43,3 %)
<u>Rizikó faktorok, társbetegségek</u>		
Magasvérnyomás-betegség	22 (73,0%)	23 (76,0%)
Cukorbetegség	13 (43,0%)	14 (46,0%)
Dohányzás	11 (36,0%)	8 (27,0%)
Tüdőbetegségek (asztma, COPD)	7 (23,0%)	8 (27,0%)
BMI (kg/m ²)	29,3±0,9	30,4±1,3
Célfrekvencia (<70/min)	23 (76,7%)	20 (66,7%)
Pitvarfibrilláció	7 (23,0%)	10 (33,3%)
<u>Gyógyszerek</u>		
ACE-gátló/ARB	28 (93,0%)	29 (97,0%)
Béta-receptor blokkoló	29 (97,0%)	28 (93,0%)
MRA	23 (76,7%)	21 (70,0%)
Ivabradin	6 (20,0%)	6 (20,0%)
<u>Vízajtók</u>		
Kacsiuretikumok (furoszemid, etakrinsav)	27 (90,0%)	28 (93,0%)
Tiazid vagy tiazid-szerű diuretikumok (hipotiazid, indapamid)	8 (27,0%)	9 (30,0%)
<u>Eszközös kezelés</u>		
CRT-P/D	9 (30,0%)	7 (23,0%)
ICD	4 (13,0%)	3 (10,0%)

Az értékeket átlag± SEM formában adtuk meg. A RES és a placebo csoport között nem volt szignifikáns különbség kiinduláskor a fenti paraméterek tekintetében. ACE-gátló: angiotenzin-konvertáló enzim gátló; ARB: angiotenzin receptor blokkoló; BMI: testtömeg index; COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegség; CRT-P/D: kardiális reszinkronizációs kezelés pacemakerrel/defibrillátorral; ICD: implantálható kardioverter defibrillátor; MRA: mineralokortikoid-receptor antagonist; NT-proBNP: agyi nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja.

4. Az elvégzett vizsgálatok ütemezése

A betegek bevonásakor, valamint a 3. hónap végén fizikális vizsgálat, vérnyomás és testsúly meghatározás, EKG, szívtultrahang vizsgálat, 6MWT, labordiagnosztika, biokémiai mérések és légzésfunkciós vizsgálat történt, emellett a betegek egy életminőségi kérdőívet is kitöltöttek. Az említett fő vizit időpontok közé az 1. hónap végén egy közbülső, ellenőrző mérést is beiktattunk, mely során fizikális vizsgálatot, vérnyomás és testsúly meghatározást, EKG-t, valamint labordiagnosztikát végeztünk (3. táblázat).

A vérmintákból elvégzett speciális hemoreológiai mérések szintén a randomizáció napján, majd 3 hónappal később, a vizsgálati periódus végén történtek. A hemoreológiai mérések kiegészítéseként mindkét csoport kiindulási értékeit egy életkorban megegyező (életkor: 67,15±1,01 év, nő/férfi: 11/9) olyan kontroll csoporthoz hasonlítottuk, melyben a betegeknél nem volt jelen szisztolés típusú szívelégtelenség (EF>50%), emellett legfeljebb közepes kardiovaszkuláris rizikócsoporthoz tartoztak. Erre azért volt szükség ezen mérések kapcsán, mivel egyes reológiai paraméterek (vvt aggregáció és deformabilitás) esetében nincs elfogadott referencia tartomány, így a kapott értékeket mindig egymáshoz viszonyítjuk, esetünkben a kontroll csoportnak egy hasonló rizikóprofillal rendelkező, de nem szívelégtelen beteganyagot alkalmaztunk azt bizonyítva, hogy szívelégtelenség esetén romlanak a vizsgált paraméterek.

3. táblázat. A vizsgálatok ütemezése.

	Kiindulási vizit	1. hónap	3. hónap
Fizikális vizsgálat	✓	✓	✓
Vérnyomásmérés	✓	✓	✓
12 elvezetési EKG készítés	✓	✓	✓
Vérvétel és labordiagnosztika	✓	✓	✓
NT-proBNP szint meghatározás	✓		✓
mRNS analízis	✓		✓
Szívtultrahang vizsgálat	✓		✓
6MWT	✓		✓
Életminőség kérdőív (EQ-5D)	✓		✓
Légzésfunkciós vizsgálat	✓		✓
Hemoreológiai mérések	✓		✓

EKG: elektrokardiográfia, EQ-5D: "Euro quality of life" – 5 pontos életminőség kérdőív, NT-proBNP: B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja, mRNS: hírvivő ("messenger") ribonukleinsav, 6MWT: 6 perces járateszt.

5. Statisztikai analízis

Statisztikai elemzés céljából az SPSS statisztikai program 25. számú verzióját használtuk. Miután az értékek normalitás vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével elvégeztük, a kiindulási és 3 hónapos adatokat kétmintás Student félé t-próbával, valamint egyirányú ANOVA (Greenhouse-Geisser korrekciót alkalmazva) teszttel értékeltük. Az adatokat átlag \pm S.E.M. formában adtuk meg. A változásokat $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak. A csoportok homogenitását Levene's félé F-teszttel ellenőriztük. A betegek életminőség kérdőívben feltárt változásainak elemzésére a nonparametrikus Friedman-tesztet (a minták post hoc elemzése Wilcoxon teszttel történt) alkalmaztunk. A reológiai paraméterek és a járástávolság közötti összefüggéseket Pearson-féle korrelációval vizsgáltuk.

6. Vizsgálati módszerek

6.1. Vérnyomásmérés, testsúly meghatározás

A betegek testsúly és vérnyomás paraméterei a randomizáció, az 1. hónapos és a 3. hónapos vizitek során kerültek meghatározásra. A testsúlyméréshez egy kiemelt minőségű, kalibrált digitális mérőeszközt használtunk (CAS PB-150 digitális mérleg, CAS Corporation, Tustin, Kanada). A vérnyomásértékeket automata vérnyomásmérővel detektáltuk 5 perc nyugalmat követően valamely felkarra, a szív magasságában elhelyezett mandzsetta segítségével (OMRON M2 Intellisense, Japán). A mérési metodikát az aktuális európai hipertónia kezelésre vonatkozó irányelvek (ESC/ESH) alapján dolgoztuk ki és alkalmaztuk [65].

6.2. Vérvétel, labordiagnosztika

A laboratóriumi analízist 12 órás éhomi állapot mellett, a kubitális vénából vett vérmintából végeztük. A mintákból NT-proBNP, lipid profil (összkoleszterin, LDL-koleszterin, HDL-koleszterin, triglicerid), Troponin T, glikált hemoglobin (Hgb_{A1c}), szérum albumin, vese- és májfunkció, szérum vas profil, valamint kvantitatív és kvalitatív vérkép meghatározása történt a PTE Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében.

Néhány speciális paraméter (Galectin-3, IL-1, IL-6) analízisét ELISA módszer segítségével végeztük a PTE Szentágotthai János Kutatóközpontban. Ezen vérminták EDTA és proteáz inhibitor tartalmú vérvételi csövekbe kerültek legyűjtésre. A Galectin-3 szint (Invitrogen™ Human Galectin-3 ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, EHLGALS3), illetve az IL-1 (Invitrogen™ Human IL-1 R4 ((IL1RL1)) ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, EHIL1RL1) és IL-6 (Invitrogen™ Novex IL-6 Human ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, KHC00612.3.3.) citokin szinteket enzim “immunoassay” technikával detektáltuk.

6.3. Szívultrahang vizsgálat

A szív morfológiai és funkcionális paramétereinek meghatározásához használt transztorakális echokardiográfiával történő méréseket a kiinduláskor és 3 hónapos kezelést követően végeztük el. A képalkotáshoz GE Vivid E9 ultrahang készüléket használtunk (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Méréseink során paraszternális hossz- és keresztmetszeti, valamint csúcsi kettő-, három- és négyüregi metszetek kerültek detektálásra. Metodikai szempontból M-mód, 2D, 3D, folyamatos hullámú, pulzatis és szöveti Doppler technikákkal határoztuk meg a bal kamrai ejekciós frakciót (EF), a bal kamrai és pitvari átmérőket (mm) és volumeneket (ml), a diasztolés funkciót (E/A, E/e'), a globális longitudinális “strain”-t (GLS, %), a falvastagságokat (mm) és a jobb szívfél paramétereit. Az EF két különböző módszerrel lett mérve az értékek önvalidálása céljából (Simpson- és Quinones-formula). A bal kamrai volumeneket 3D volumetriás módszerrel, míg a bal pitvari volumeneket 2D Simpson mérésekkel határoztuk meg. A szöveti Doppler technikával mért e' értékek a septális és a laterális annuluszon történt mérések átlaga alapján lettek megadva. A méréseket ugyanazon 2 expert vizsgáló végezte az intra- és interobszerver variabilitás csökkentése céljából, azonban a kezelés tekintetében minden esetben vakok voltak, tehát nem tudták, hogy a beteg a RES vagy a placebo ágon van. A mérések során felvett echokardiográfiás paraméterek analízisét utólagosan a GE Healthcare EchoPAC (verzió: 202) szoftver felhasználásával végeztük el.

6.4. Terhelhetőség vizsgálata (6 perces járateszt)

A 6MWT egy szubmaximális terheléses teszt, mely során a 6 perc alatt teljesített járástávolságot mérjük. A mérések az ATS (American Thoracic Society) ajánlásoknak megfelelően egy széles folyosón kijelölt 30 m hosszú szakaszon történtek az intézetünkben.

A méréseket megelőzően a résztvevők 10 percig nyugalmi helyzetben maradtak, majd magát a tesztet egy asszisztens végezte, aki nem ismerte, hogy az adott beteg milyen kezelésben részesül. A teszt 6 percig tartott, korábban csak abban az esetben állítottuk le, ha a beteg valamely okból nem tudott tovább sétálni (nehézlégzés, fáradtság, mellkasi fájdalom stb.), ekkor az addig megtett távolságot rögzítettük [66].

6.5. Légzésfunkciós vizsgálat

A spirometria a rutin klinikai gyakorlatban széles körben használt módszer a tüdő funkcionális állapotának felméréséhez. Leggyakrabban a mellkasebészetben, valamint pulmonológiai betegségek (pl. COPD) diagnosztikájában alkalmazzák. Jól ismert, hogy a szívelégtelenség komoly hatással van a tüdő funkcionális állapotára, mely mind az obstruktív (pl. FEV₁ csökkenés), mind a restriktív paraméterek kedvezőtlen változásában is megnyilvánulhat [67].

A pulmonális funkcionális paraméterek detektálásához PISTON PDD 301/s spirométert (Piston Kft., Budapest, Magyarország) alkalmaztunk, a méréseket a randomizáció napján, illetve a 3 hónapos kezelés után végeztük el.

A mérési procedúra során a beteg orrát csipesszel szorítottuk le (az orron át történő levegő áramlás megakadályozása), a szájukba helyezett csutora mögé pedig baktériumfiltert helyeztünk fel a megfelelő higiénia elérése céljából. A mérési periódust egy nyugodt ki- és belégzési szakasz előzte meg (felkészülés szakasza), majd egy gyors, forszírozott belégzést követően a forszírozott kilégzés következett, mely során a betegek maximálisan belégzést végeztek, majd minél nagyon erővel és sebességgel kellett kifújniuk a tüdejükben lévő levegőt. A fő paramétereket az elfogadott referencia tartományok százalékában adtuk meg. Meghatároztuk a forszírozott vitálkapacitást (forced vital capacity, FVC), a forszírozott kilégzési volumeneket és azokból származtatott paramétereket (forced expiratory volume, FEV₁; FEV₁/FVC arány stb.), valamint maximális kilégzési áramlások volumeneit (maximal expiratory flows - MEF 25%; MEF 50%; MEF 75%) és a belégzési vitálkapacitást (inspiratory vital capacity, IVC).

6.6. Életminőség kérdőív

A szívelégtelenségben szenvedő beteget életminőségét (quality of life, QoL) leginkább a fennálló tünetek súlyossága befolyásolja. Az életminőség összességében

rendkívül jó prediktornak számít a betegség mortalitása és a kórházi hospitalizáció tekintetében. A vizsgálatban résztvevő betegek életminőségének felméréséhez az 5 pontos “Euro Qol five dimension” (EQ-5D) kérdőívet használtuk. Az egészséggel kapcsolatos életminőség kérdőívek között az egyszerűsége, az értékelhetősége és a könnyű értelmezhetősége miatt az EQ-5D széleskörben alkalmazott és elfogadott. Mindössze 5 területtel kapcsolatban tesz fel kérdést (mozgékonyosság, önellátás, szokásos napi tevékenység, fájdalom/diszkomfort érzet, szorongás/depresszió érzés), ezeken belül pedig a súlyosságnak 3 szintű lépcsőjét szabja meg (nincs probléma- 2 pont, jelen van némileg a probléma - 1 pont, jelentős a probléma- 0 pont). Ráadásul a fentiekén túl a betegek egy vizuális analóg skálán (VAS) 0-tól (a lehető legrosszabb egészségi állapot) 100-ig (a lehető legjobb egészségi állapot) el tudják helyezni az aktuális egészségi állapotukat [68], így a vizsgálat egy későbbi szakaszában egy kiváló szubjektív összehasonlítási alap áll rendelkezésünkre.

6.7. mRNS izolálás, mRNS szekvencia katalógizálása és RNS szekvenálás

Az RNS állomány tisztítása teljes vérből történt “QIAamp RNA Blood Mini Kit” felhasználásával. Az RNS purifikációja során először az vvt-k szelektív lízise, majd a fehérvérsejtek centrifugálással történő eltávolítása történt. A fehérvérsejteket ezután erősen denaturáló körülmények között lizáltuk, ezáltal inaktiváltuk az RNázokat, mellyel lehetővé tettük az ép, tiszta RNS-ek izolálását. A lizátum homogenizálása után egy rövid centrifugálás történt speciális centrifugáló oszlopon (QIAGEN), majd etanolt adtunk a mintához a kötődési feltételek optimalizálásához, ezt követően folytattuk a centrifugálást. A folyamat során az RNS egy rövid centrifugálási periódus után egy szilícium-dioxid membránhoz kötődik. A szennyeződések lemosását követően az RNS-t legalább 30 ul RNáz-mentes közegben tudtuk eluálni.

Az RNS koncentráció méréséhez Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fluorométert alkalmaztunk. Az RNS minőségét “Agilent 2100 Bioanalyzer” segítségével “RNA 6000 Nano Kit” (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) felhasználásával ellenőriztük. A fenti folyamatok során kiváló minőségű (RIN>8) RNS kaptunk, majd dolgoztunk fel az RNS könyvtár előkészítéséhez. A további preparálási folyamatot is szigorú szabályok (IlluminaTruSeq® Stranded Total RNA Sample Preparation Guide) betartása mellett végeztük.

6.8. RNS szekvenálás adatainak feldolgozása és elemzése

A FASTQ formátumú szekvencia fájlokat a “CLC Genomics Workbench” (CLC Bio, 12-es verzió, Hilden, Németország) programba importáltuk. A köztes szekvenciákat, illetve az alacsony minőségű és a kétértelmű bázisokat kivágtuk. Az feldolgozott szekvenciákat a GRCh38 humán genom adatbázis génrégióihoz és transzkriptumaihoz igazítottuk.

A génextpressziós különbségeket a mindkét ágon elemeztük, a kiindulási és a 3. hónapos expressziós értékeket összehasonlítottuk. Az eltérően expresszálódó géneket (differentially expressed genes, DEGs) kiszűrtük, FC (threshold of fold change) >1,5 fölötti határt megadva (p érték <0,05). A génextpressziós változásokat hőtérképen ábrázoltuk, melyhez a “CLC Genomics Workbench 12” program volt a segítségünkre.

6.9. Hemoreológiai mérések

6.9.1. Vérvétel

A mérések elvégzése céljából 2 alkalommal történt vérvétel: az első alkalommal a randomizáció napján, a második alkalommal pedig a 3 hónapos kontroll során.

A vérminták levétele a kubitális vénákból történt 12 óra éhezést követően. A 21 G-s Vacutainer szárnyas tűvel vett mintákat 2x6 ml-es EDTA tartalmú vérvételi csövekbe gyűjtöttük.

6.9.2. A vizsgált hemoreológiai paraméterek

Hemoreológiai méréseinket a mintavételeket követő 2 órán belül elvégeztük. A vérmintákból a következő hemoreológiai paraméterek kerültek meghatározásra: htc, VV, PV, vvt aggregáció és deformabilitás. A PV és VV meghatározása, valamint a LORCA-val végzett tesztek 37°C-on történtek, a többi vizsgálatot szobahőmérsékleten ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) végeztük [69].

6.9.3. Hematokrit meghatározás

A htc meghatározása “Haemofuge” (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Németország) kapilláris centrifugával történt szobahőmérsékleten ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) [69].

6.9.4. Plazma és teljes vér viszkozitás mérése

A PV és VV meghatározása Hevimet 40 kapilláris viszkométerrel történt (Hemorex Kft., Budapest, Magyarország). A plazma kinyeréséhez a vért 1500 g-n 10 percig centrifugáltuk. A műszer a mérőcsövön átfolyó 620 μ l folyadék sebességváltozását detektálja fotoelektromos érzékelők segítségével, az áramlási görbéből pedig az egyes viszkozitás értékek kiszámíthatóak. A VV értéket 90 s^{-1} nyírófeszültségen adtuk meg. A mérések 37 °C-os hőmérsékleten történtek [49].

6.9.5. Vörösvértest aggregáció mérése

A vvt aggregáció mérését LORCA aggregométer (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer; R&R Mechatronics, Hoorn, Hollandia) segítségével végeztük. A mérés során 1 ml oxigenizált vért a műszer mozgásban lévő külső és álló belső cilindere közé pipettáztunk. A külső cylinder meghatározott sebességgradiensű forgó mozgása révén a vvt-eket nagy nyíróerővel (500 s^{-1}) diszaggregálja, majd a nyírás hirtelen nullára zuhan. A visszaverődő lézerefény intenzitásváltozását, mely a vvt-k aggregációjával együtt csökken, a műszer regisztrálja (syllectogram). A minta aggregációjának viselkedését az aggregációs index-el (AI) jellemezhetjük, mely az idő és a vvt aggregátumokról visszaverődő lézerefény intenzitás csökkenése által a syllectogrammon kirajzolt görbe aggregációs fázisának (diszaggregáció utáni első 10 másodperc) a teljes mérési időhöz (2 perc) viszonyított görbe alatti területe. További meghatározható paraméter a $t_{1/2}$, ami a maximális aggregáció felének eléréséhez szükséges idő. A küszöb nyírási sebességgradienst (γ : gamma (s^{-1})) szintén megmértük, mely a vvt-k diszaggregációjához szükséges legkisebb nyíróerő. A berendezés a mintát diszaggregálja, majd az intenzitásváltozás (dI) mérése történik [70].

A vvt aggregáció másik módszerrel történő meghatározásához Myrenne aggregométert (MA-1 Aggregometer, Myrenne Ltd., Németország) használtuk, mely a Schmid-Schönbein-féle fény transzmissziós elv alapján működik. Az eszköz a 600 s^{-1} nyírásnak kitett vvt aggregátumokat diszaggregálja, majd a nyírás mértéke hirtelen nullára (M mód) vagy alacsony nyíróerőre (M1 mód) csökken. Az adott nyíróerőn meglévő aggregáció mértékét az aggregációs index (M, M1) jelzi, melyet a műszer a fényintenzitás görbe első 10 másodpercének görbe alatti területéből számítja ki [71].

6.9.6. Vörösvértest deformabilitás mérése

A deformabilitás meghatározásához használt ektacitometria (LORCA lézer diffrakciós ektacitométer) során 25 µl-nyi vért szuszpendáltunk 5 ml magas viszkozitású (32.6 mPas) polivinilpirrolidon (PVP) oldatban. A berendezés 0,3 Pa-tól 30 Pa-ig, 9 különböző nyírófeszültségen deformálja a mintát és lézer diffrakciós képen szemlélteti. A mérés során a lézerfény diffrakciót szenved a megnyúlt vvt-ken, és az így nyert ellipszis alakú diffrakciós képből a deformabilitás mértékét jellemző elongációs index (EI) kiszámolható az alábbi képlet szerint: $(A-B)/(A+B)$, ahol A az ellipszis hosszabb átmérője, B pedig a rövidebb átmérője. A mérések 37 °C-os hőmérsékleten történtek. A mért értékeket Lineweaver-Burke non-lineáris egyenletbe is beillesztettük, mely során meghatároztuk teoretikusan a végtelen nyírófeszültséghez tartozó elongációs indexet (EI_{max}), valamint a maximális elongáció feléhez szükséges nyírófeszültséget ($SS_{1/2}$) [72]. Sajnos a kalkulált értékek (EI_{max} , $SS_{1/2}$) sokszor az elfogadhatósági szint alatt voltak, amely torzította volna az eredményeinket, a végső értékelésnél a deformabilitás jellemzésére csak a “nyers” elongációs paramétereket (EI) használtuk fel.

VI. Eredmények

1. A rezveratrol hatásai a vizsgált laboratóriumi paraméterekre

A meghatározott laboratóriumi paraméterek tekintetében 1 hónapos kezelést követően nem volt kimutatható szignifikáns változás egyik csoportban sem a kiindulási értékekhez képest (az értékeket nem tüntettük fel). Nem volt továbbá szignifikáns különbség 3 hónap után a vesefunkció, a májfunkció, a kvantitatív és kvalitatív vérkép tekintetében egyik ágon sem a kiindulási paraméterekkel összevetve. A kardiális Troponin T-re, a vas profil paramétereire és a Hgb_{A1c} értékeire ugyancsak nem volt kimutatható hatással a RES kezelés a vizsgálati periódus során. Az összkoleszterin ($4,74 \pm 0,22$ mmol/l versus $4,52 \pm 0,24$ mmol/l, $p < 0,05$) és az LDL-koleszterin szintek ($3,09 \pm 0,23$ mmol/l versus $2,79 \pm 0,23$ mmol/l, $p < 0,05$) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a RES csoportban a vizsgálat végén, azonban a placebo ágon nem volt statisztikailag kimutatható változás 3 hónap után a kiindulási értékekhez képest (4. táblázat). Ugyanakkor a HDL-koleszterin szint is csökkent némileg a RES ágon a 3 hónapos periódus végén ($1,33 \pm 0,06$ mmol/l versus $1,24 \pm 0,07$ mmol/l, $p < 0,05$).

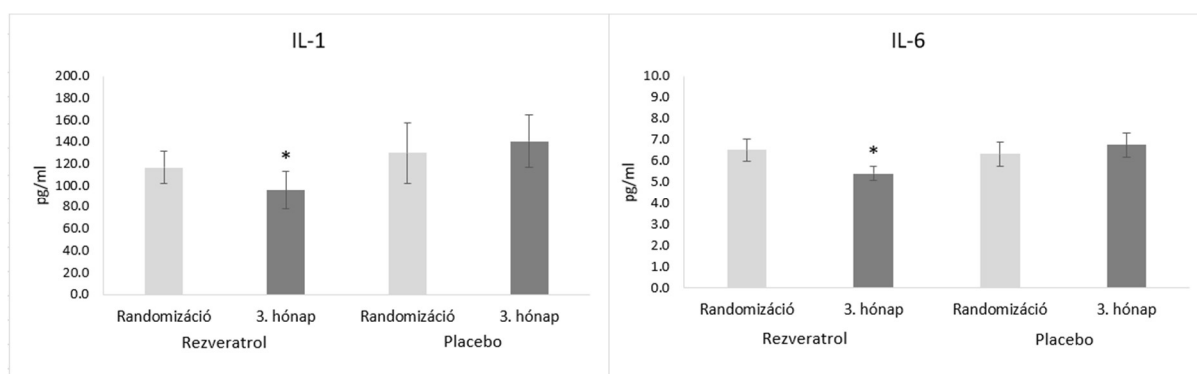
4. táblázat. A rezveratrol hatása a vizsgált laboratóriumi paraméterekre.

	Kiindulási paraméterek		3. hónap	
	Rezveratrol	Placebo	Rezveratrol	Placebo
Hgb _{A1c} (%)	6,37±0,18	6,70±0,24	6,38±0,20	6,67±0,23
Karbamid-nitrogén (mmol/l)	7,75±0,45	8,80±0,84	8,26±0,44	8,75±0,93
Szérum kreatinin (µmol/l)	99,77±4,42	104,47±4,82	102,19±5,71	109,31±5,92
TC (mmol/l)	4,74±0,22 [#]	4,15±0,23	4,52±0,24 ^{*#}	4,04±0,28
HDL-C (mmol/l)	1,33±0,06	1,29±0,08	1,27±0,07 [*]	1,25±0,06
LDL-C (mmol/l)	3,09±0,23 [#]	2,51±0,21	2,79±0,23 ^{*#}	2,41±0,23
Triglicerid (mmol/l)	1,91±0,20 [#]	1,61±0,17	1,93±0,21 [#]	1,57±0,22
GPT (IU/l)	25,87±1,71	28,86±1,58	27,33±1,80	30,62±2,39
GOT (IU/l)	22,73±2,35	28,07±1,99	25,27±3,42	26,93±1,99
cTroponin T (ng/l)	23,26±3,13	23,60±2,56	22,25±2,71	25,52±2,91
Szérum albumin (g/l)	44,20±0,56	44,82±0,53	45,45±0,58	46,05±0,51
Szérum vas (µmol/l)	15,11±1,10	14,27±1,13	15,54±1,08	14,83±1,02
Transf. sat. (%)	21,59±0,84	20,08±1,58	21,57±1,60	20,37±1,39
Szérum ferritin (µg/l)	151,1±19,61	148,2±18,46	138,5±20,52	133,6±15,85
CRP (mg/l)	4,66±0,50	5,33±0,83	4,23±0,67	4,94±0,73
FVS (G/l)	7,41±0,33	7,73±0,37	7,04±0,29	7,78±0,35
Htc (%)	42,00±1,02	41,71±0,90	41,69±1,06	41,89±0,94
Tct (G/l)	219,3±15,38	217,3±13,40	207,7±11,3	206,6±10,90

Az értékeket átlag± SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest (p<0,05). # = szignifikáns különbség a RES és a placebo csoport között (p<0,05). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban; CN: karbamid-nitrogén, CRP: C-reaktív protein, cTroponin T: kardiális Troponin T, FVS: fehérvérsejtszám, Htc: hematokrit, GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz, GPT: glutamát-piruvát-transzamináz, hematokrit, HDL-C: nagy denzitású lipoprotein, Hgb_{A1c}: glikált hemoglobin, LDL-C: alacsony denzitású lipoprotein, TC: összkoleszterin, Tct: vérlemezkeszám, Transf. sat.: transferrin szaturáció.

2. A gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek változása rezveratrol kezelés mellett

Az akut fázis fehérjék (CRP, ferritin) szintje és a fehérvérsejtszám nem változott szignifikánsan egyik ágon sem a 3 hónapos kezelés végén (4. táblázat). Ellenben az ELISA-val meghatározott IL-1 ($95,61 \pm 17,74$ pg/ml versus $140,65 \pm 24,04$ pg/ml, $p < 0,05$) és IL-6 ($5,42 \pm 0,35$ pg/ml versus $6,76 \pm 0,56$ pg/ml, $p < 0,05$) szintek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a RES csoportban a placebo-val összevetve 3 hónapos vizsgálati periódus végén (4. ábra).

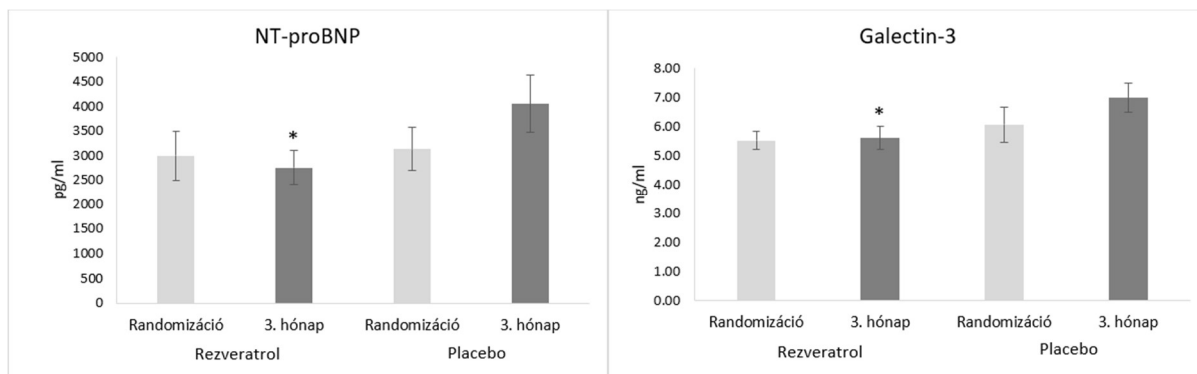


4. ábra. A rezveratrol hatása a gyulladáshoz kapcsolódó citokinekre. Az értékeket átlag \pm SEM formában adtuk meg.

* = szignifikáns különbség a RES ágon a placebo csoporthoz képest a 3. hónap végén ($p < 0,05$). Randomizáció: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban.

3. A szívelégtelenség specifikus biomarkereinek változása rezveratrol kezelés mellett

Az NT-proBNP szintek esetében nem volt különbség a két csoport között a randomizációkor (2998 ± 507 pg/ml versus 3139 ± 446 pg/ml, NS), azonban a vizsgálat végén már szignifikánsan alacsonyabbnak mértük a RES ágon az NT-proBNP értékeket a placebo-val összevetve (2760 ± 346 pg/ml versus 4054 ± 577 pg/ml, $p < 0,05$). Ezekből a változásokból arra következtetésre jutottunk, hogy a RES kezelés melletti állapotjavulás akadályozhatja a szívelégtelenség indukálta NT-proBNP emelkedést. Az NT-proBNP változással párhuzamosan, a galectin-3 szintek ($5,61 \pm 0,42$ ng/ml versus $6,98 \pm 0,54$ ng/ml, $p < 0,05$) esetén szintén szignifikáns különbséget mértünk a két csoport között a vizsgálat végén (5. ábra).



5. ábra. A rezveratrol hatása a szívelégtelenség specifikus biomarkereire. Az értékeket átlag± SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a RES ágon a placebo csoporthoz képest a 3. hónap végén ($p < 0,05$). Randomizáció: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban.

4. A BMI, a vérnyomás, a szívfrekvencia és az EKG paramétereinek változása rezveratrol kezelés hatására.

A testtömegindex (body mass index, BMI) változása nem változott szignifikánsan sem a RES ($29,31 \pm 0,99 \text{ kg/m}^2$ versus $29,06 \pm 1,01 \text{ kg/m}^2$, NS), sem a placebo ($31,04 \pm 1,46 \text{ kg/m}^2$ versus $31,34 \pm 1,39 \text{ kg/m}^2$, NS) ágon a 3 hónapos kezelés végén a kiindulási értékekkel összehasonlítva (5. táblázat). Nem találtunk továbbá szignifikáns változásokat az EKG paraméterek, a vérnyomás és a szívfrekvencia értékek esetében sem az 1 hónapos (az adatokat nem tüntettük fel), illetve a 3 hónapos mérések esetében (5. táblázat).

5. táblázat. A BMI, a vérnyomás, a szívfrekvencia és az EKG főbb paramétereinek változása rezveratrol kezelés mellett.

	Kiindulási paraméterek		3. hónap	
	Rezveratrol	Placebo	Rezveratrol	Placebo
Testsúly (kg)	85,53±3,09	89,97±5,06	84,77±3,19	90,80±4,77
BMI (kg/m²)	29,31 ± 0,99	31,04 ± 1,46	29,06 ± 1,01	31,34 ± 1,39
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	132,5±3,41	128,8±3,80	131,6±3,21	125,8±2,65
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	79,10±2,33	80,13±2,66	77,83±1,82	76,30±2,24
Szívfrekvencia (ütés/perc)	72,20±2,75	76,93±2,50	70,04±2,87	70,73±2,26
PQ (ms)	164,1±5,37	187,9±5,67	162,1±6,28	189,9±5,68
QRS (ms)	127,8±5,35	137,3±6,19	136,5±5,68	132,9±5,84
QTc (ms)	463,7±5,03	476,9±6,65	469,9±5,99	471,2±5,29

Az értékeket átlag ± SEM formában adtuk meg. A RES és a placebo csoport között nem volt szignifikáns különbség 3 hónapos kezelést követően. Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban; BMI: testtömegindex (body mass index), PQ: PQ távolság az EKG-n, QRS: a QRS komplexum szélessége az EKG-n, QTc: szívfrekvenciára korrigált QT távolság az EKG-

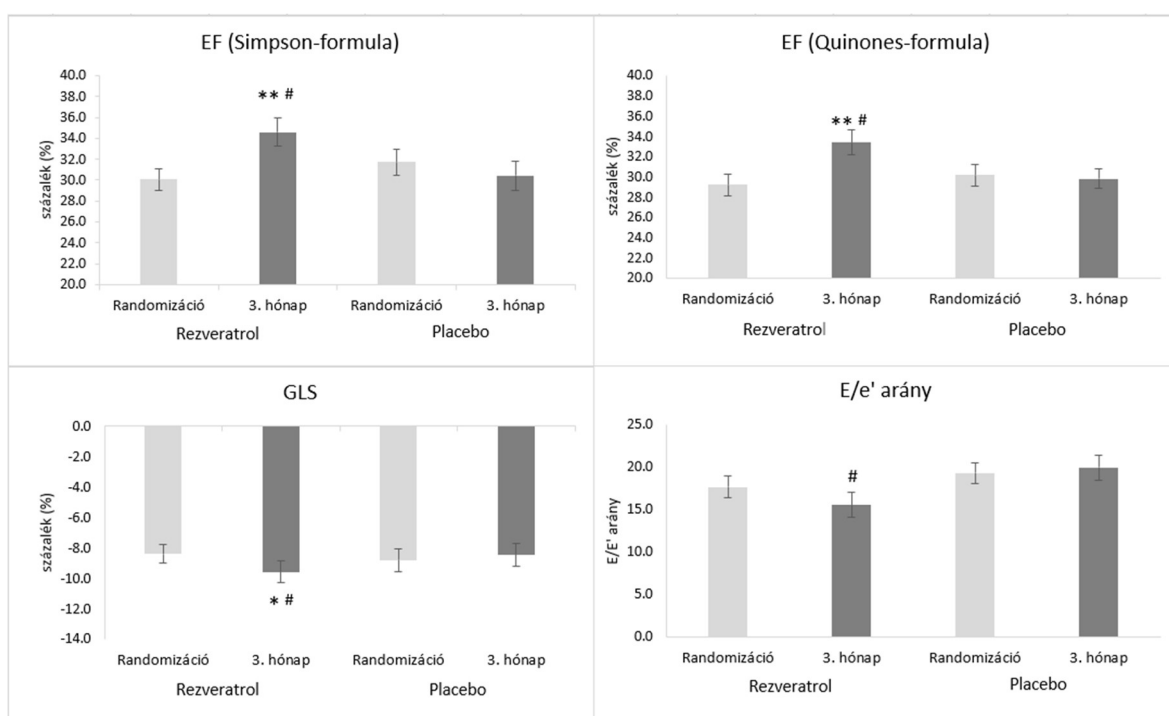
5. A rezveratrol hatása az echokardiográfiás paraméterekre

A vizsgálat kezdetén az echokardiográfiás paraméterek tekintetében nem volt statisztikailag kimutatható különbség a két csoport között. A két különböző módszerrel meghatározott szisztolés bal kamra funkció szignifikáns javulást mutatott a vizsgálat végén a kiindulási értékekhez viszonyítva a RES csoportban (Quinones-formula: 29,19±1,04 % versus 33,40±1,20 %, $p<0,01$ és Simpson-formula: 30,06±1,04 % versus 34,60±1,44 %, $p<0,01$) (6. táblázat, 6. ábra). Az EF-el párhuzamosan a bal kamrai verővolumen növekedése és a bal kamrai végszisztolés volumen (LVESV) csökkenése is megfigyelhető volt a RES ágon.

A diasztolés funkció tekintetében az E/A (1,18±0,15 versus 1,54±0,19, $p<0,05$) és az E/e' (15,55±1,43 versus 19,94±1,43, $p<0,05$) arányok szignifikáns különbséget mutattak a RES és a placebo csoport között a 3 hónapos kezelést követően. A bal kamrai globális longitudinális "strain" (GLS, %) szintén szignifikánsan javult (-8,40±0,62 % versus

-9,58±0,73 %, $p<0,05$) a kezelt ágon az kezelés végére a kiindulási értékekhez viszonyítva. A fentiekkel ellentétben a placebo ágon szignifikáns változás nem volt kimutatható (6. táblázat).

A bal pitvari végszisztolés volumen, a bal pitvari hossz, a jobb kamrai végdiasztolés átmérő, a jobb kamrai végszisztolés átmérő és a jobb kamrai végdiasztolés volumen is szignifikánsan csökkent a RES ágon a kiindulási értékekhez képest. Emellett a bal pitvari végdiasztolés volumen, a jobb pitvari végszisztolés volumen, a vena cava inferior átmérője és a jobb kamrai funkciót jellemző TAPSE is szignifikáns különbséget mutatott a két csoport között 3 hónap után (7. táblázat).



6. ábra. A rezveratrol hatásai a bal kamrai szisztolés és diasztolés funkcióra. Az értékeket átlag ± SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a rezveratrol ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p<0,05$). ** = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p<0,01$). # = szignifikáns különbség a RES és a placebo csoport között a vizsgálat végén ($p<0,05$). Randomizáció: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban. E: korai diasztolés kamrai telődési sebesség; e': mitrális annulusz felett mért korai diasztolés sebesség (septális és laterális annuluszon történt mérések átlaga); EF: ejekciós frakció; GLS: globális longitudinális strain.

6. táblázat. Bal kamrai echokardiográfiás paraméterek.

	Kiindulási paraméterek		3. hónap	
	Rezveratrol	Placebo	Rezveratrol	Placebo
EF (Quinones, %)	29,19±1,04	30,16±1,10	33,40±1,20** #	29,79±0,95
EF (Simson, %)	30,06±1,04	31,70±1,27	34,60±1,38** #	30,41±1,36
LVIDd (mm)	65,50±1,55	62,83±1,12	65,09±1,44	62,62±1,12
LVIDs (mm)	54,87±1,67	51,90±1,06	52,88±1,62	51,67±1,06
LVEDV (ml)	182,4±11,73	157,3±7,92	176,7±10,05	160,1±8,01
LVESV (ml)	129,0±9,37	106,7±5,80	116,3±8,00**	111,4±5,60
SV (ml)	52,85±2,82	50,69±3,38	60,46±3,13** #	48,56±3,84
SW (mm)	11,47±0,28	11,83±0,31	11,43±0,29	11,83±0,31
PW (mm)	11,03±0,17	11,17±0,20	11,20±0,17	11,14±0,21
GLS (%)	-8,40±0,62	-8,80±0,75	-9,58±0,73* #	-8,45±0,75
E (m/s)	0,89±0,04	0,98±0,05	0,80±0,05* #	1,00±0,05
A (m/s)	0,78±0,04	0,71±0,05	0,78±0,04	0,76±0,06
e' (m/s)	0,05±0,002	0,05±0,003	0,06±0,003	0,05±0,003
E/A arány	1,26±0,12	1,57±0,20	1,18±0,15#	1,54±0,19
E/e' arány	17,65±1,31	19,32±1,21	15,55±1,43#	19,94±1,43

Az értékeket átlag ± SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest (p<0,05). ** = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest (p<0,01). # = szignifikáns különbség a RES és a placebo csoport között a vizsgálat végén (p<0,05). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban. A: késői diasztolés kamrai telődési sebesség; E: korai diasztolés kamrai telődési sebesség; e': mitrális annulusz koradiasztolés elmozdulási sebessége (septális és laterális annuluszon történt mérések átlaga); EF: ejekciós frakció; GLS: globális longitudinális strain; LVEDV: bal kamrai végdiasztolés volumen; LVESV: bal kamrai végszisztolés volumen; LVIDd: bal kamra belső átmérője végdiasztolésben; LVIDs: bal kamra belső átmérője végszisztolésben; PW: hátsó fal vastagsága; SV: verővolumen; SW: septum falvastagsága.

7. táblázat. Jobb kamrai, jobb pitvari és bal pitvari echokardiográfiás paraméterek.

	Kiindulási paraméterek		3. hónap	
	Rezveratrol	Placebo	Rezveratrol	Placebo
RVIDd-középen (mm)	27,86±1,14	23,90±1,02	25,09±1,09	26,96±0,98*
RVIDd-bazálisan (mm)	37,43±1,43	34,14±1,10	34,83±1,12*	37,03±1,17*
RVIDs (mm)	30,34±1,21	29,43±1,26	28,00±1,05*	29,86±1,13
TAPSE (mm)	16,24±0,74	16,58±0,74	17,96±0,82 [#]	15,76±0,63
LA hossz tengely (mm)	64,03±1,68	64,21±1,25	61,79±1,72* [#]	64,17±1,14
LA rövid tengely (mm)	46,14±0,98	45,38±0,93	45,29±1,03	45,45±0,99
LA terület (cm²)	27,11±1,33	27,95±1,10	25,99±1,35	28,05±1,10
LAEDV (ml)	59,96±5,24	63,68±4,21	50,74±3,14 [#]	66,24±4,79
LAESV (ml)	87,52±5,37	87,95±4,69	78,12±3,99* [#]	88,00±4,92
RA hossz tengely (mm)	58,34±2,13	58,59±1,63	56,72±2,28	60,10±1,65
RA rövid tengely (mm)	41,34±1,21	41,00±1,11	39,86±1,37	40,31±1,04
RA terület (cm²)	21,20±2,12	21,28±1,30	20,08±2,09	21,56±1,33
RAEDV (ml)	42,87±4,44	44,24±5,18	34,50±3,47* [#]	43,14±4,68
RAESV (ml)	54,63±5,15	60,23±5,53	49,32±3,50 [#]	63,04±5,64
Vena cava inferior (mm)	16,08±1,01	17,38±0,97	15,24±0,89 [#]	18,79±0,84

Az értékeket átlag ± SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p < 0,05$). # = szignifikáns különbség a RES és a placebo csoport között a vizsgálat végén ($p < 0,05$). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban. LA: bal pitvar; LAEDV: bal pitvar végdiasztolés volumen; LAESV: bal pitvar végszisztolés volumen; RA: jobb pitvar; RAEDV: jobb pitvar végdiasztolés volumen; RAESV: jobb pitvar végszisztolés volumen; RVIDd: jobb kamra belső átmérője végdiasztolében, RVIDs: jobb kamra belső átmérője végszisztolében, TAPSE: trikuszipidális annulusz kitérése szisztolé során.

6. A rezveratrol hatása a betegek terhelhetőségére

A 6 perces járástávolság szignifikáns növekedését találtuk a RES csoportban az utánkövetési periódus végén az kiindulási mérésekhez viszonyítva (275±19 m versus 298±22 m, $p < 0,05$), azonban a placebo ágon érdemi változás nem volt észlelhető (NS).

7. A légzésfunkciós paraméterek változásai rezveratrol kezelés mellett

RES kezelés mellett szignifikánsan javult a FVC az utánkövetés végén ($75,38 \pm 3,31\%$ versus $79,27 \pm 3,07\%$, $p < 0,05$). Egyéb expiratórikus paraméter tekintetében nem láttunk változást 3 hónapot követően (8. táblázat), azonban a belégzésben mért IVC szintén növekedett RES kezelés mellett a vizsgálati periódus végére ($83,85 \pm 3,65\%$ versus $90,27 \pm 3,39\%$, $p < 0,05$) a kiindulási értékekhez viszonyítva.

8. táblázat. A rezveratrol hatása a légzésfunkciós paraméterekre.

	Kiindulási értékek		3. hónap	
	Rezveratrol	Placebo	Rezveratrol	Placebo
FVC (%)	75,38±3,31	74,41±3,75	79,27±3,07*	76,91±4,08
FEV ₁ (%)	64,67±3,22	65,10±3,67	67,38±3,00	65,90±3,98
FEV ₁ /FVC arány (%)	89,79±1,84	94,63±2,18	89,29±2,33	93,74±2,80
PEF (%)	56,50±3,01	55,91±3,67	57,13±3,28	59,09±3,89
FEF 25-75 (%)	55,92±3,79	55,50±3,80	55,81±3,98	58,38±4,82
MEF75 (%)	58,50±3,60	56,68±3,50	60,85±3,99	60,90±4,33
MEF50 (%)	55,65±4,10	52,95±3,83	55,35±3,77	57,14±4,09
MEF25 (%)	52,35±4,30	55,95±5,16	53,23±4,73	56,21±4,94
IVC (%)	83,35±3,65	81,32±3,60	90,27±3,39*	86,36±3,91

Az értékek átlag± SEM formában kerültek megadásra az egyénre kalkulált (nem, életkor, testsúly, testmagasság) referenciaértékek százalékában. * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p < 0,05$). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo ágon; 3. hónap: RES vagy placebo ágon 3 hónapos kezelés után mért értékek. FEF 25-75%: forszírozott kilégzési áramlás a kilégzési görbe 25-75%-nál; FEV₁: forszírozott kilégzési térfogat; FVC: forszírozott vitálkapacitás, IVC: inspiratórikus vitálkapacitás, MEF: maximális kilégzési áramlás az FVC 25%, 50% vagy 75%-nál; PEF: csúcs kilégzési áramlás.

8. A rezveratrol hatása a szívelégtelen betegek életminőségére

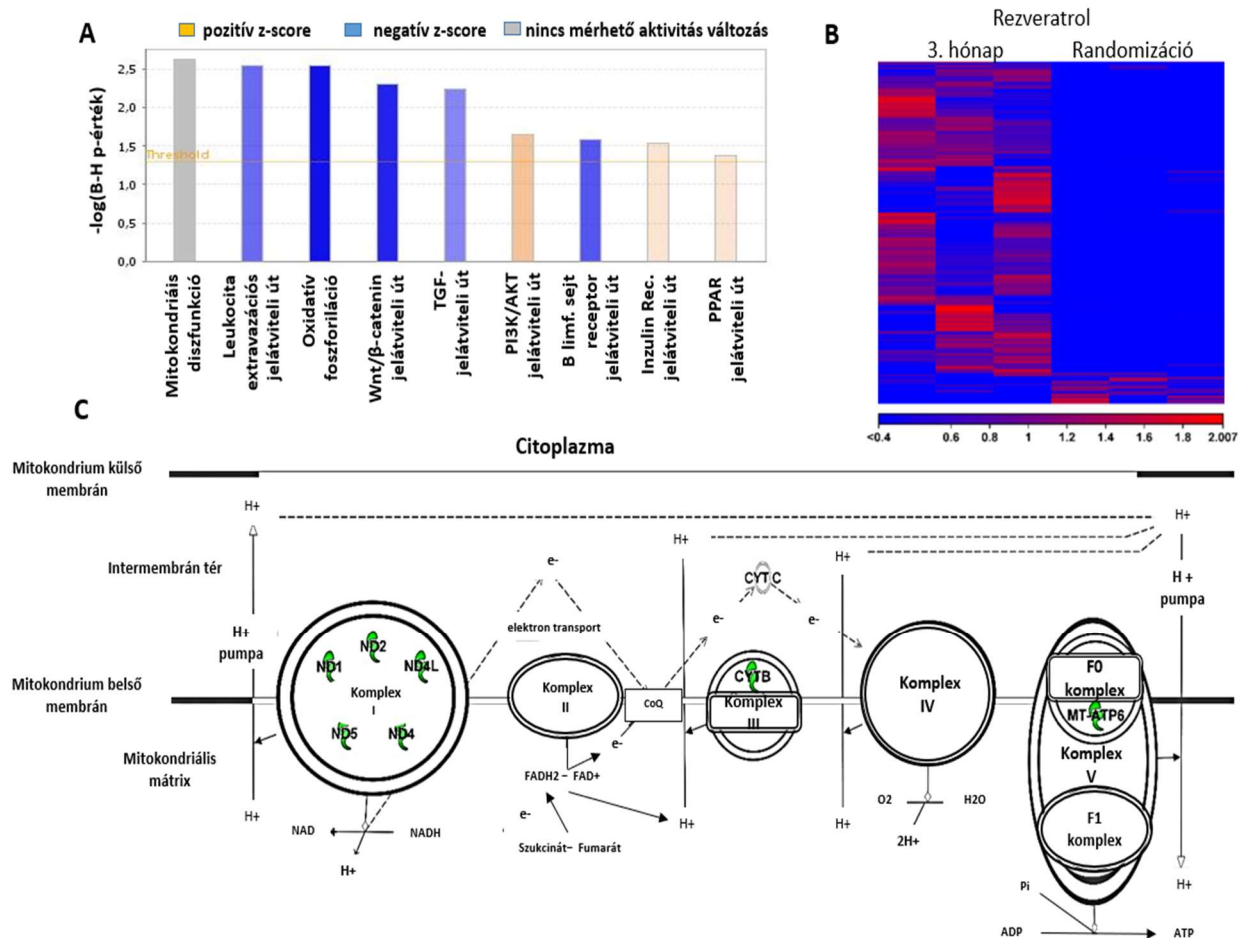
A betegek életminőségének meghatározására az EQ-5D kérdőívet alkalmaztuk. A kérdőív fő elemei tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között a vizsgálat kezdetén. Non-parametrikus statisztikai analízisünkkel a RES csoportban 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez viszonyítva szignifikáns javulást találtunk a mozgékonyság ($Z = -2,236$, $p < 0,05$), a szokásos napi aktivitás ($Z = -2,646$, $p < 0,05$) és a szorongás/depresszió érzés ($Z = -2,236$, $p < 0,05$) tekintetében, azonban az

önellátás és a fájdalom/diszkomfortérzés kapcsán értékelhető változást nem tudunk kimutatni. Ha összegezve nézzük az életminőséget, akkor elmondható, hogy RES kezelés mellett szignifikánsan javult egy 0-100-ig terjedő skálán a betegek szubjektív egészségi állapota ($54,86 \pm 2,78\%$ versus $61,17 \pm 2,72\%$; $Z = -3,146$, $p=0,002$), azonban ezen változás már nem volt kimutatható a placebo ágon ($49,43 \pm 3,15\%$ versus $48,17 \pm 3,34\%$; $Z=-0,631$, NS).

9. Szekvencia analízis és a differenciál expresszió eredményei

A 7 betegnél elvégzett mRNS analízis alapján 3 hónap után a RES ágon 222 gén esetében találtunk eltérő expressziós mintázatot a kiindulási mérésekhez képest (FC abszolút érték $>1,5$; $p<0,05$), ezeket a 7/A és a 7/B ábrákon szemléltettük.

Az elemzés során legfontosabb felfedezésnek azonban az tekinthető, hogy a fehérvérsejtek mitokondriális légzési láncában 7 gén esetében a RES gátolta azok expresszióját. Ezen gének voltak az MT-ATP6 (ATP szintáz F0 6. alegysége a Komplex V-ben), az MT-CYB (citokróm b), az MT-ND1 (NADH dehidrogenáz, 1. alegysége a Komplex I-ben), az MT-ND2 (NADH dehidrogenáz, 2. alegysége a Komplex I-ben), az MT-ND4 (NADH dehidrogenáz, 4. alegysége a Komplex I-ben), az MT-ND5 (NADH dehidrogenáz, 5. alegysége a Komplex I-ben) és az MT-ND4L (NADH dehidrogenáz, 4L. alegysége a Komplex I-ben) (7/C ábra). A fentiekkel ellentétben a Komplex II és a Komplex IV működését érdemben nem befolyásolta a RES kezelés. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a RES terápia az oxidatív foszforiláció aktivitásának mérséklésén (ATP szintézis csökken) keresztül gátolta a leukociták aktivitását, azonban a leírt változás nem vezetett mitokondriális diszfunkcióhoz, mivel a mitokondriális minőségkontrollhoz szükséges fehérjék működését a RES nem befolyásolta érdemben (7/A ábra).



7. ábra. (A) RES kezelés hatására bekövetkező génexpressziós változások az egyes jelátviteli útvonalakon ($n = 7$). Az oszlopok színe az adott jelátviteli út génexpressziós változásaiból következő aktivitási állapotot reprezentálja Z-score kalkuláció alapján (kék szín: csökkenés, narancssárga: növekedés, szürke: nincs változás). (B) A RES kezelés indukálta génexpressziós változások humán fehérvérsejtekben. A differenciálisan expresszáldott gének (DEG) expressziós értékeinek változásait hőtétképen szemléltettük (csak a 3 leglátványosabb mintázatot tüntettük fel). (C) A RES hatása az elektron transzport láncra (ETC) human leukocitákon. Az oxidatív foszforiláció ábrázolása során megjelöltük (zöld szín) az ETC azon génjeit, melyek RES kezelés hatására szupresszáldottak. ADP: adenzin-difoszfát; ATP: adenzin-trifoszfát; CoQ: koenzim Q; MT-ATP6: mitokondriális ATP szintáz génje; NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid, ND: NADH dehidrogenáz, CYT: citokrom.

10. Hemoreológiai változások rezveratrol kezelés hatására

10.1. Hemoreológiai paraméterek

A vizsgált populációban kiinduláskor a VV magasabb volt ($p < 0,05$) a szívelégtelen betegek között a kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban a Htc és PV tekintetében ilyen különbséget nem találtunk. Eredményeink alapján a vizsgálati populációban nem volt különbség a Htc, PV és VV tekintetében a két vizsgált csoport (RES és placebo) között sem a kiinduláskor, sem 3 hónapot követően (9. táblázat).

A vvt aggregáció esetében az AI és a küszöb nyírási sebességgrádiens (γ) szignifikánsan magasabb volt, míg a $t_{1/2}$ kisebb értéket vett fel mindkét vizsgált csoportban (RES és placebo) a kontroll csoporthoz képest kiinduláskor ($p < 0,05$). A Myrenne aggregométerrel mért M_1 ($13,96 \pm 0,42$ versus $13,46 \pm 0,40$, $p < 0,05$), valamint a LORCA-val mért AI ($73,36 \pm 1,02$ versus $70,55 \pm 0,99$, $p < 0,05$) és γ ($161,9 \pm 11,02$ versus $133,7 \pm 7,25$, $p < 0,05$) értékek szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető a RES kezelést követően, emellett a $t_{1/2}$ esetén ugyancsak kedvező változásokat láttunk ($1,23 \pm 0,08$ versus $1,45 \pm 0,08$, $p < 0,05$) a 3 hónapos mérések során a kiindulási értékekhez viszonyítva (9. táblázat, 8. ábra).

A vvt deformabilitás nem mutatott szignifikáns változást az alkalmazott nyírófeszültségek mellett egyik csoportban sem a 3 hónapos utánkövetés során (10. táblázat), azonban a mért EI értékek tekintetében magasabb nyírófeszültség mellett némi növekvő tendencia megfigyelhető volt a RES ágon.

9. táblázat. A rezveratrol hatása a hemoreológiai paraméterekre.

	Kiindulási paraméterek			3. hónap	
	Kontroll N=20	Rezveratrol N=30	Placebo N=30	Rezveratrol N=30	Placebo N=30
Htc (%)	43,35±0,63	45,03±0,98	44,93±0,98	44,76±0,93	44,10±1,02
VV (mPas)	4,04±0,07	4,59±0,13 [#]	4,55±0,14 [#]	4,45±0,13	4,42±0,13
PV (mPas)	1,28±0,02	1,34±0,02	1,31±0,02	1,32±0,02	1,32±0,02
<u>Aggregáció (Myrenne):</u>					
M	5,91±0,25	6,02±0,36	6,38±0,28	5,90±0,31	6,36±0,28
M₁	13,77±0,78	13,96±0,42	14,14±0,47	13,46±0,40*	13,84±0,51
<u>Aggregáció (LORCA):</u>					
AI	69,37±1,1	73,36±1,02 [#]	72,08±1,04 [#]	70,55±0,99*	70,15±1,14
t_{1/2} (s)	1,57±0,11	1,23±0,08 [#]	1,34±0,09 [#]	1,45±0,08*	1,51±0,11
γ (1/s)	112,7±4,43	161,9±11,02 [#]	160,4±12,54 [#]	133,7±7,25*	138,6±9,12

Az értékeket átlag± SEM formában adtuk meg. [#]=szignifikáns különbség a RES vagy placebo csoportban a kontroll csoporthoz képest kiinduláskor; * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p < 0,05$). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban; AI: aggregációs index; $t_{1/2}$ (s): aggregációs féleletidő; M és M_1 értékek: Myrenne aggregométerrel meghatározott, eltérő rotációs sebesség mellett mért aggregációs indexek; PV: plazma viszkozitás; VV: teljes vérviszkozitás; γ (1/s): küszöb nyírási sebességgrádiens.

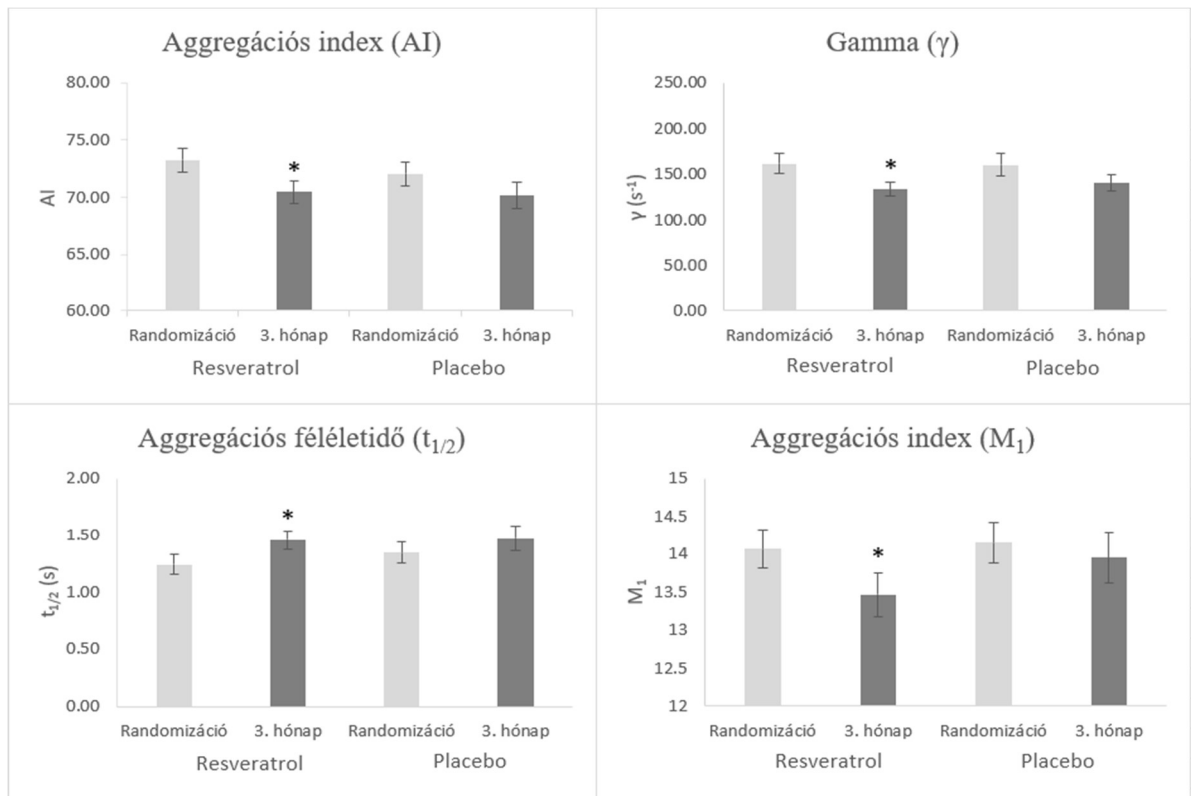
10.2. A hemoreológiai paraméterek változása és a 6 perces járástávolság közötti összefüggések

A htc ($r=0,343$, $p<0,05$) és a VV ($r=0,308$, $p<0,05$) változásai moderált pozitív korrelációt mutattak a 6 perces séta során felvett értékekkel a RES ágon. Emellett kedvező szignifikáns kapcsolatokat találtunk a kezelt csoportban a vvt aggregáció és a 6MWT értékek között 3 hónapos RES adást követően: alacsonyabb M1 aggregációs index ($r=-0,269$, $p<0,05$) és alacsonyabb γ ($-0,417$, $p<0,05$) mellett nagyobb járástávolság volt megfigyelhető. Ráadásul ugyanebben az alcsoportban szignifikáns pozitív korreláció volt megfigyelhető a 6MWT és a magas nyírófeszültség mellett felvett EI értékek között (EI30: $r=0,480$, $p<0,005$). A placebo ágon nem igazolódott szignifikáns korreláció a reológiai paraméterek változása és a 6MWT között.

10. táblázat. A rezveratrol hatása a vörösvértest deformabilitásra.

Nyírófeszültség	Kiindulási paraméterek		3. hónap	
	Rezveratrol (EI)	Placebo (EI)	Rezveratrol (EI)	Placebo (EI)
30 (Pa)	0,619±0,003	0,623±0,001	0,621±0,002	0,623±0,001
3 (Pa)	0,415±0,004	0,420±0,003	0,414±0,004	0,422±0,003
0,3 (Pa)	0,008±0,009	0,009±0,006	0,005±0,007	0,009±0,006

Az értékeket átlag± SEM formában adtuk meg. A kiindulási értékekhez viszonyítva nem volt szignifikáns változás az alkalmazott nyírófeszültségek mellett sem a RES, sem a placebo csoportban 3 hónapos kezelést követően. Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban; EI: elongációs index; Pa: pascal.



8. ábra. A rezveratrol hatása a vörösvértest aggregációra. Az értékeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. * = szignifikáns különbség a RES ágon 3 hónapos kezelést követően a kiindulási értékekhez képest ($p < 0,05$). Kiindulási paraméterek: a randomizáció során mért értékek a RES vagy placebo csoportban; 3. hónap: mért értékek 3 hónapos kezelést követően a RES vagy placebo csoportban; AI: aggregációs index; $t_{1/2}$ (s): maximális aggregáció felének eléréséhez szükséges idő; M_1 értékek: Myrenne aggregométerrel meghatározott 3 s^{-1} rotációs sebesség mellett mért aggregációs indexek; γ ($1/\text{s}$): küszöb nyírási sebességgradiens.

VII. Diszkusszió

1. A rezveratrol javítja a szívelégtelen betegek kardiális paramétereit a gyulladáshoz vezető folyamatok mérséklésén keresztül

Munkánk során elsőként igazoltuk randomizált, kettősvak humán klinikai vizsgálattal (RCT) a RES kedvező hatásait szívelégtelen betegekben. A tanulmány legfőbb eredményei közé soroljuk, hogy RES kezelés hatására javult a szív funkciója, a betegek terhelhetősége, életminősége és számos légzésfunkciós paramétere, emellett a RES kedvezően befolyásolta a lipid profilt és csökkentette gyulladáshoz vezető citokinek szintjét a vizsgált HFREF betegpopulációban.

A RES kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett számos jótékony hatása ismert az irodalomban. A RES jelentős antioxidáns hatással rendelkezik részben gyökfogó (“scavenger”) tulajdonságának, részben az antioxidáns enzimek termelésének fokozása révén (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, eNOS), ráadásul képes csökkenteni a prooxidáns, gyökképző enzimek szintjét (NADPH oxidázok, mieloperoxidáz) [73-75]. A fenti mechanizmusokból adódóan a RES erős antiinflammatorikus és vérlemezke aggregáció gátló hatással is rendelkezik [76-78]. Fontosak továbbá a metabolikus paraméterekre gyakorolt kedvező hatásai is, melyek közül kiemelendő a koleszterinszint csökkentése és az inzulin rezisztencia mérséklése [79,80]. A leírt effektusok azonban szinte teljes egészében preklinikai vizsgálatokon alapulnak.

Munkacsoportunk egy korábbi publikációjában posztinfarktusos szívelégtelen betegekben a RES javította a szív pumpafunkcióját, valamint visszafogta a fibrotikus remodelling folyamatát, melynek hátterében a profibrotikus intracelluláris jelátviteli utak blokkolása, valamint antiinflammatorikus hatás állhatott [44]. Más kutatócsoportok is hasonló eredményeket publikáltak kísérletes szívelégtelen modelleken végzett vizsgálataik eredményeképp [23,25].

Jelen egycentrumos, kettősvak, randomizált klinikai vizsgálatunkban a résztvevő tünetes, szisztolés szívelégtelenség (HFREF) betegpopuláció kiindulási klinikai jellemzői között nem volt statisztikailag jelentős különbség (a randomizációt úgynevezett “adaptive minimization” módszerrel végeztük) [81]. A betegek a nemzetközi irányelveknek megfelelő, maximálisan tolerálható gyógyszeres kezelésben részesültek a randomizációt megelőzően és

dózismódosítás nélkül a vizsgálat teljes időtartama alatt. Kiemelendő, hogy szinte az összes résztvevő kapott ACE-gátló (vagy ARB) és béta-receptor blokkoló terápiát, emellett a betegek jelentős része MRA kezelésben is részesült, mely összhangban van az aktuális irányelvekkel (1. táblázat).

Vizsgálatunkban résztvevő szívelégtelen betegeinknél a RES adás javította a szisztolés bal kamrai funkciót, melyet az ejekciós frakcióval (EF) jellemeztünk. Az EF két eltérő módszerrel került meghatározásra, egyrészt az úgynevezett Quinones-formulát, másrészt a volumetrikus Simpson-módszert alkalmaztuk. A Quinones-formulát a klasszikus Teichholz-módszer helyett használtuk, mivel irodalmi adatok alapján az előbbi metódus jobban korrelál a volumetrikus EF mérésekkel [82]. Összegezve azonban elmondható, hogy manapság messze a volumetrikus Simpson-módszer a leggyakrabban használt módszer a szisztolés bal kamrai funkció meghatározására. Vizsgálatunkban az EF hasonló mértékű, szignifikáns növekedése volt tapasztalható mindkét metódus esetében a RES-el kezelt csoportban, míg a placebo ágon nem volt megfigyelhető ezen változás.

A GLS meghatározás szintén egy jól bevált módszer a globális bal kamra funkció jellemzésére, ráadásul a kapott értékek igazoltan jó korrelációt mutatnak a miokardiális remodelling mértékével és a fibrózis kiterjedésével HFrEF-ben [83]. Vizsgálatunkban a placebo ágon a GLS értéke nem mutatott változást a vizsgálati periódus végén, azonban a RES-el kezelt betegeknek a GLS egyértelmű javulását láttuk, mely összhangban van a fentiekben már ismertetett EF kedvező irányú változásával. A szisztolés bal kamra funkcióval párhuzamosan a bal kamra diasztolés funkció javulását is tapasztaltuk a RES-el kezelt ágon (pl. az E/e' arány csökkent), míg a placebo ágon a diasztolés funkció változatlan maradt.

A szívelégtelenség számos állatkísérletes modelljében a természetes polifenolok javították a szív pumpafunkcióját [84-86], azonban humán klinikai vizsgálat tekintetében csak kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a RES bal kamra funkcióra gyakorolt hatásaival kapcsolatban. Munkacsoportunk egy korábbi publikációjában krónikus koronária szindrómás betegpopulációban alkalmazott kis dózisú (napi 10 mg) RES kezelés mellett javult a diasztolés bal kamra funkció, míg a szisztolés bal kamra funkció tekintetében nem volt szignifikáns javulás, ellenben egy kedvező tendencia volt megfigyelhető [45].

Azonban nemcsak a szív pumpafunkciója, hanem a betegek 6 perces járásteszttel meghatározott terhelhetősége is szignifikánsan javult 3 hónapos RES kezelést követően. Eredményeink összhangban vannak az irodalomban fellelhető állatkísérletes modelleken végzett preklinikai vizsgálatokkal [87], azonban fontos kiemelni, hogy a RES fizikai

terhelhetőségre gyakorolt hatásáról szívelégtelenségben ezidáig nem álltak rendelkezésre humán klinikai adatok. Egy vizsgálatban, melyet Voduc és munkatársai publikáltak, egészséges embereken a RES-nek nem volt érdemi pozitív hatása a terhelési kapacitásra és a maximális oxigénfogyasztásra (VO_2max) [88]. Ezenfelül Glieman és munkatársai azt találták, hogy idősebb férfiaknál a RES terápia mérsékelte a testmozgás pozitív kardiovaszkuláris hatásait és visszafogta az edzésprogram során tapasztalt VO_2max növekedést [89]. A fentiek alapján a vizsgálatunkban a szívelégtelen betegek növekvő terhelhetőségét elsősorban a szív pumpafunkciójának javulásával magyarázzuk.

A kardiális biomarkerek elemzése még inkább alátámasztotta a pumpafunkció és a terhelhetőség vizsgálata során kapott eredményeinket. A makrofágok által szekretált galectin-3 mediátor szerepe jól ismert a szívizomban lejátszódó fibrózis és gyulladásos folyamatok tekintetében [90], melyet humán klinikai vizsgálat során is igazoltak [91]. Vizsgálatunkban RES kezelés hatására a placebo ághoz képest szignifikánsan csökkent a galectin-3 szintje az utánkövetési periódus végére. Mivel a korábban leírt GLS értékek egyenesen arányosak az intersticiális fibrózis mértékével, ezen eredményünk is alátámasztja, erősíti a GLS esetében látott kedvező változásokat [83].

Az NT-proBNP a legszélesebb körben használt biomarker a szívelégtelenség diagnosztikájában és rizikó stratifikációjában. Az NT-proBNP értéke szoros korrelációt mutat a szívelégtelenség súlyosságával, bár szintjét az aktuális volumenstátusz, a kor, a nem, a testsúly vagy éppen egyes ritmuszavarok (pl. a pitvarfibrilláció) is erősen befolyásolja, így értéke széles tartományban mozoghat. Vizsgálatunkban a RES ágon enyhe, de nem szignifikáns csökkenés, míg a placebo ágon tendenciaszerű növekedés volt látható az NT-proBNP szintjében, így a kezelési periódus végére szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a RES ágon a placebo csoporttal összehasonlítva. Militararu és munkatársai stabil koszorúér-betegeken végzett korábbi tanulmányukban azt találták, hogy a RES klinikailag manifeszt, tüneteket okozó szívelégtelenség jelenléte nélkül is képes csökkenteni az NT-proBNP szintet [92]. A szívelégtelenség biomarkereinek (NT-proBNP és galectin-3) placebo ágon tapasztalt folyamatos, lassú növekedése a betegség progressziójának a következménye lehet. Irodalmi adatok alapján a NT-proBNP szint és a szívelégtelenség miatt hospitalizáció, illetve mortalitás között egyenes arányosság mutatható ki [93].

A RES-el kezelt csoportban tapasztalt szisztolés bal kamra funkció javulása a volumen retenció és szervekben észlelhető pangás csökkenésével szoros összhangban van. Jól ismert, a tüdőben megfigyelhető extravazális, intersticiális folyadék felhalmozódás kedvezőtlenül befolyásolja a ventilációs paramétereket (pl. FVC, IVC) [94,95]. Gehlback és munkatársai

azt találták, hogy a szívtranszplantáción átesett betegeknél nemcsak a ventilációs volumenek, hanem az áramlási sebességek (FEV₁) is jelentős javulást mutattak [95]. Vizsgálatunkban az FVC és az IVC szignifikáns növekedését mértük 3 hónapos RES kezelést követően, azonban a légúti obstrukciót reprezentáló áramlási paraméterek nem mutattak statisztikailag jelentős változást. Mindössze a FEV₁ értéknél láttunk enyhe fokú, de nem szignifikáns növekedést a RES ágon.

A vizsgált gyulladásos citokinek (IL-1, IL-6) szintjei szignifikáns csökkenést mutattak a RES csoportban a placebo ággal összevetve a 3 hónapos kezelést követően, mely megfelel az irodalomban fellelhető eredményeknek [96]. A fenti kedvező változások parallelnak tekinthetők a gyulladásos folyamatok mediálásában résztvevő galectin-3 β szintjének mozgásával. Egy korábbi vizsgálat ráadásul igazolta, hogy az aktivált leukociták által termelt gyulladásos citokinek szintje fordítottan arányos a szisztolés bal kamrai funkcióval [97]. A gyulladásos folyamatok és a kardiovaszkuláris események közötti szoros korreláció jól dokumentált az irodalomban. Számos eredmény támasztja alá, hogy a tartós proinflammatorikus citokin válasznak a szívelégtelenség progressziójában igen komoly szerepe van, mivel a betegség előrehaladtával a proinflammatorikus citokinek mindvégig jelen vannak és szintjük folyamatosan emelkedő tendenciát mutat [98]. A fentiek fényében a placebo csoportban látható emelkedő IL-1 és IL-6 szinteket a szívelégtelenség lassú progressziójával tudjuk magyarázni.

Kiegészítésként elvégeztük néhány RES-el kezelt betegünk fehérvérsejtjeinek messenger RNS profil meghatározását és analízisét, mely több, a mitokondriális légzési lánc elemeit kódoló gén expressziójának szignifikáns csökkenését mutatta. Fontos azonban kihangsúlyozni, hogy a RES kezelés a mitokondriális minőségkontrollhoz szükséges fehérjék működését nem befolyásolta érdemben, így nem vezetett mitokondriális diszfunkcióhoz. A kapott eredmények alapján feltételezzük, hogy a RES a légzési lánc egyes elemeinek csökkent termelődésén keresztül mérsékli az oxidatív foszforilációt (csökkenti az ATP szintézist), mely a leukociták csökkent aktivitását vonja maga után. A fentiekben ismertetett csökkenő proinflammatorikus citokin szinteket pedig a leukociták mérséklődő aktivitásának jeleként foghatjuk fel. Az ismertetett antiinflammatorikus hatás a RES terápia egyik fontos hatásmechanizmusa lehet szívelégtelenségben a már jól ismert, kardiomiocitákra gyakorolt mitokondriális protektív hatások mellett.

2. Hemoreológiai változások rezveratrol kezelés során csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenségben

A tanulmány során külön figyelmet szenteltünk, ezért már a tervezéskor külön kérdésfeltevés formájában fogalmaztuk meg a hemoreológiai paraméterek változásait RES kezelést követően HFrEF populációban. A szívelégtelenség során megváltozó hemoreológiai paraméterek fontos szerepet tölthetnek be a mikrocirkuláció komplex károsodásában és a szívelégtelenség további progressziójában. Korábbi vizsgálatok során már sikerült igazolni szívelégtelen betegeknél a hemoreológiai faktorok (VV, fibrinogén, vvt aggregáció és deformabilitás) romlását [58]. Szívelégtelenségben a romló perifériás keringés, a károsodott oxigén transzport (hipoxia) és megnövekedett oxidatív stressz lehet elsősorban felelős a vvt-k rendellenességéért [57,58,63]. Az oxidatív stressz a vvt-ben morfológiai, funkcionális és metabolikus abnormalitásokat idéz elő, mely magában foglalja a vvt aggregáció és deformabilitás károsodását is [63,99]. A ROS hatására a citoskeletális és membrán fehérjék oxidációja, valamint lipidperoxidáció megy végbe, ezen folyamatok pedig kóros mértékű vvt adherenciához és aggregabilitáshoz vezetnek [100]. Jelen vizsgálat során kapott eredményeink igazolták a megnövekedett vvt aggregációt szívelégtelen betegek körében összevetve a hasonló korú, de nem szívelégtelen, közepes kardiovaszkuláris rizikóprofíllal rendelkező betegpopulációval (9. táblázat). Emellett a hipoxia okozta htc emelkedés (megnövekedett eritrocita termelés) és magasabb vér viszkozitás is leírásra került már szívelégtelenségben [49,58], bár a betegség előrehaladottabb stádiumában a htc gyakran inkább csökkenő tendenciát mutat a megnövekedett vérplazma volumen (hemodilúció), a vashiány, valamint a kóros mennyiségű citokin és ROS termelődés okozta csontvelő depresszió következtében [101,102].

Irodalmi adatok alapján a RES-nek szerepe lehet a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának megelőzésében. A vörösbortétel esetében is a kardioprotektív hatásért (francia paradoxon) elsősorban a RES-t teszik felelőssé. A bioaktív polifenolok közé tartozó RES ismert antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, állatkísérletes modellekben gátolta az oxidatív stresszt és feltehetően hozzájárult a szív strukturális és funkcionális állapotának megőrzéséhez [22,24,25]. További állatkísérletes modellekben a RES növelte az vvt-k stabilitását az ozmotikus fragilitás csökkentése révén [103]. A fentiek mellett a RES protektív hatást gyakorolt az endoteliális funkcióra és értágító tulajdonságokkal is rendelkezett [25]. Munkacsoportunk által korábban végzett humán vizsgálatban igazolt endoteliális diszfunkcióval rendelkező betegek körében a RES kezelés javította a vaszkuláris

relaxációt [45]. Irodalmi adatok alapján a RES befolyásolja továbbá a vérplazmában lévő proteinek tulajdonságait is, többek között megvédi a fibrinogént a kóros konformációs változásoktól [104-106], mely szintén hatással lehet a vvt aggregációra.

A moderált vörösbor fogyasztás, valamint magának a RES-nek a hemoreológiai paraméterekre gyakorolt közvetlen hatásait korábban már vizsgálták számos kísérletes és humán tanulmányban. A munkacsoportunk által néhány éve végzett in vivo vizsgálatban a moderált vörösbor fogyasztás kedvezően befolyásolta a vvt aggregációt és deformabilitást egészséges önkénteseken. Ezenfelül egy másik vizsgálatunkban 3 hónapon át napi 10 mg dózisban alkalmazott RES javította a vvt deformabilitást és a vérlemezke aggregációt krónikus iszkémiás szívbetegségben szenvedő populációban. Amint az már korábban említésre került, a RES és a reológiai paraméterek közötti kapcsolatot már széles körben vizsgálták, azonban kifejezetten humán szívelégtelen betegpopulációban ezidáig ilyen jellegű tanulmány nem történt [47,107,108].

Vizsgálatunk során a 3 hónapos RES kezelést követően a következő eredményeket találtuk: (1) A vvt aggregáció szignifikánsan csökkent RES kezelés hatására; (2) a makroreológiai paraméterek statisztikailag mérhető változást nem mutattak; (3) statisztikai kapcsolat volt kimutatható a 6 perces járástávolság és egyes hemoreológia paraméterek (vvt aggregáció és deformabilitás, htc és VV) együttes, kedvező irányú változásai között.

Elemzésünk alapján nem találtunk szignifikáns változást a htc, VV és PV értékeknél 3 hónapos RES kezelés után. A kapott eredmények megfelelnek egy korábbi, a munkacsoportunk által RES-el végzett vizsgálat eredményeinek [45].

A fentiekkel ellentétben a vvt aggregáció esetében több módszerrel meghatározott paraméterek alapján szignifikáns javulást találtunk RES terápiát követően. Eredményeink alapján – melyek megerősítenek egy korábbi vizsgálatot [58] – a vvt aggregáció szignifikánsan károsodik szívelégtelenségben, azonban jelen vizsgálatunk alapján RES kezelés mellett ezek a kedvezőtlen változások részben visszafordíthatóak. Meg kell azonban említeni, hogy habár némi különbség fellelhető a két módszerrel (LORCA és Myrenne) kapott aggregációs eredményekben, ezek valószínűleg a két műszer eltérő pontosságának és működési elvének következményei lehetnek [69].

Véleményünk szerint a csökkent vvt aggregáció részben a RES antioxidáns tulajdonságainak, részben a plazmafehérjékre gyakorolt hatásainak tudható be. Az egyik szélesebb körben elfogadott teória alapján a vvt aggregáció a szomszédos sejtek között speciális plazmafehérjéken (pl. fibrinogén, nagy molekula súlyú globulinok) keresztül létrejövő kapcsolat következménye, melyet nagy mértékben befolyásol a fibrinogén

koncentrációja és a vvt membránhoz való speciális kötődése. Jól ismert, hogy a polifenolok rossz vízoldhatóságuk miatt kötődnek a plazmafehérjékhez. Mivel a RES feltehetően megváltoztatja a plazmafehérjék és vvt-k felszíni molekuláinak egyes tulajdonságait, ezáltal redukálja a sejtek közötti keresztkötések kialakulását és csökkenti a vvt aggregációt [105-107]. A vvt aggregáció csökkenése pozitívan befolyásolhatja a koronária mikrocirkuláció áramlási tulajdonságait, melynek javulása fontos szempont lehet szívelégtelenségben.

Vizsgáltunk során egyetlen ektacitóméterrel meghatározott paraméterrel sem tudtuk a vvt deformabilitás szignifikáns változását kimutatni az alkalmazott RES kezelést követően, azonban a mért EI értékek tekintetében magasabb nyírófeszültség mellett némi növekvő tendencia megfigyelhető volt a RES ágon.

A 6MWT egy rutin diagnosztikus módszer a szívelégtelen beteg terhelhetőségének felmérésére. Az általunk végzett kettősvak, randomizált, placebo-kontrollált vizsgálatban RES kezelés mellett 3 hónap után javult a résztvevők járástávolsága, mely egyezik egy korábbi vizsgálat eredményével [89]. Ráadásul korreláció volt kimutatható a betegek javuló funkcionális kapacitása és egyes hemoreológiai paraméterek kedvező irányú változásai között. A fentiek alapján feltételezzük, hogy a RES kezelés mellett javuló reológiai paraméterek részben hozzájárulhattak a járástávolság kimutatható növekedéshez.

VIII. Következtetések

Humán klinikai vizsgálatunk során igazoltuk a standard kezelés mellett alkalmazott RES pozitív hatásait csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenségben. A RES kezelés mellett javult számos kardiális pumpafunkciót jellemző paraméter, emellett javult a betegek terhelhetősége és életminősége. A fentieken túl vizsgálatunkban a citokin szintek (IL-1, IL-6) csökkenésével alátámasztottuk a RES antiinflammatorikus hatását. Eredményeink alapján ennek hátterében a leukocita aktivitás csökkentése is fontos mechanizmus lehet, és egyértelműen hozzájárulhat a RES kardioprotektív hatásához. Tanulmányunk során bizonyítottuk továbbá a RES vvt aggregációra kifejtett jótékony hatását szisztolés szívelégtelen betegpopulációban. A csökkent vvt aggregáció pozitívan befolyásolhatja a mikrocirkulációs keringést, a szöveti perfúziót és az oxigenizációt, mely hozzájárulhat a perifériás erek (ezen belül a koronáriák) áramlási viszonyainak javulásához, ezen változások pedig együttesen pozitívan hathatnak a betegek terhelési kapacitására és tüneteire csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenségben.

IX. Új eredmények

1. Elsőként igazoltuk randomizált, kettősvak klinikai vizsgálat (RCT) keretében közepes dózisú RES kedvező hatásait humán szívelégtelen (HFrEF) populációban.
2. A tanulmány legfőbb eredményei közé soroljuk, hogy RES kezelés hatására egyaránt javult a szív szisztolés és diasztolés funkciója, megállapításainkat több különböző módszerrel is alátámasztottuk.
3. A kardiális funkcióval párhuzamosan javult a betegek terhelhetősége, életminősége, valamint számos légzésfunkciós paramétere RES kezelést követően.
4. Vizsgálatunkban a citokin szintek (IL-1, IL-6) csökkenésével igazoltuk a RES antiinflammatorikus hatását.
5. Fehérvérsejteken végzett mRNS szekvencia analízisünk során bizonyítottuk számos gén RES kezelés hatására végbemenő expressziós profiljának megváltozását.
6. Eredményeink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a leukocita aktivitás csökkentése szintén egy fontos mechanizmus lehet és hozzájárulhat a RES kardioprotektív hatásához.
7. Elsőként igazoltuk a RES kóros vvt aggregációra gyakorolt jótékony hatását humán klinikai vizsgálatban HFrEF beteganyagban.
8. Az eredmények analízise során összefüggést találtunk a betegek javuló funkcionális kapacitása és egyes hemoreológiai paraméterek együttes, kedvező irányú változásai között, ezért a növekvő terhelhetőség háttérében részben a mikrocirkulációs keringés javulását feltételezzük.

X. Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, I. számú Belgyógyászati Klinika Kardiológiai Tanszékén és a Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpontban végeztük.

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki támogatott és hasznos tanácsokkal látott el munkám során. Szintén köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Halmosi Róbertnek és Dr. Habon Tamásnak a kutatómunkám során nyújtott ötletekért, szakmai segítségért.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Sümegi Balázsnak (†) tanácsaiért, támogatásáért.

Hálával tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Márton Zsoltnak, Dr. Soós Szilviának, Dr. Kenyeres Péternek, Dr. Rábai Miklósnak, Dr. Sándor Barbarának és Dr. Praksch Dórának a sok hasznos ötletért, valamint kutatómunkám elvégzése során nyújtott támogatásukért.

Köszönettel tartozom a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, I. számú Belgyógyászati Klinika Kísérletes Kardiológia Munkacsoport munkatársainak, Dr. Deres Lászlónak, Dr. Erős Krisztiánnak, Horváth Orsolyának és Ördög Katalinnak a kísérletes munkában nyújtott segítségükért.

Szeretném továbbá megköszönni minden asszisztensnek és nővérnek a mérések során nyújtott munkájukat, különös tekintettel Tapasztóné Fazekas Kornéliára, és Völgyiné Dózsa Tímeára.

Végül de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak a türelmükért, támogatásukért.

A kutatási munkám a GINOP 2.3.2-15-2016-00048 és a TUDFO/47138/2019-ITM pályázatok keretében valósult meg.

XI. Irodalomjegyzék

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola V, Jankowska EA. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2016;37:2129–2200.
2. Braunwald E, Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. Ninth edition. *Elsevier Saunders*. Philadelphia. 2012; 506. ISBN: 978-0-8089-2436-4.
3. Braunwald E, Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. Ninth edition. *Elsevier Saunders*. Philadelphia. 2012; 543-549. ISBN: 978-0-8089-2436-4.
4. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007;93: 1137–1146.
5. Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016;6:368-78.
6. Maggioni AP. Epidemiology of Heart Failure in Europe. *Heart Fail Clin.* 2015;4:625-35.
7. Braunwald E, Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. Ninth edition. *Elsevier Saunders*. Philadelphia. 2012; 487-504. ISBN: 978-0-8089-2436-4.
8. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushimam S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H2181–H2190.
9. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;49:241-248.
10. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol.* 2015;6(1):187-214.
11. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007;93:1137–1146.
12. Swedberg K, Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): A randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2010;376:875–885.

13. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR. PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 2014;371:993–1004.
14. Sauer AJ, Cole R, Jensen BC, Pal J, Sharma N, Yehya A, Vader J. Practical guidance on the use of sacubitril/valsartan for heart failure. *Heart Fail Rev.* 2019;24:167–176.
15. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:30-41.
16. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, Jamal W, Kimura K, Schnee J, Zeller C, Cotton D, Bocci E, Böhm M, Choi DJ, Chopra V, Chuquiure E, Gianetti N, Janssen S, Zhang J, Juanatey JRG, Kaul S, Brunner-La Rocca H, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S, Pinna I, Ponikowski P, Sattar, N, Senni M, Seronde M, Spinar J, Squire I, Taddei S, Wanner C, Zannad F. EMPEROR-Reduced Trial Investigators. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med.* 2020; 383:1413-1424.
17. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, Ponikowski P, Sabatine MS, Anand IS, Bělohávek J, Böhm M, Chiang CE, Chopra VK, de Boer RA, Desai AS, Diez M, Drozd J, Dukát A, Ge J, Howlett JG, Katova T, Kitakaze M, Ljungman CEA, Merkely B, Nicolau JC, O'Meara E, Petrie MC, Vinh PN, Schou M, Tereshchenko S, Verma S, Held C, DeMets DL, Docherty KF, Jhund PS, Bengtsson O, Sjöstrand M, Langkilde AM. DAPA-HF Trial Committees and Investigators. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2019;381(21):1995-2008.
18. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Adams KF, Anand I, Arias-Mendoza A, Biering-Sorensen T, Böhm M, Bonderman D, Cleland JGF, Corbalan R, Crespo-Leiro MG, Dahlström U, Echeverria LE, Fang JC, Filippatos G, Fonseca C, Goncalvesova E, AR Goudev, Howlett JG, Lanfear DE, Li J, Lund M, Macdonald P, Mareev V, Momomura S, O'Meara E, Parkhomenko A, Ponikowski P, Ramires FJA, Serpytis P, Sliwa K, Spinar J, Suter TM, Tomcsanyi J, Vandekerckhove H, Vinereanu D, Voors AA, Yilmaz MB, Zannad F, Sharpsten L, Legg JC, Varin C, Honarpour N, Abbasi SA, Malik FI, Kurtz CE, for the GALACTIC-HF Investigators. Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med.* 2020;11:1-12.

19. Kim DH, Chien FJ, Eisen HJ. Pharmacologic Management for Heart Failure and Emerging Therapies. *Curr Cardiol Rep.* 2017;19(10):94.
20. Patel C, Deoghare S. Heart failure: Novel therapeutic approaches. *J Postgrad Med.* 2015;61:101-108.
21. Armstrong PW, Pieske B, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, Butler J, Lam CSP, Ponikowski P, Voors AA, Jia G, McNulty SE, Patel MJ, Roessig L, Koglin J, O'Connor CM, and the VICTORIA Study Group. Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2020;382(20):1883-1893.
22. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;339:1523–1526.
23. Raj P, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Movahed A, Zieroth S, Netticadan T. Potential of resveratrol in the treatment of heart failure. *Life Sci.* 2014;95:63–71.
24. Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann NY Acad Sci.* 2011;1215:117-122.
25. Sung MM, Dyck JRB. Therapeutic potential of resveratrol in heart failure. *Ann NY Acad Sci.* 2015;1348: 32-45.
26. Zordoky BNM, Robertson IM, Dyck JRB. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim et Biophys A.* 2015;1852:1155-1177.
27. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell.* 2006;127:1109-22.
28. Gu XS, Wang ZB, Ye Z, Lei JP, Li L, Su DF, Zheng X. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genet Mol Res.* 2014;13:323-35.
29. Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* 2015; 12:4766–4771.
30. Gupta PK, DiPette DJ, Supowit SC. Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Sci Nutr.* 2014;2:218–229.
31. Wojciechowski P, Juric D, Louis XL, Thandapilly SJ, Yu L, Taylor C, Netticadan T. Resveratrol arrests and regresses the development of pressure over load-but not volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Nutr.* 2010;140:962–968.

32. Danz ED, Skramsted J, Henry N, Bennett JA, Keller RS. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:1589-1597.
33. Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2017;174:1633–1646.
34. Dyck GJB, Raj P, Zieroth S, Dyck JRB, Ezekowitz JA. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2019;20:904.
35. Xia N, Förstermann U, Li H. Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. *Ann NY Acad Sci.* 2017;1403:132–141.
36. Schwager J, Richard N, Widmer F, Raederstorff D. Resveratrol distinctively modulates the inflammatory profiles of immune and endothelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17:309.
37. Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, Traficante A, Civitillo F, Santini L, Trimarco V. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension.* 2013;62:359-366.
38. Simental-Mendía LE, Guerrero-Romero F. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition.* 2019;58:7-10.
39. Burstein B, Maguy A, Clement R, Gosselin H, Poulin F, Ethier N. Effects of resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) treatment on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(3):916-23.
40. Yoshida Y, Shioi T, Izumi T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ.* 2007;71(3):397-404.
41. Palfi A, Bartha E, Czopf L, Mark L, Gallyas F, Veres B, Kalman E, Pajor L, Kalman T, Ohmacht R, Sumegi B. Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C alpha/beta II. *J Nutr Biochem.* 2009;20(6):418-25.
42. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, Nordøy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Frøland SS, Gullestad L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83:376–382.

43. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*. 2012;122:23-35.
44. Riba A, Deres L, Sumegi B, Toth K, Szabados E, Halmosi R. Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:6819281.
45. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, Battyany I, Sumegi B, Toth K, Szabados E. Cardioprotection by resveratrol: a human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;50:179–187.
46. Lowe GDO, Smith WCS, Tunstall-Pedoe HD, Crombie IK, Lennie SE, Anderson J: Cardiovascular risk and haemorheology - Results from the Scottish Heart Health Study and the MONICA Project, Glasgow. *Clin Hemorheol*, 1988;8:517-524.
47. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ: Fibrinogen, viscosity, and white cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circ*. 1991;83:836-844.
48. Kesmarky G, Toth K, Habon L, Vajda G, Juricskay I: Hemorheological parameters in coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1998;18:245-251.
49. Toth K, Kesmarky G. Clinical Significance of Hemorheological Alterations. In: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Eds.: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. *IOS Press*. 2007:392-432.
50. Kensey KR. The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin*. 2003;19:587-596.
51. Cabel M, Meiselman HJ, Popel AS, Johnson PC. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1997;41: 1020-1032.
52. Chong-Martinez B, Buchanan TA, Wenby R, Meiselman HJ. Decreased red blood cell aggregation subsequent to improved glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Med*. 2003;20:301-306.
53. Szapary L, Horvath B, Marton Z, Alexy T, Demeter N, Szots M, Klabuzai A, Kesmarky G, Juricskay I, Gaal V, Czopf J, Toth K. Hemorheological disturbances in patients with chronic cerebrovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004;31:1-9.
54. Marton Zs, Horvath B, Alexy T, Kesmarky G, Gyevnar Zs, Czopf L, Habon T, Kovacs L, Papp E, Mezey B, Roth E, Juricskay I, Toth K. Follow-up of hemorheological

- parameters and platelet aggregation in patients with acute coronary syndromes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29:81-94.
55. Baskurt OK. Mechanisms of blood rheology alterations. In: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Eds.: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. *IOS Press.* 2007:170-190.
 56. Lipowsky HH. Microvascular Rheology and Hemodynamics. *Microcirc.* 2005;12:5-15.
 57. Matschke K, Jung F. Regulation of the myocardial microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39:265-279.
 58. Tikhomirovaa I, Petrochenkoa E, Muravyova A, Malyshevava Y, Petrochenkob A, Yakusevichb V, Oslyakovaa A. Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;65:383-391.
 59. Biro K, Sandor B, Kovacs D, Csiszar B, Vekasi J, Totsimon K, Toth A, Koltai K, Endrei D, Toth K, Kesmarky G. Lower limb ischemia and microrheological alterations in patients with diabetic retinopathy. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;69:23-35.
 60. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and Hemorheology. *Annu Rev Fluid Mech.* 2005;37:43–69.
 61. Dormandy JA, Nash GB. Importance of red cell aggregation in venous pathology. *Clin Hemorheol.* 1987;7:119-122.
 62. Urdulashvili T, Momtselidze N, Mantskava M, Narsia N, Mchedlishvili G. Hemorheological, microvascular and hemodynamic disorders during coronary heart disease. *Georgian Med News.* 2016;136:55-57.
 63. Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed. Papers.* 2011;155:131-136.
 64. Nash GB, Wenby RB, Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ. Influence of cellular properties on red cell aggregation. *Clin Hemorheol.* 1987;7:93–108.
 65. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A†, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J.* 2018;39:3021–3104.

66. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:111-117.
67. Johnson BD, Beck KC, Olson LJ, O'Malley KA, Allison TG, Squires RW, Gau GT. Ventilatory constraints during exercise in patients with chronic heart failure. *Chest.* 2000;117: 321-332.
68. Dyer MTD, Goldsmith KA, Sharples LS, Buxton MJ. A review of health utilities using the EQ-5D in studies of cardiovascular disease. *Health Qual Life Outcomes.* 2010;8: 13.
69. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol.* 2009;42:75-97.
70. Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;25:1-11.
71. Klose HJ, Volger E, Brechtelsbauer H, Heinich L, Schmid-Schonbein H. Microrheology and light transmission of blood, *Pflugers Arch.* 1972;333:126–139.
72. Hardeman MR, Goedhart PT, Schut NH. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser (LORCA), II: Red blood cell deformability: Elongation index versus cell transit time. *Clin Hemorheol.* 1994;14:619–630.
73. Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ. Trans-Resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tertButyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J Neurochem.* 2000;75: 141–150.
74. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U, Li H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPX1) and NADPH oxidase subunit (NOX4). *J Physiol Pharmacol.* 2009;60:111-116.
75. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, Bagchi D, Das DK, Maulik N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of nitric oxide, thioredoxin and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:720–729.
76. Yildiz F, Terzi A, Coban S, Celik H, Aksoy N, Bitiren M, Cakir H, Ozdogan MK. Protective effects of resveratrol on small intestines against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1781–1785.

77. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:155–163.
78. Shen MY, Hsiao G, Liu CL, Fong TH, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br J Haematol.* 2007;139:475–485.
79. Cho IJ, Ahn JY, Kim S, Choi MS, Ha TY. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367:190-194.
80. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006;444:337-342.
81. Lin Y, Zhu M, Su Z. The pursuit of balance: An overview of covariate-adaptive randomization techniques in clinical trials. *Contemp Clin Trials.* 2015;45:21-25.
82. Wilson DJ.; North N, Wilson RA. Comparison of Left Ventricular Ejection Fraction Calculation Methods. *Echocardiography.* 1998;15:709–712.
83. Cameli M, Mondillo S, Righini FM, Lisi M, Dokollari A, Lindqvist P, Maccherini M, Henein M. Left Ventricular Deformation and Myocardial Fibrosis in Patients With Advanced Heart Failure Requiring Transplantation. *J Card Fail.* 2016;22:901–907.
84. Qin F, Siwik DA, Luptak I, Hou X, Wang L, Higuchi A, Weisbrod RM, Ouchi N, Tu VH, Calamaras TD, Miller EJ, Verbeuren TJ, Walsh K, Cohen RA, Colucci WS. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circ.* 2012;125:1757-1764.
85. Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H833–H843.
86. Matsumura N, Takahara S, Maayah ZH, Parajuli N, Byrne NJ, Shoieb SM, Soltys CM, Beker DL, Masson G, El-Kadi AOS, Dick JRB. Resveratrol improves cardiac function and exercise performance in MI-induced heart failure through the inhibition of cardiotoxic HETE metabolites. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;125:162–173.

87. Hart N, Sarga L, Csende Z, Koltai E, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Kouretas D, Wessner B, Radak Z. Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. *Food Chem Toxicol.* 2018;61:53–59.
88. Voduc N, la Porte C, Tessier C, Mallick R, Cameron DW. Effect of resveratrol on exercise capacity: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39:1183-1187.
89. Gliemann L, Schmidt, JF, Olesen J, Biensø RS, Peronard SL, Grandjean, SU, Mortensen SP, Nyberg M, Bangsbo J, Pilegaard H, Hellsten Y. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. *J Physiol.* 2013;591:5047-5059.
90. Amin HZ, Amin LZ, Wijaya IP. Galectin-3: A novel biomarker for the prognosis of heart failure. *Clujul Med.* 2017;90:129–132.
91. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9186940.
92. Militaru C, Donoiu I, Craciun A, Scorei ID, Bulearca AM, Scorei RI. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition.* **2013**;29: 178-183.
93. Gaggin HK, Januzzi JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832:2442–2450.
94. Chase SC, Fermoyle CC, Wheatley CM, Schaefer JJ, Olson LJ, Johnson BD. The effect of diuresis on extravascular lung water and pulmonary function in acute decompensated heart failure. *ESC Heart Fail.* 2018;5:364–371.
95. Gehlbach BK, Geppert E. The pulmonary manifestations of left heart failure. *Chest.* 2004;125:669–682.
96. Malaguarnera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients.* 2019;11: 946.
97. Yan AT, Yan RT, Cushman M, Redheuil A, Tracy RP, Arnett DK, Rosen BD, McClelland RL, Bluemke DA, Lima JAC. Relationship of interleukin-6 with regional and global left-ventricular function in asymptomatic individuals without clinical cardiovascular disease: insights from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31:875-882.
98. Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res.* 2015;116:1254-1268.

99. Becatti M, Marcucci R, Gori AM, Mannini L, Grifoni E, Alessandrello Liotta A, Sodi A, Tartaro R, Taddei N, Rizzo S, Prisco D, Abbate R, Fiorillo C. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost.* 2016;14:2287-2297.
100. Gyawali P, Richards RS. Association of altered hemorheology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. *Redox Rep.* 2015;20:139-44.
101. Androne AS, Katz SD, Lund L, LaManca J, Hudaihed A, Hryniewicz K, Mancini DM. Hemodilution is common in patients with advanced heart failure. *Circ.* 2003;107:22.
102. Iverson P, Woldbaek P, Tonnessen T, Christensen G. Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure. *Am J Physiol.* 2002;282:R166–R172.
103. Meng Y, Zhang M, Liu JXXM, Ma OY. Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol.* 2005;11:433-435.
104. Bonechi C, Lamponi S, Donati A, Tamasi G, Consumi M, Leone G, Rossi C, Magnani A. Effect of resveratrol on platelet aggregation by fibrinogen protection. *Biophys Chem.* 2017;222:41-48.
105. Lominadze D, Dean WL. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett.* 2002;517(1-3):41-44.
106. Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO. Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am J Physiol.* 1996;271:H2346-2352.
107. Toth A, Sandor B, Papp J, Rabai M, Botor D, Horvath Zs, Kenyeres P, Juricskay I, Toth K and Czopf L. Moderate red wine consumption improves hemorheological parameters in healthy volunteers. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;56:13-23.
108. Wang Y, Cui H, Niu F, Liu S, Li Y, Zhang L, Du H, Zhao Z, Niu C. Effect of Resveratrol on Blood Rheological Properties in LPS-Challenged Rats. *Front Physiol.* 2018;9:1202.

XII. Saját közlemények

1. A disszertáció témakörében publikált teljes közlemények

1. **GÁL R**, DERES L, HORVATH O, EROS K, SANDOR B, URBAN P, SOOS S, MARTON Z, SUMEGI B, TOTH K, HABON T and HALMOSI R. Resveratrol Improves Heart Function by Moderating Inflammatory Processes in Patients with Systolic Heart Failure. *Antioxidants*, 2020;9(11):1108.
Impakt faktor: 5.014 (Q1)
2. **GÁL R**, PRAKSCH D, KENYERES P, RABAI M, TOTH K, HALMOSI R and HABON T. Hemorheological Alterations in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction Treated by Resveratrol. *Cardiovascular Therapeutics*. 2020;2020:7262474.
Impakt faktor: 2.538 (Q2)

2. Egyéb teljes közlemények

3. **GÁL R**, HALMOSI R. A szívelégtelenség aktualitásai a terápiában 2020-ban. *Kardio-Vaszkuláris Iránytű*. 2020;2(4):49-54.
4. HALMOSI R, **GÁL R**. A dapagliflozin alkalmazhatósága csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenségben. *Orvostovábbképző Szemle*. 2020;27(9):58–63.
5. HABON T, **GÁL R**. Szívelégtelenség, helyzetkép; klinikai gyakorlat és új gyógymódok a láthatáron. *Cardiologia Hungarica*. 2019;49(Suppl. C):C2–C7.
6. **GÁL R**, BAJNOK L. A 2016-os ESC/EAS irányelvek a dyslipidaemiák kezelésére. *Gyógyszerész Továbbképzés*. 2017;11(6):181-184.
7. **GÁL R**, BAJNOK L. A 2016-os ESC/EAS irányelvek a dyslipidaemiák kezelésére. *Metabolizmus*. 2017;15(2):65-68.
8. HABON T, **GÁL R**. A szívelégtelenség gyógyszeres terápiája napjainkban. Fókuszban a béta-blokkolók. *Cardiologia Hungarica*. 2016;46(4):19–28.

9. HALMOSI R, DERES L, **GÁL R**, EROS K, SUMEGI B and TOTH K. PARP inhibition and postinfarction myocardial remodeling. *International Journal of Cardiology*. 2016;217:52-59.
Impakt faktor: 6.189 (Q1)
10. **GÁL R**, HALMOSI R. Az oxidatív stressz szerepe szívelégtelenségben. *Orvosi Hetilap*. 2015;156(47):1916-1920.
Impakt faktor: 0.291 (Q3)
11. MAGYAR K, **GÁL R**, RIBA A, HABON T, HALMOSI R and TOTH K. From hypertension to heart failure. *World Journal of Hypertension*. 2015;5(2):85-92.
12. PAPP J, **GÁL R**, KÉSMÁRKY G, GOJÁK I, PINTÉR Ö, SZABADS S, TÓTH K, HABON T. Bal- vagy jobbszívfél-elégtelenség?. *Cardiologia Hungarica*. 2015;45(5): 342–344.
13. TÓTH K, **GÁL R**, TÓTH A. A stabil koszorúér-betegség kezelésének modern szemlélete. *Magyar Belorvosi Archivum*. 2014;67(5):287-291.
14. **GÁL R**, TOTH K. Az artériás hipertenzió komplex terápiája - az ESH/ESC 2013-as irányelvei. *Orvostovábbképző Szemle*. 2013;20(9):51-56.
15. **GÁL R**, HALMOSI R. A frekvenciakontroll szerepe a szívelégtelenség gyógyszeres kezelésében. *Granum*. 2013;16(4):5-7.
16. **GÁL R**, HALMOSI R, TÓTH A, TÓTH K. Az ivabradin hatása a bal kamrai remodellingre, illetve a betegek életminőségére. *Cardiologia Hungarica*. 2011;41(5):354-361.

Kumulatív impakt faktor: 14.032

3. Publikált absztraktok és posztterek

1. **GÁL R**, FONTOS G, TEMESVARI A, VERTESALJAI M, ABLONCZY L, MAGYARI B, KELLER J, TOTH L, TOTH K, HABON T. Successful percutaneous transcatheter closure of a prosthetic mitral paravalvular leak causing heart failure. *European Journal Of Heart Failure*. 2019;21(S1):149.
2. **GÁL R**, FONTOS G, TEMESVÁRI A, VÉRTESALJAI M, ABLONCZY L, MAGYARI B, KELLER J, TÓTH L, TÓTH K, HABON T. Szívelégtelenséget okozó mitrális paravalvuláris leak sikeres katéterterápiás megoldása. *Cardiologia Hungarica*. 2019;49(Suppl. B):B45.
3. SÁNDOR B, RÁBAI M, **GÁL R**, BOGÁTS G, TÓTH L, TÓTH K, HABON T. Ritka etiológiájú szívelégtelenség komplex diagnosztikája és kezelése. *Cardiologia Hungarica*. 2019;49(Suppl. B):B50
4. HALMOSI R, **GÁL R**, DERES L, HORVATH O, MARTON Z, SUMEGI B, TOTH K, HABON T. Resveratrol improves cardiac function and exerts an anti-inflammatory effect in systolic heart failure patients. *European Heart Journal*. 2019;40(Suppl. 1):P781.
5. **GÁL R**, DERES L, HORVÁTH O, PRAKSCH D, MÁRTON Zs, SÜMEGI B, TÓTH K, HABON T, HALMOSI R, “A rezveratrol hatása a non-invazív klinikai kardiológiai és laboratóriumi paraméterekre szisztolés típusú szívelégtelenségben. *Cardiologia Hungarica*. 2018;48(Suppl. C).
6. HALMOSI R, **GÁL R**, DERES L, HORVATH O, PRAKSCH D, MARTON Z, SUMEGI B, TOTH K, HABON T. The effect of resveratrol on non-invasive cardiologic and laboratory parameters in systolic heart failure. *European Journal Of Heart Failure*. 2018;20(Suppl. 1):565.
7. **GÁL R**, SZAPARY L, TOTH L, SZUKITS S, TOTH K, HABON T. Surprise after a successful fibrinolytic therapy in acute stroke. *European Journal Of Heart Failure*. 2017;19(Suppl. 1):254.
8. MAGYAR K, DERES L, **GÁL R**, RIBA Á, HABON T, TÓTH K, HALMOSI R. A hipertóniától a szívelégtelenségig. *Cardiologia Hungarica*. 2017;47(2):139–144.
9. **GÁL R**, SZAPÁRY L, TÓTH L, SZUKITS S, TÓTH K, HABON T. Meglepetés egy sikeres stroke lízist követően. *Cardiologia Hungarica*. 2017;47(Suppl. C):C56.

10. GÁL R, SIMOR T, GASZNER B, TÓTH K, HABON T. Négy etiológia, egy szívelégtelen eset (Four etiologies, one patient.) *Cardiologia Hungarica*. 2015;45(Suppl. D):D47.
11. TÓTH K, KENYERES P, KOLTAI K, RÁBAI M, **GÁL R**. Két év a kardiológiában: válogatások az elmúlt két évi ACC, ESC, AHA konferenciák újdonságaiból. *Magyar Belorvosi Archivum*. 2015;68(Suppl. 1):14.
12. PAPP J, **GÁL R**, KÉSMÁRKY G, GOJÁK I, PINTÉR Ö, SZABADOS S, TÓTH K, HABON T. Bal- vagy jobbszívfél-elégtelenség? (Left or right ventricular heart failure?). *Cardiologia Hungarica*. 2014;44(Suppl. E):E58-E59.
13. **GÁL R**, HALMOSI R, GASZNER B, PINTÉR Ö, VOROBCSUK A, SIMOR T, SZABADOS S, TÓTH K, HABON T. Egy szövődményes STEMI esete - vajon hány komplikációt lehet túlélni? (A case report of a complicated STEMI - how many complications can a patient survive?). *Cardiologia Hungarica*. 2013;43(Suppl. B):B68–B69.



Article

Resveratrol Improves Heart Function by Moderating Inflammatory Processes in Patients with Systolic Heart Failure

Roland Gal ^{1,2}, Laszlo Deres ^{1,2,3}, Orsolya Horvath ^{1,2}, Krisztian Eros ^{2,3,4}, Barbara Sandor ^{1,2}, Peter Urban ², Szilvia Soos ⁵, Zsolt Marton ^{1,2}, Balazs Sumegi ^{2,3,4}, Kalman Toth ^{1,2}, Tamas Habon ^{1,2} and Robert Halmosi ^{1,2,*}

- ¹ Division of Cardiology, 1st Department of Medicine, Medical School, University of Pecs, 7602 Pecs, Hungary; gal.roland@pte.hu (R.G.); deres.laszlo@pte.hu (L.D.); horvath.orsolya2@pte.hu (O.H.); sandor.barbara@pte.hu (B.S.); marton.zsolt@pte.hu (Z.M.); toth.kalman@pte.hu (K.T.); habon.tamas@pte.hu (T.H.)
- ² Szentágothai Research Centre, University of Pecs, 7602 Pecs, Hungary; krisztian.eros@aok.pte.hu (K.E.); urban.peter@pte.hu (P.U.); balazs.sumegi@aok.pte.hu (B.S.)
- ³ HAS-UP Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, 1007 Budapest, Hungary
- ⁴ Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pecs, 7602 Pecs, Hungary
- ⁵ Division of Pulmonology, 1st Department of Medicine, Medical School, University of Pecs, 7602 Pecs, Hungary; soos.szilvia@pte.hu
- * Correspondence: halmosi.robert@pte.hu

Received: 8 October 2020; Accepted: 9 November 2020; Published: 11 November 2020



Abstract: The effects of resveratrol (RES) in heart failure have already been evaluated in animal models; however, in human clinical trials, they have not been confirmed yet. The aim of this study was to assess the effects of resveratrol treatment in systolic heart failure patients (heart failure with reduced ejection fraction or HFrEF). In this human clinical trial, 60 outpatients with NYHA (New York Heart Association) class II-III HFrEF were enrolled and randomized into two groups: receiving either 100-mg resveratrol daily or placebo for three months. At the beginning and at the end of the study echocardiography, a six-minute walk test, spirometry, quality of life questionnaire, lab test and RNA profile analysis were performed. The systolic and diastolic left ventricular function, as well as the global longitudinal strain, were improved significantly in the resveratrol-treated group (RES). Exercise capacity, ventilation parameters and quality of life also improved significantly in the RES group. In parallel, the cardiac biomarker levels (N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and galectin-3) decreased in the treated group. The level of inflammatory cytokines decreased significantly after RES supplementation, as a consequence of the decreased expression level of leucocyte electron transport chain proteins. The main findings of our trial are that RES treatment added to the standard heart failure therapy improved heart function and the clinical condition by moderating the inflammatory processes in patients with HFrEF.

Keywords: resveratrol; oxidative stress; inflammation; echocardiography; heart failure

1. Introduction

Heart failure (HF) is a complex multifactorial syndrome caused by structural and/or functional cardiac abnormalities, resulting in a reduced cardiac output or elevated intracardiac pressures [1]. Heart failure prevalence is continuously rising throughout the world. In developed countries, approximately 2% of the adult population has heart failure.

Therapeutic developments over the past several decades have focused on blocking the neurohumoral (RAAS and adrenergic system) activation and on the inhibition of the breakdown of vasoactive peptides. Although this approach improved the survival of HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction) patients [2], the outcome of the disease still remained poor [3–8]. Therefore, there is an overwhelming need for new therapies in heart failure. Novel drugs in experimental and clinical trials targeting myocardial contractility (e.g., omecamtiv mecarbil), cytokines (e.g., anti-TNF α), myocardial metabolism (e.g., perhexiline) or oxidative stress [9,10] are promising and may present an alternative approach in the treatment of heart failure in the future.

Oxidative stress also has an important role in the pathogenesis of different cardiac pathologies, such as ischemia-reperfusion injury, cardiac remodeling and heart failure [11,12]. Resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene), a natural phytoalexin found in a wide variety of plants (e.g., nuts, berries and grapes) is produced in response to environmental stress [13]. Given that resveratrol has a marked scavenger effect, it is not surprising that it can protect cells against oxidative damages [14–17]. Beyond its scavenger effect, resveratrol also has antioxidant effects in other ways. Resveratrol (RES) via the activation of the NAD⁺-dependent histone/protein deacetylase SIRT1 (silent information regulator) and AMPK (AMP-activated protein kinase) facilitates mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes. This is accompanied by enhanced oxidative phosphorylation and a higher amount of high energy phosphates (CrP and ATP) that can result in increased contractility and efficient protection against oxidative stress [18–20]. Endothelial and vascular function can also be improved more by the RES treatment via decreasing the cholesterol and triglyceride levels via increasing the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and nitrogen oxide (NO) level, as well as due to its anti-inflammatory effects [21–24].

In systolic heart failure (HFrEF), the contractility of the heart muscle cells is decreased; moreover, a chronic low-intensity inflammation can be seen that can further aggravate heart failure. Our workgroup demonstrated previously that resveratrol supplementation in a post-infarct rodent model prevented the development of heart failure [25]. RES improved the left ventricular function, as well as decreased myocardial fibrosis, oxidative stress and the amount of proinflammatory proteins (cyclooxygenase-2 (COX-2) and iNOS). Other workgroups showed similar results in various animal heart failure models. However, in human clinical trials, the effect of RES has not yet been confirmed [13,26].

The aim of our study was, therefore, to assess the effects of resveratrol treatment on the left ventricular function and on the exercise capacity, as well as on the biomarker and inflammatory cytokine levels in HFrEF.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

Our trial was a single-center, double-blind, randomized, placebo-controlled study. The study design is summarized in Figure 1. The study was conducted in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki (1996), International Conference on Harmonization Good Clinical Practice, as well as local and national regulations. The protocol of the trial was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pecs (license number: 5830). All patients provided written informed consent prior to any study-related procedures.

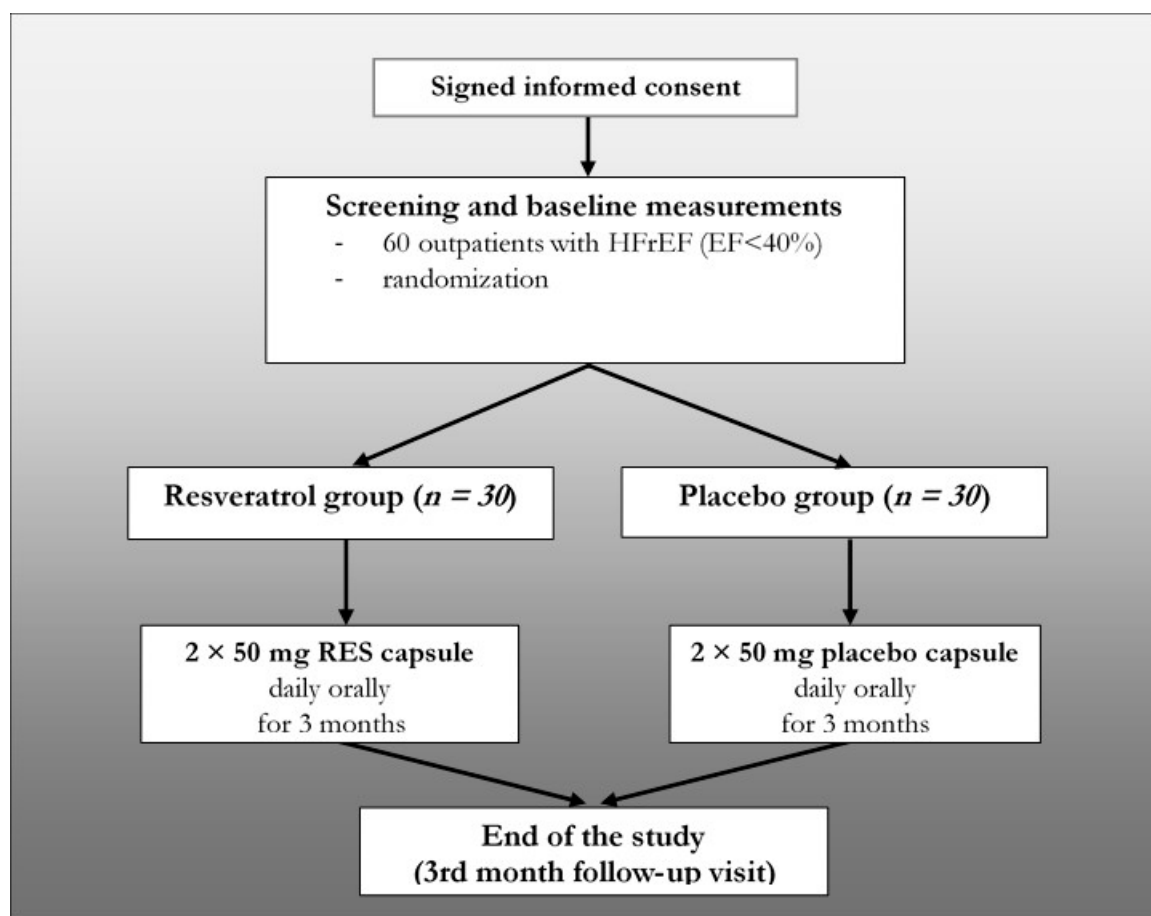


Figure 1. Study design. HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction, N: number of patients and RES: resveratrol.

2.2. Eligibility

The main inclusion and exclusion criteria are listed in Table 1. Briefly, 60 stable outpatients (ages: 66.7 ± 2.01 years, 17 women and 43 men) with HFrEF in NYHA (New York Heart Association) class II or III were enrolled between 01 March 2016 and 30 November 2017 into our study (ejection fraction (EF) $< 40\%$ and ischemic/non-ischemic origin: 34/26). They were randomized into two groups (resveratrol group and placebo group). one-hundred milligrams of resveratrol was administered orally (2×50 mg) for 3 months in the RES group ($n = 30$) and placebo capsule in the other group ($n = 30$).

The resveratrol and the matching placebo capsules were purchased from Argina Nutraceuticals Ltd. (Fót, Hungary). The resveratrol capsule is commercially available and has an official license for being marketed.

All the involved patients were in the evidence-based drug treatment of HFrEF, including angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (or ARBs—angiotensin receptor blockers), beta-blockers, mineralocorticoid receptor antagonists and ivabradine. None of the patients received ARNI (angiotensin receptor-neprilysin inhibitor). The preventive drug regime and the used doses were based on the actual European Society of Cardiology (ESC) heart failure guideline [1]. The patients had baseline visits and follow-up visits after 1 month and after 3 months of treatment. During visits, the compliance of patients was checked, and at the final visit (3-month follow-up visit), they were asked to return the remained capsules. During the whole study period, subjects were in stable clinical conditions and received unchanged medical therapy (Table 2). The baseline characteristics of the randomized patients are detailed in Table 2. There were no significant differences in epidemiological characteristics between the placebo and RES-treated groups at the baseline.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
<ul style="list-style-type: none"> Stable HF patient LVEF < 40% NYHA II or III class at screening NT-proBNP level > 125 pg/mL GDM treatment of HFrEF according to the current ESC guideline Subject has provided informed consent 	<ul style="list-style-type: none"> Hospitalization in the last 3 months LVEF \geq 40% NYHA IV class \leq 18 or \geq 85 years of age Known sensitivity to any components of the capsules Cardiac surgery or intervention within 30 days prior to randomization Systolic blood pressure > 180 Hgmm or < 90 Hgmm, or diastolic blood pressure > 90 Hgmm Heart rate >110 beats per minute or <50 beats per minute eGFR < 20 mL/1.73 m²/min or hepatic impairment defined by ALT or AST \geq 2\times upper limit of normal (ULN) at baseline Participation in a concurrent trial Refusal to give informed consent

ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, eGFR: estimated glomerular filtration rate, GDM: guideline-directed medication, HF: heart failure, HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction, LVEF: left ventricle ejection fraction, NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide, NYHA: New York Heart Association, ULN: upper limit of normal.

Table 2. Baseline characteristics of the study population.

Baseline Characteristics	Resveratrol (n = 30)	Placebo (n = 30)
Age (year)	65.87 \pm 1.91	67.53 \pm 2.14
Male	22 (73%)	21 (70%)
Ejection fraction (%)	30.06 \pm 1.04	31.70 \pm 1.27
NT-proBNP (pg/mL)	2998 \pm 507	3139 \pm 446
Serum creatinine (μ mol/L)	99.77 \pm 4.42	104.47 \pm 4.82
Systolic BP (Hgmm)	132.47 \pm 3.41	128.77 \pm 3.80
Diastolic BP (Hgmm)	79.10 \pm 2.33	80.13 \pm 2.66
Heart rate (beat/min)	72.20 \pm 2.75	76.93 \pm 2.50
Etiological factors		
Ischemic heart disease	17 (56.7%)	17 (56.7%)
Non-ischemic (alcohol, chemotherapy, myocarditis)	13 (43.3%)	13 (43.3%)
<u>Risk factors, comorbidities</u>		
Hypertension	22 (73%)	23 (76%)
Diabetes	13 (43%)	14 (46%)
Smoking	11 (36%)	8 (27%)
Pulmonary diseases (asthma, COPD)	7 (23%)	8 (27%)
BMI (kg/m ²)	29.3 \pm 0.9	30.4 \pm 1.3
Target heart rate (<70/min)	23 (76.7%)	20 (66.7%)
Atrial fibrillation	7 (23%)	10 (33.3%)
<u>Concomitant treatment</u>		
ACE-inhibitor/ARB	28 (93%)	29 (97%)

Table 2. Cont.

Baseline Characteristics	Resveratrol (n = 30)	Placebo (n = 30)
Beta-blocker	29 (97%)	28 (93%)
MRA	23 (76.7%)	21 (70%)
Ivabradine	6 (20%)	6 (20%)
<u>Diuretics</u>		
Loop diuretics (furosemide, etacrynic acid)	27 (90%)	28 (93%)
Thiazide or thiazide-like diuretics (hypothiazide, indapamide, etc.)	8 (27%)	9 (30%)
<u>Device therapy</u>		
CRT-P/D	9 (30%)	7 (23.2%)
ICD	4 (13%)	3 (10%)

Values are expressed as mean \pm SEM. There were no significant differences in patient characteristics between the RES (resveratrol) and placebo-treated groups at the baseline. ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitors, ARB: angiotensin receptor blocker, BMI: body mass index, BP: blood pressure, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, CRT-P/D: cardiac resynchronization therapy-pacemaker/defibrillator, ICD: implantable cardioverter defibrillator, MRA: mineralocorticoid receptor antagonist and NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide.

On the day of randomization and 3-months-later physical examination, blood pressure and weight measurement, echocardiography, lab test, six-minute walk test (6MWT), spirometry and quality of life questionnaire (QoL test) were performed. At the 1-month follow-up visit, only a physical examination, blood pressure, weight measurement and lab test were done (Table 3).

Table 3. Timetable of the study.

Examinations	Randomization	1-Month	3-Month
Physical examination	✓	✓	✓
Blood pressure monitoring	✓	✓	✓
12-lead ECG	✓	✓	✓
Lab test	✓	✓	✓
NT-proBNP level	✓		✓
mRNA analysis	✓		✓
Echocardiography	✓		✓
6MWT	✓		✓
Quality of life test (EQ-5D)	✓		✓
Spirometry	✓		✓

ECG: electrocardiography, EQ-5D: Euro quality of life-five dimension questionnaire, NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide, mRNA: messenger ribonucleic acid and 6MWT: 6-min walk test.

2.3. Statistical Analysis

SPSS statistical software, version 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) was used to conduct a descriptive analysis and to describe the sample. After using the Kolmogorov-Smirnov test to check the normality of the data distribution, differences of the mean values within the groups were analyzed by repeated-measures ANOVA with a Greenhouse–Geisser correction. Differences between the groups were calculated by one-way ANOVA test. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Significance level was defined as $p < 0.05$. The homogeneity of the groups was tested by Levene's F-test. The nonparametric Friedman test (post-hoc analysis with Wilcoxon signed-rank test) was applied to analyze the potential changes of the quality of life of the patients.

2.4. Blood Pressure and Body Weight Measurement

Body weight and blood pressure were measured during randomization at 1-month and at 3-month follow-up visits. For body weight measurements, a high-quality calibrated digital scale was used (CAS PB-150 digital scale; CAS Corporation, Tustin, CA, USA). Blood pressures were measured using an automated electronic device after a 5-min resting; the location of the cuff was the upper arm at the

level of the heart (OMRON M2 Intellisense, Tokyo, Japan). The technique of the measurement was based on the actual hypertension guideline [27].

2.5. Laboratory Test

Laboratory analysis performed on blood samples that were extracted from the cubital vein after a 12-h-long fasting period. From blood samples, NT-proBNP; fasting lipid levels (total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)—cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) -cholesterol and triglycerides); troponin T; glycosylated hemoglobin-HgbA1c; serum albumin; renal and liver function; serum iron parameters and quantitative and qualitative blood cell counts were measured in the Department of Laboratory Medicine, University of Pecs, Pecs, Hungary.

Special parameters (galectin-3, interleukin (IL)-1 and IL-6) were determined using an ELISA method in the Szentagothai Research Centre, University of Pecs. Blood samples were collected into Vacutainer tubes containing EDTA and protease inhibitor. Galactin-3 level (Invitrogen™ Human Galectin-3 ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, EHLGALS3, Waltham, MA, USA), IL-1 cytokine level (Invitrogen™ Human IL-1 R4 (IL1RL1) ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, EHIL1RL1, Waltham, MA, USA) and IL-6 (Invitrogen™ Novex IL-6 Human ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, KHC00612.3.3., Waltham, MA, USA) cytokine levels were determined by the enzyme immunoassay method.

2.6. Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed for noninvasive evaluation of cardiac structure and function at baseline and after the 3-month-long treatment. We used a GE Vivid E9 ultrasound imaging device (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Structures were visualized from parasternal long axis; short axis and apical four, two and five-chamber views. M-mode (one-dimensional mode), 2D-mode, 3D-mode, PW (pulsed-wave), CW (continuous wave) and tissue Doppler mode imaging were used to determine the left ventricular ejection fraction (EF, %), the diameters (mm) and volumes (mL) of the left ventricle and left atrium, the diastolic function (E/A and E/E'), the global longitudinal strain of the left ventricle (GLS, %), the wall thicknesses of the left ventricle (mm) and the right ventricular parameters. The EF was measured by two different methods ("Simpson" and "Quinone"). The investigators were blinded to the protocol; thus, they did not know whether the patient was taking resveratrol or placebo.

2.7. Six-Minute Walk Test (6MWT)

The 6-min walk test (6MWT) is a submaximal exercise test that measures the walking distance for 6 min. The test was performed on a 30-m-long section of the corridor in our department according to the guidelines of the American Thoracic Society (ATS). The patients were at rest comfortably for 10 min prior to the test. The supervisor was a study nurse, who was blinded to the protocol. After 6 min or if the patient could not go any further, the test was stopped, and the distance, as well as the reason for stopping (dyspnea, fatigue, chest pain, etc.), were recorded [28].

2.8. Spirometry

Spirometry is a routine method to evaluate the lung function, and it has many uses, including chest surgery or the grading of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), etc. It is well-known that heart failure can influence the pulmonary function, which may include combined obstructive (e.g., significant FEV1 reduction) and restrictive changes [29].

We used a PISTON PDD 301/s spirometer (Piston Ltd., Budapest, Hungary) for measuring the basic resting lung parameters of the patients at baseline and 3 months later.

During the test, the patient wore a soft nose clip to prevent air escaping through the nose, as well as a mouthpiece filter to prevent the spread of microorganisms. During the test, patients were asked to take the deepest breath they could and then exhale into the sensor as hard and as long as possible. Generally, a period of quiet breathing in and out from the sensor precedes the test, and the

rapid breathing in (forced inspiratory part) comes before the forced exhalation. We determined the most common parameters in the percentage of the reference values, such as forced vital capacity (FVC); forced expiratory volume (FEV₁); FEV₁/FVC ratio; peak expiratory flow (PEF); forced expiratory flow 25–75% (FEF 25–75); maximal expiratory flows (MEF 25%, MEF 50% and MEF 75%) and inspiratory vital capacity (IVC).

2.9. Quality of Life Questionnaire (QoL Test)

Quality of life (QoL) in heart failure patients is severely compromised by the symptoms of the disease. Quality of life is also a good predictor of mortality and the need for hospitalization. For the assessment of QoL, we used the “Euro QoL five-dimension” (EQ-5D) questionnaire. Among health-related quality of life (HR QoL) questionnaires, EQ-5D has gained widespread use due to its simplicity to administer, score and interpret. This scoring system consists of five dimensions (mobility, self-care, usual activities, pain/discomfort and anxiety/depression), each with three levels of response or severity (no problems—2 point, some problems—1 point or extreme problems—0 point). In addition to the index-based scoring system, the visual analog scale (VAS) component of the EQ-5D enables the patient to place their current health state on a range from 0 (worst imaginable health state) to 100 (best imaginable health state) [30].

2.10. RNA Isolation, RNA-Seq Library Preparation and Sequencing

QIAamp RNA Blood Mini Kit was used for purification of total RNA from the whole blood. During the QIAamp procedure for purification of RNA from blood, erythrocytes are selectively lysed, and leukocytes are recovered by centrifugation. The leukocytes are then lysed using highly denaturing conditions that immediately inactivate RNases, allowing the isolation of intact RNA. After homogenization of the lysate by a brief centrifugation through a QIA shredder spin column, ethanol is added to adjust the binding conditions, and the sample is applied to the QIAamp spin column. RNA is bound to the silica membrane during a brief centrifugation step. Contaminants are washed out, and total RNA is eluted in 30 µL or more of RNase-free water.

RNA concentrations were measured using Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA quality was verified on an Agilent 2100 Bioanalyzer using an RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). High-quality (RIN > 8) RNA samples were processed for library preparation. Further sample preparation was conducted by Illumina TruSeq® Stranded Total RNA sample preparation guide.

2.11. RNA-Sequencing Data Processing and Analysis

Paired-end fastq files were imported into the CLC Genomics Workbench (CLC Bio, version 12, Hilden, Germany). Adaptor sequences and bases with low quality were trimmed. Reads containing more than 2 ambiguous bases were discarded. Preprocessed sequencing reads were aligned to the gene regions and transcripts of the GRCh38 human genome.

Differential expression of genes at the end of the study was assessed in each experimental group compared to baseline expression values while controlling cross-checking of the patient IDs of paired data. Differentially expressed genes (DEGs) were filtered out, using a threshold of fold change (FC) absolute value > 1.5 and false discovery rate (FDR)-adjusted *p*-value < 0.05. DEGs were visualized on a heat map using CLC Genomics Workbench 12. Hierarchical clustering was conducted, using Euclidean distances and complete linkages.

3. Results

3.1. The Effect of Resveratrol on Laboratory Parameters

Laboratory parameters did not show significant changes in either group after one month of treatment compared to the baseline values (data not shown). There was no significant change in renal function, liver function and quantitative and quality blood counts in either group after the

three-month follow-up period compared to the baseline values. Cardiac troponin T, iron parameters and glycosylated hemoglobin (HgbA1c) were also not influenced significantly by the resveratrol treatment during the study period. The total cholesterol (4.74 ± 0.22 mmol/L vs. 4.52 ± 0.24 mmol/L, $p < 0.05$) and LDL-cholesterol (3.09 ± 0.23 mmol/L vs. 2.79 ± 0.23 mmol/L, $p < 0.05$) levels were significantly lower in the RES group by the end of the follow-up period; however, in the placebo group, no significant alterations could be seen compared to the baseline values (Table 4). Unfortunately, the HDL-cholesterol level was also slightly but significantly lower in the RES group (1.33 ± 0.06 mmol/L vs. 1.24 ± 0.07 mmol/L, $p < 0.05$ vs. RES-Baseline) after three months.

Table 4. Effect of resveratrol treatment on the lab parameters.

Lab Parameters	Baseline		3rd Month	
	Resveratrol	Placebo	Resveratrol	Placebo
Hgb _{A1c} (%)	6.37 ± 0.18	6.70 ± 0.24	6.38 ± 0.20	6.67 ± 0.23
BUN (mmol/L)	7.75 ± 0.45	8.80 ± 0.84	8.26 ± 0.44	8.75 ± 0.93
Se creatinine (μmol/L)	99.77 ± 4.42	104.47 ± 4.82	102.19 ± 5.71	109.31 ± 5.92
TC (mmol/L)	4.74 ± 0.22 #	4.15 ± 0.23	4.52 ± 0.24 * #	4.04 ± 0.28
HDL-C (mmol/L)	1.33 ± 0.06	1.29 ± 0.08	1.27 ± 0.07 *	1.25 ± 0.06
LDL-C (mmol/L)	3.09 ± 0.23 #	2.51 ± 0.21	2.79 ± 0.23 * #	2.41 ± 0.23
TG (mmol/L)	1.91 ± 0.20 #	1.61 ± 0.17	1.93 ± 0.21 #	1.57 ± 0.22
ALT (IU/L)	25.87 ± 1.71	28.86 ± 1.58	27.33 ± 1.80	30.62 ± 2.39
AST (IU/L)	22.73 ± 2.35	28.07 ± 1.99	25.27 ± 3.42	26.93 ± 1.99
cTroponin T (ng/L)	23.26 ± 3.13	23.60 ± 2.56	22.25 ± 2.71	25.52 ± 2.91
Se albumin (g/L)	44.20 ± 0.56	44.82 ± 0.53	45.45 ± 0.58	46.05 ± 0.51
Se Fe (μmol/L)	15.11 ± 1.10	14.27 ± 1.13	15.54 ± 1.08	14.83 ± 1.02
Transf. sat. (%)	21.59 ± 0.84	20.08 ± 1.58	21.57 ± 1.60	20.37 ± 1.39
Se ferritin (μg/L)	151.1 ± 19.60	148.2 ± 18.46	138.5 ± 20.5	133.6 ± 15.85
CRP (mg/L)	4.66 ± 0.50	5.33 ± 0.83	4.23 ± 0.67	4.94 ± 0.73
WBC (G/L)	7.41 ± 0.33	7.73 ± 0.37	7.04 ± 0.29	7.78 ± 0.35
Hct (%)	42.00 ± 1.02	41.71 ± 0.90	41.69 ± 1.06	41.89 ± 0.94
PLT (G/L)	219.3 ± 15.38	217.3 ± 13.40	207.7 ± 11.3	206.6 ± 10.90

Values are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$, 3rd-month values of the resveratrol group compared to the baseline values. # $p < 0.05$, resveratrol vs. placebo group. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or in the placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, BUN: blood urea nitrogen, CRP: C-reactive protein, cTroponin T: cardiac Troponin T, Hct: hematocrit, HDL-C: high-density lipoprotein, Hgb_{A1c}: hemoglobin A1c, LDL-C: low-density lipoprotein, PLT: platelet count, Se Fe: serum iron level, TC: total cholesterol, TG: triglyceride, Transf. sat.: transferrin saturation and WBC: white blood cell count.

3.2. Inflammatory Parameters

The acute-phase proteins (CRP and ferritin) and white blood cell count did not show significant changes in either group during the three-month-long follow-up period (Table 4). The levels of IL-1 (95.61 ± 17.74 pg/mL vs. 140.65 ± 24.04 pg/mL, $p < 0.05$) and IL-6 (5.42 ± 0.35 pg/mL vs. 6.76 ± 0.56 pg/mL, $p < 0.05$) measured by ELISA, however, were significantly lower in the RES-treated group at the end of the study period compared to the placebo group (Figure 2).

3.3. Biomarkers of Heart Failure

There was no significant difference in the NT-proBNP level between the RES and placebo groups at the baseline (2998 ± 507 pg/mL vs. 3139 ± 446 pg/mL, NS); however, by the end of the treatment period, the NT-proBNP level was significantly lower in the RES group than in the placebo group (2760 ± 346 pg/mL vs. 4054 ± 577 pg/mL, $p < 0.05$). This change suggests that RES inhibited the elevation of the plasma NT-proBNP level, a parameter which showed the severity of heart failure. In parallel with NT-proBNP, the galectin-3 level also showed a significant difference between RES and the placebo group at the end of the study (5.61 ± 0.42 ng/mL vs. 6.98 ± 0.54 ng/mL, $p < 0.05$) (Figure 3).

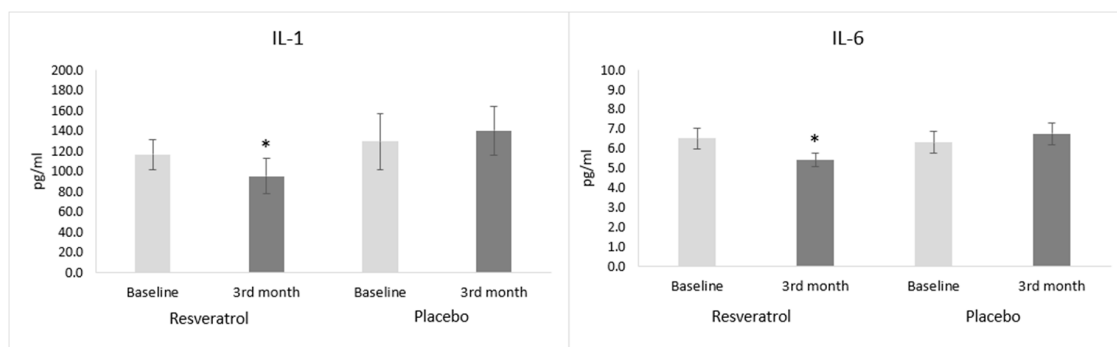


Figure 2. Effect of resveratrol on inflammatory cytokines in heart failure patients. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. placebo group at the 3rd month. Baseline: measured values at randomization in resveratrol or in placebo group and 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. IL: interleukin.

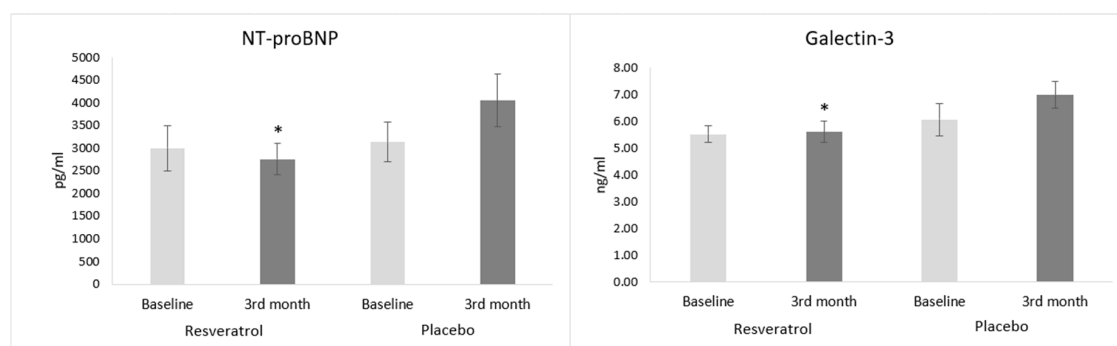


Figure 3. Effects of resveratrol on the biomarkers of heart failure. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. placebo group at the 3rd month. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or in the placebo group and 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic.

3.4. BMI, General Hemodynamic and ECG Parameters

Body mass index (BMI) alterations were not significant in either the resveratrol ($29.31 \pm 0.99 \text{ kg/m}^2$ vs. $29.06 \pm 1.01 \text{ kg/m}^2$, NS) or in the placebo group ($31.04 \pm 1.46 \text{ kg/m}^2$ vs. $31.34 \pm 1.39 \text{ kg/m}^2$, NS) after three months compared to the baseline (Table 5). Similarly, no significant alterations could be seen in the blood pressure, in the heart rate and in the ECG parameters after one month (data not shown) and at the end of the study (Table 5).

Table 5. BMI, general hemodynamic and ECG parameters.

Parameters	Baseline		3rd Month	
	Resveratrol	Placebo	Resveratrol	Placebo
BW (kg)	85.53 \pm 3.09	89.97 \pm 5.06	84.77 \pm 3.19	90.80 \pm 4.77
BMI (kg/m ²)	29.31 \pm 0.99	31.04 \pm 1.46	29.06 \pm 1.01	31.34 \pm 1.39
Systolic BP (Hgmm)	132.5 \pm 3.41	128.8 \pm 3.80	131.6 \pm 3.21	125.8 \pm 2.65
Diastolic BP (Hgmm)	79.10 \pm 2.33	80.13 \pm 2.66	77.83 \pm 1.82	76.30 \pm 2.24
HR (beat/min)	72.20 \pm 2.75	76.93 \pm 2.50	70.04 \pm 2.87	70.73 \pm 2.26
PQ (ms)	164.1 \pm 5.37	187.9 \pm 5.67	162.1 \pm 6.28	189.9 \pm 5.68
QRS (ms)	127.8 \pm 5.35	137.3 \pm 6.19	136.5 \pm 5.68	132.9 \pm 5.84
QTc (ms)	463.7 \pm 5.03	476.9 \pm 6.65	469.9 \pm 5.99	471.2 \pm 5.29

Values are expressed as mean \pm SEM. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or in the placebo group, 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months, BMI: body mass index, BP: blood pressure, BW: body weight, HR: heart rate, PQ: PQ interval on an electrocardiogram (ECG), QRS: the wide of the QRS complex on the ECG and QTc: heart rate-corrected QT interval on ECG.

3.5. The Effect of Resveratrol on Echocardiographic Parameters

The echocardiographic parameters of the patients did not differ significantly between the groups at the beginning of the study. The left ventricular EF measured by two different methods was improved significantly due to resveratrol administration by the end of the treatment period compared to the baseline (Quinone method: $29.19 \pm 1.04\%$ vs. $33.40 \pm 1.20\%$, $p < 0.01$ and Simpson method: $30.06 \pm 1.04\%$ vs. $34.60 \pm 1.44\%$, $p < 0.01$) (Table 6 and Figure 4). In parallel with this result, the left ventricular stroke volume (SV) also increased, and the left ventricular end-systolic volume (LVESV) decreased significantly in the RES group. Global longitudinal strain (GLS,%) of the LV showed a significant improvement ($-8.40 \pm 0.62\%$ vs. $-9.58 \pm 0.73\%$, $p < 0.05$) in the treated group by the end of the follow-up compared to the baseline. In contrast, in the placebo group, no significant change could be observed.

Table 6. Left ventricular echocardiographic parameters.

Echocardiographic Parameters	Baseline		3rd Month	
	Resveratrol	Placebo	Resveratrol	Placebo
EF (Quinone, %)	29.19 ± 1.04	30.16 ± 1.10	$33.40 \pm 1.20^{**\#}$	29.79 ± 0.95
EF (Simson, %)	30.06 ± 1.04	31.70 ± 1.27	$34.60 \pm 1.38^{**\#}$	30.41 ± 1.36
LVIDd (mm)	65.5 ± 1.55	62.83 ± 1.12	65.09 ± 1.44	62.62 ± 1.12
LVIDs (mm)	54.87 ± 1.67	51.90 ± 1.06	52.88 ± 1.62	51.67 ± 1.06
LVEDV (mL)	182.4 ± 11.73	157.3 ± 7.92	176.7 ± 10.05	160.1 ± 8.01
LVESV (mL)	129.0 ± 9.37	106.7 ± 5.80	$116.3 \pm 8.00^{**}$	111.4 ± 5.60
SV (mL)	52.85 ± 2.82	50.69 ± 3.38	$60.46 \pm 3.13^{**\#}$	48.56 ± 3.84
SW (mm)	11.47 ± 0.28	11.83 ± 0.31	11.43 ± 0.29	11.83 ± 0.31
PW (mm)	11.03 ± 0.17	11.17 ± 0.20	11.20 ± 0.17	11.14 ± 0.21
GLS (%)	-8.40 ± 0.62	-8.80 ± 0.75	$-9.58 \pm 0.73^{*\#}$	-8.45 ± 0.75
E (m/s)	0.89 ± 0.04	0.98 ± 0.05	$0.80 \pm 0.05^{*\#}$	1.00 ± 0.05
A (m/s)	0.78 ± 0.04	0.71 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.06
E'	0.05 ± 0.002	0.05 ± 0.003	0.06 ± 0.003	0.05 ± 0.003
E/A ratio	1.26 ± 0.12	1.57 ± 0.20	$1.18 \pm 0.15^{\#}$	1.54 ± 0.19
E/E' ratio	17.65 ± 1.31	19.32 ± 1.21	$15.55 \pm 1.43^{\#}$	19.94 ± 1.43

Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values. ** $p < 0.01$, 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values. # $p < 0.05$, resveratrol vs. placebo group at the 3rd month. A: late diastolic ventricular filling velocity, A': late diastolic mitral annular velocity, GLS: global longitudinal strain of the left ventricle, E: early diastolic ventricular filling velocity, E': early diastolic mitral annular velocity, EF: ejection fraction, LVEDV: left ventricular end-diastolic volume, LVESV: left ventricular end-systolic volume, LVIDd: diastolic left ventricular inner diameter, LVIDs: systolic left ventricular inner diameter, PW: posterior wall thickness, SV: stroke volume and SW: septal wall thickness.

In the case of LV diastolic function, a significant difference in the E/A (1.18 ± 0.15 vs. 1.54 ± 0.19 , $p < 0.05$) and E/E' ratios (15.55 ± 1.43 vs. 19.94 ± 1.43 , $p < 0.05$) was observed between the resveratrol and placebo groups after the three-month-long treatment.

In addition, the LAESV, LA long axis, RVIDd, RVIDs and RAEDV were also decreased significantly in the RES group compared to the RES baseline values, as well as LAEDV, RAESV, IVC and TAPSE, which also showed significant differences between the resveratrol and placebo groups after three months (Table 7).

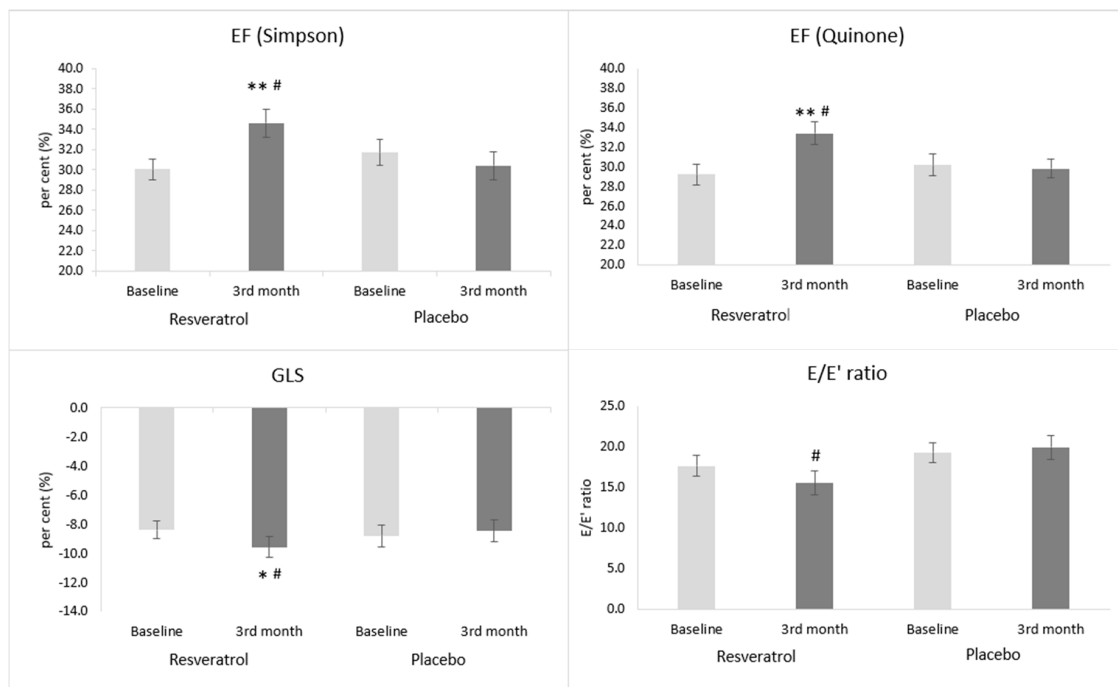


Figure 4. The effect of resveratrol on the left ventricular systolic and diastolic functions. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values. ** $p < 0.01$, 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values. # $p < 0.05$, resveratrol vs. placebo group at the 3rd month. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or in the placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. E: early diastolic ventricular filling velocity, E': early diastolic mitral annular velocity, EF: ejection fraction and GLS: global longitudinal strain of the left ventricle.

Table 7. Echocardiographic parameters of the right ventricle, right atrium and left atrium.

Echocardiographic Parameters	Baseline		3rd Month	
	Resveratrol	Placebo	Resveratrol	Placebo
RVIDd-mid (mm)	27.86 \pm 1.14	23.90 \pm 1.02	25.09 \pm 1.09	26.96 \pm 0.98 *
RVIDd-basal (mm)	37.43 \pm 1.43	34.14 \pm 1.10	34.83 \pm 1.12 *	37.03 \pm 1.17 *
RVIDs (mm)	30.34 \pm 1.21	29.43 \pm 1.26	28.00 \pm 1.05 *	29.86 \pm 1.13
TAPSE (mm)	16.24 \pm 0.74	16.58 \pm 0.74	17.96 \pm 0.82 #	15.76 \pm 0.63
LA long axis (mm)	64.03 \pm 1.68	64.21 \pm 1.25	61.79 \pm 1.72 * #	64.17 \pm 1.14
LA short axis (mm)	46.14 \pm 0.98	45.38 \pm 0.93	45.29 \pm 1.03	45.45 \pm 0.99
LA area (cm ²)	27.11 \pm 1.33	27.95 \pm 1.10	25.99 \pm 1.35	28.05 \pm 1.10
LAEDV (mL)	59.96 \pm 5.24	63.68 \pm 4.21	50.74 \pm 3.14 #	66.24 \pm 4.79
LAESV (mL)	87.52 \pm 5.37	87.95 \pm 4.69	78.12 \pm 3.99 * #	88.00 \pm 4.92
RA long axis (mm)	58.34 \pm 2.13	58.59 \pm 1.63	56.72 \pm 2.28	60.10 \pm 1.65
RA short axis (mm)	41.34 \pm 1.21	41.00 \pm 1.11	39.86 \pm 1.37	40.31 \pm 1.04
RA area (cm ²)	21.20 \pm 2.12	21.28 \pm 1.30	20.08 \pm 2.09	21.56 \pm 1.33
RAEDV (mL)	42.87 \pm 4.44	44.24 \pm 5.18	34.50 \pm 3.47 * #	43.14 \pm 4.68
RAESV (mL)	54.63 \pm 5.15	60.23 \pm 5.53	49.32 \pm 3.50 #	63.04 \pm 5.64
IVC (mm)	16.08 \pm 1.01	17.38 \pm 0.97	15.24 \pm 0.89 #	18.79 \pm 0.84

Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, 3rd month values of the resveratrol or placebo group compared to the baseline values. # $p < 0.05$, resveratrol vs. placebo group at the 3rd month. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or in the placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. IVC: inferior vena cava, LA: left atrium, LAEDV: left atrium end-diastolic volume, LAESV: left atrium end-diastolic volume, RA: right atrium; RAEDV: right atrium end-diastolic volume, RAESV: right atrium end-diastolic volume, RVIDd-basal: diastolic basal right ventricular inner diameter, RVIDd-mid: diastolic mid-right ventricular inner diameter, RVIDs: systolic right ventricular inner diameter and TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion.

3.6. The Effect of Resveratrol on Exercise Capacity

The six-minute walk distance increased significantly in the resveratrol group (from 275 ± 19 m to 298 ± 22 m, $p < 0.05$) by the end of the treatment period compared to the baseline; however, in the placebo group, there was no apparent change (NS).

3.7. The Effect of Resveratrol on the Respiratory Parameters

The treatment with resveratrol resulted in significantly improved FVC ($75.38 \pm 3.31\%$ vs. $79.27 \pm 3.07\%$, $p < 0.05$) by the end of the study period. Other expiratory parameters did not show any changes compared to the baseline values (Table 8). However, the inspiratory vital capacity (IVC) also increased significantly by resveratrol administration ($83.85 \pm 3.65\%$ vs. $90.27 \pm 3.39\%$, $p < 0.05$) compared to the baseline.

Table 8. The effect of resveratrol on the spirometric parameters.

Spirometric Parameters	Baseline		3rd Month	
	Resveratrol	Placebo	Resveratrol	Placebo
FVC (%)	75.38 ± 3.31	74.41 ± 3.75	$79.27 \pm 3.07^*$	76.91 ± 4.08
FEV ₁ (%)	64.67 ± 3.22	65.10 ± 3.67	67.38 ± 3.00	65.90 ± 3.98
FEV ₁ /FVC ratio (%)	89.79 ± 1.84	94.63 ± 2.18	89.29 ± 2.33	93.74 ± 2.80
PEF (%)	56.50 ± 3.01	55.91 ± 3.67	57.13 ± 3.28	59.09 ± 3.89
FEF 25-75 (%)	55.92 ± 3.79	55.50 ± 3.80	55.81 ± 3.98	58.38 ± 4.82
MEF75 (%)	58.50 ± 3.60	56.68 ± 3.50	60.85 ± 3.99	60.90 ± 4.33
MEF50 (%)	55.65 ± 4.10	52.95 ± 3.83	55.35 ± 3.77	57.14 ± 4.09
MEF25 (%)	52.35 ± 4.30	55.95 ± 5.16	53.23 ± 4.73	56.21 ± 4.94
IVC (%)	83.35 ± 3.65	81.32 ± 3.60	$90.27 \pm 3.39^*$	86.36 ± 3.91

Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, 3rd month values of resveratrol group compared to the baseline values. Baseline: measured values at randomization in resveratrol or in placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. FEF 25–75%: forced expiratory flow 25–75%, FEV₁: forced expiratory volume, FVC: forced vital capacity, IVC: inspiratory vital capacity, MEF: maximal expiratory flows at 25%, 50% or 75% of FVC, PEF: peak expiratory flow.

3.8. The Effect of Resveratrol on the Quality of Life in Patients with Systolic Heart Failure

For the assessment of QoL the “Euro QoL five-dimension” (EQ-5D) questionnaire was used. The main domains of the test did not differ significantly among the groups at the beginning of the study. Our nonparametric statistical analysis showed significant improvement in the mobility ($Z = -2.236$, $p < 0.05$), usual activities ($Z = -2.646$, $p < 0.05$) and anxiety/depression ($Z = -2.236$, $p < 0.05$) but did not reveal any significant difference in self-care and pain/discomfort of the patients in their resveratrol-treated group after three months compared to the baseline values. Summary, RES administration resulted in a significantly improved percentage of the subjective health state ($54.86 \pm 2.78\%$ vs. $61.17 \pm 2.72\%$; $Z = -3.146$, $p = 0.002$), but there was no significant change in the placebo group ($49.43 \pm 3.15\%$ vs. $48.17 \pm 3.34\%$; $Z = -0.631$, NS).

3.9. Sequence Analysis and Differential Expression

At the end of the study, the mRNA analysis of seven patients showed that, in the resveratrol group, 222 genes were differently expressed ((FC (fold change) abs. value > 1.5 and FDR p -value < 0.05) compared to the baseline values (Figure 5A,B).

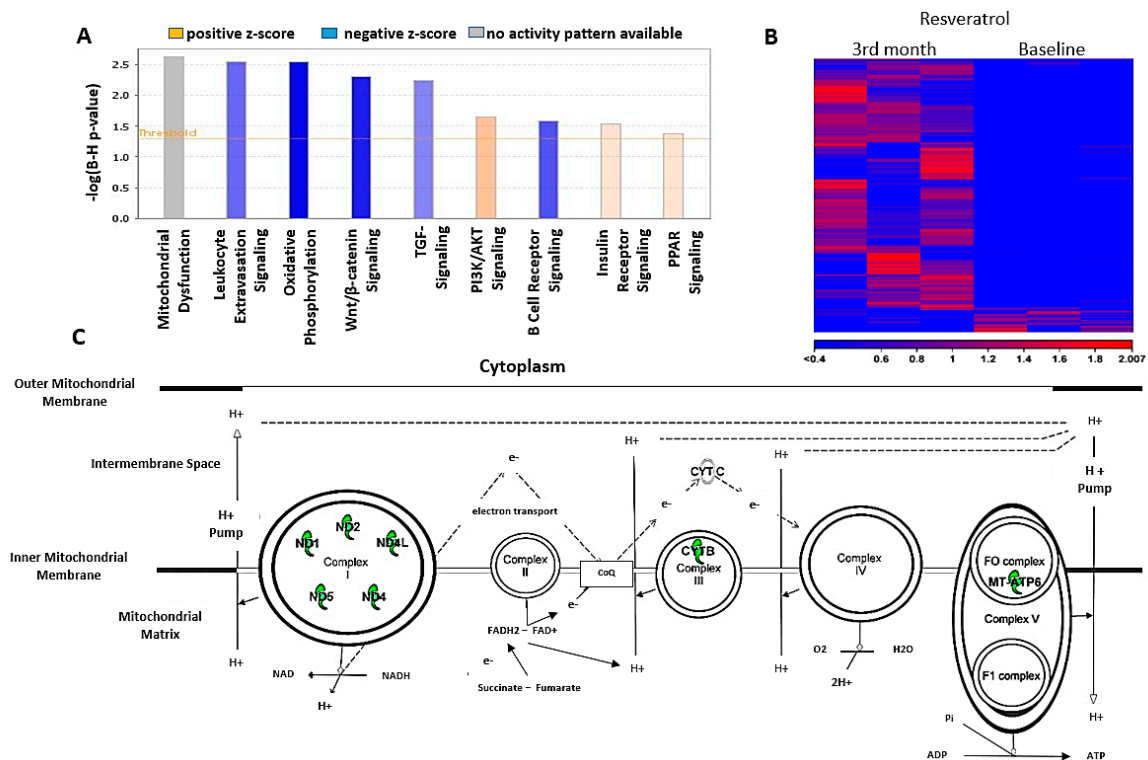


Figure 5. (A) Summary of the canonical pathways impacted by the differentially expressed genes (DEGs) due to the resveratrol treatment ($n = 7$). Coloring of the bars represents the predicted activation state of the given pathway based on Z-score calculations applied on the differential expression of the genes in our study, included in the given canonical pathway. (B) Resveratrol supplementation induced expressional alterations in human leukocytes. Heat map visualizing the expression values of the differentially expressed genes (the most demonstrative 3 patients) significant in the resveratrol-treated patients. Hierarchical clustering was conducted on Euclidean distances and complete linkages. (C) The effect of RES on electron transport chains (ETC) in leukocytes. The canonical pathway of oxidative phosphorylation (generated by the IPA /Ingenuity Pathway Analysis/ program) depicting (green) only the members of ETC complexes demonstrating suppressed expression due to the resveratrol treatment. ADP: adenosine diphosphate, ATP: adenosine triphosphate, CoQ: coenzyme Q, MT-ATP6: gene of mitochondrial ATP synthase, NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, ND: NADH dehydrogenase and CYT: cytochrome.

The main finding in this trial was that the resveratrol treatment suppressed the expression of seven genes of mitochondrial ETC (electron transport chain) members in leukocytes, including MT-ATP6 (ATP synthase F0 subunit 6—complex V), MT-CYB (cytochrome b), MT-ND1 (NADH dehydrogenase, subunit 1—complex I), MT-ND2 (NADH dehydrogenase, subunit 2—complex I), MT-ND4 (NADH dehydrogenase, subunit 4—complex I), MT-ND5 (NADH dehydrogenase, subunit 5—complex I) and MT-ND4L (NADH dehydrogenase, subunit 4L—complex I) (Figure 5C). However, the genes of complex II and complex IV were not affected by resveratrol. Our results revealed that resveratrol had an inhibitory effect on ATP synthesis via the oxidative phosphorylation; however it did not lead to mitochondrial dysfunction in leukocytes, because it has no negative effect on the proteins affecting the mitochondrial quality control (Figure 5A).

4. Discussion

Our present work firstly proved that resveratrol beneficially influences heart failure in a randomized double-blind clinical trial (RCT). The major findings of our trial are that the resveratrol treatment improved heart function, exercise tolerance, several spirometry parameters and quality of life and decreased the level of cholesterol and inflammatory cytokines in systolic heart failure patients.

It is well-established that resveratrol has various beneficial effects on the cardiovascular system. It has a marked antioxidant effect due to its scavenger capability and due to enhancing the antioxidant enzyme production (SOD, CAT and eNOS), as well as decreasing the amount of prooxidant enzymes (NOXs and MPO) [31–33]. Therefore, resveratrol also has a marked anti-inflammatory and antiplatelet effect [34–36]. Resveratrol also has beneficial effect on metabolic parameters; it can decrease the cholesterol level and improve the insulin resistance [37,38]. However, these data are derived almost completely from preclinical studies.

It was published previously by our workgroup that resveratrol in a murine post-infarct heart failure model improves the heart function and decreases myocardial fibrotic remodeling via its anti-inflammatory effect and via blocking the profibrotic intracellular signaling routes [25]. Other workgroups showed similar results in various animal heart failure models; however, in a human clinical trial, the effect of RES has not been confirmed yet [13,26].

In this one-center double-blind RCT, the baseline characteristics of symptomatic systolic heart failure (HFrEF) patients were well-balanced due to the used randomization method (adaptive minimization) [39]. Guideline-directed medical treatment (GDMT) was administered in the maximal tolerated dose, and almost every patient was given ACEI or ARB and beta-blockers, and only one-quarter of the patients was not on MRA treatments (Table 2).

In our heart failure patients, resveratrol supplementation improved the systolic left ventricular function expressed as the ejection fraction (EF). The EF was measured in two different ways, by using the Quinones and the Simpson methods. We chose the Quinones method instead of the Teichholz's method, because according to the literature, it is better correlation with volumetric methods [40]. Nowadays, however, the volumetric Simpson method is by far the most commonly used method for quantifying left ventricular function. In the case of both methods, a similar increase could be seen in the resveratrol-treated group; however, in the placebo group, no change was observable.

Global longitudinal strain (GLS) is another measure of LV global function that also correlates with the extent of myocardial fibrosis in patients with HFrEF [41]. In the placebo-treated group, the GLS value remained unchanged by the end of the treatment period. The resveratrol treatment, however, caused an improvement of the GLS value in parallel with other measures indicating systolic heart function. Moreover, GLS can show the extent of myocardial remodeling, especially myocardial fibrosis. In parallel with the improvement of systolic heart function, diastolic heart function also got better (i.e., the E/e' ratio decreased) in the resveratrol group. In the placebo group the diastolic function was unchanged.

Natural polyphenols could improve heart function in a wide variety of experimental heart failure models [42–44]. However, in human clinical trials, there are only a few data regarding the effect of resveratrol treatment on heart function. Our workgroup proved previously that a low-dose resveratrol treatment (10 mg/day) improved the diastolic function in patients with coronary artery disease (CAD), while, in the case of systolic LV function, only a favorable tendency was present (NS) [45]. In another small trial also conducted in CAD patients using a higher dose (100 mg/day) of resveratrol, both the systolic and diastolic function improved.

Not only the heart function but, also, the exercise tolerance determined by the 6MWT showed significant improvement in resveratrol-treated patients by the end of the three-month-long treatment period. This result is in accordance with the preclinical results carried out in several murine models [46]. However, there are no clinical data regarding the effect of resveratrol on the physical exercise capacity in heart failure patients yet. In an interesting trial, Voduc N. and his coworkers proved that resveratrol itself in healthy people has no positive effect on exercise capacity and on the maximal oxygen consumption (VO₂max) [47]; moreover, Glieman L. et al. demonstrated that, in aged men, the resveratrol treatment blunted the positive cardiovascular effects of exercise and moderated the increase of VO₂max caused by the training program [48]. Therefore, the increase of exercise capacity can be predominantly the consequence of the improvement of heart function in heart failure patients.

The analysis of cardiac biomarkers strengthens the findings regarding heart function and exercise tolerance. Galectin-3, which is secreted by macrophages, has been known for its significant role in mediating cardiac fibrosis and inflammation [49]. These data were also proved in a human clinical examination [50]. In our trial, the resveratrol treatment decreased the galectin-3 level, but in the placebo group, no change could be seen. This result supports the beneficial changes that occurred in the case of GLS, because GLS is directly proportional to the extent of interstitial fibrosis [41].

NT-proBNP is the most widely used biomarker in the diagnosis and risk stratification of heart failure. It shows a strong correlation with the severity of heart failure, although its value can be variable due to alterations in the volume status of patients. In our trial, the resveratrol supplementation decreased the level of NT-proBNP (NS), and in the placebo group, a worsening tendency could be seen, so by the end of the treatment period, a significantly lower natriuretic peptide level was achieved in the RES group than in the placebo group. In a study conducted in stable CAD patients, Militaru and coworkers found that resveratrol decreases the NT-proBNP level even without overt heart failure [51]. The continuously increasing level of heart failure biomarkers (NT-proBNP and galectin-3) in the placebo group can be a consequence of the progression of the disease. According to the literature, there was a linear relationship between NT-proBNP and the number of hospitalization, as well as mortality, due to heart failure [52].

The improvement of left ventricular heart function in the resveratrol-treated group is in-line with the decreased volume retention and with the decongestion of organs. It is known that extravascular fluid accumulation in the lungs is accompanied by the alteration of several spirometry measures, e.g., forced vital capacity (FVC) and inspiratory vital capacity (IVC) [53,54]. Moreover, Gehlback et al. showed that, after heart transplantation, not only the ventilation volumes but the airflow velocity (FEV1) was also better [54]. Due to resveratrol supplementation in the present trial, FVC and IVC increased significantly by the end of the treatment period. However, in the case of airway obstruction parameters, no significant changes could be seen in this study. FEV1 showed only a mild, nonsignificant improvement in the RES group.

The level of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6 decreased in the resveratrol-treated heart failure patients compared to the placebo group. Similar results were seen in the literature [55]. This favorable change is parallel with the level of galectin-3 β that mediates inflammation. The levels of inflammatory cytokines produced by the activated leukocytes are inversely proportional to the systolic left ventricular function [56]. The increasing level of IL-1 and IL-6 in the placebo group can be explained by the slow progression of heart failure in our enrolled population. The correlation between inflammation and adverse cardiovascular outcomes in heart failure was documented. Essentially, heart failure progression was attributed to sustained proinflammatory cytokine signaling, based on the observation that proinflammatory cytokines were elevated and continuously worsened during the progression of the disease [57]. Interestingly, the mRNA profile analysis of leukocytes revealed a significant decrease in genes encoding several mitochondrial respiratory proteins. Resveratrol, however, did not interfere with the expression of various proteins playing a part in the mitochondrial quality control. Moderating the production of ETC proteins in leukocytes can decrease the oxidative phosphorylation in leukocytes, which is directly proportional to their activity. The decreased production of proinflammatory cytokines in this work can be a sign of the moderated activity of leukocytes. This anti-inflammatory effect can be an important aspect of the resveratrol treatment in heart failure patients, besides its well-known mitochondrial protective effects in cardiomyocytes.

5. Conclusions

In this human clinical trial, the positive effects of resveratrol were proved in systolic heart failure (HFrEF) patients added to the standard therapy. The resveratrol treatment improved several parameters of heart function, exercise tolerance and quality of life. Moreover, resveratrol exerted an anti-inflammatory effect measured by the decrease of levels of inflammatory cytokines (IL-1 and

IL-6). According to our results, the decreased activity of leukocytes can be an important mechanism of resveratrol, and it can contribute to its cardioprotective effect in heart failure.

6. Limitations of the Study

This study has some potential limitations. Although the study was double-blinded and randomized, (1) the number of the enrolled patients was quite low ($n = 30/\text{group}$), and (2) the follow-up period was relatively short. Due to these limitations, the results, including RNA sequencing, have to be interpreted cautiously. In the future, adequately powered randomized, controlled trials reporting patient-relevant outcomes with long-term follow-up periods are required to properly prove the efficacy of resveratrol supplementation in systolic heart failure, as well as to understand the exact biochemical and cellular mechanism.

Author Contributions: Conceptualization, R.H. and T.H.; supervision, B.S. (Balazs Sumegi), K.T. and T.H.; investigation, R.G., S.S., Z.M., L.D., K.E., P.U., O.H. and R.H.; methodology, R.G. and R.H.; writing—original draft preparation, R.G.; writing—review and editing, R.G. and R.H.; statistical analysis and software, B.S. (Barbara Sandor) and R.G.; revised the manuscript, T.H., B.S. (Balazs Sumegi) and K.T.; resources, B.S. (Balazs Sumegi) and K.T.; data curation, T.H. and funding acquisition, B.S. (Balazs Sumegi) and K.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by an Economic Development and Innovation Operative Programme Grant (GINOP 2.3.2-15-2016-00048) and by the Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the 1st thematic programme of the University of Pecs (TUDFO/47138/2019-ITM).

Acknowledgments: Balazs Sumegi unexpectedly passed away during the course of this study. This paper is dedicated to his memory. R. Halmosi and T. Habon were equally involved in directing the work (shared last authorship).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ponikowski, P.; Voors, A.A.; Anker, S.D.; Bueno, H.; Cleland, J.G.F.; Coats, A.J.S.; Falk, V.; Gonzalez-Juanatey, J.R.; Harjola, V.; Jankowska, E.A. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2129–2200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Greenberg, B.H. A Treatment Approach for Patients with Chronic Systolic Heart Failure. *Rev. Cardiovasc. Med.* **2016**, *17*, S22–S29. [[PubMed](#)]
3. Mosterd, A.; Hoes, A.W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* **2007**, *93*, 1137–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ziaeeian, B.; Fonarow, G.C. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **2016**, *13*, 368–378. [[CrossRef](#)]
5. Swedberg, K.; Komajda, M.; Böhm, M.; Borer, J.S.; Ford, I.; Dubost-Brama, A.; Lerebours, G.; Tavazzi, L. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): A randomised placebo-controlled study. *Lancet* **2010**, *376*, 875–885. [[CrossRef](#)]
6. McMurray, J.J.; Packer, M.; Desai, A.S.; Gong, J.; Lefkowitz, M.P.; Rizkala, A.R.; Rouleau, J.L.; Shi, V.C.; Solomon, S.D.; Swedberg, K.; et al. PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 993–1004. [[CrossRef](#)]
7. Sauer, A.J.; Cole, R.; Jensen, B.C.; Pal, J.; Sharma, N.; Yehya, A.; Vader, J. Practical guidance on the use of sacubitril/valsartan for heart failure. *Heart Fail. Rev.* **2019**, *24*, 167–176. [[CrossRef](#)]
8. Bui, A.L.; Horwich, T.B.; Fonarow, G.C. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **2011**, *8*, 30–41. [[CrossRef](#)]
9. Kim, D.H.; Chien, F.J.; Eisen, H.J. Pharmacologic Management for Heart Failure and Emerging Therapies. *Curr. Cardiol. Rep.* **2017**, *19*, 94. [[CrossRef](#)]
10. Patel, C.; Deoghare, S. Heart failure: Novel therapeutic approaches. *J. Postgrad. Med.* **2015**, *61*, 101–108. [[CrossRef](#)]

11. Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Matsushimam, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H2181–H2190. [[CrossRef](#)]
12. Oyewole, A.O.; Birch-Machin, M.A. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* **2015**, *12*, 4766–4771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Raj, P.; Lieben Louis, X.; Thandapilly, S.J.; Movahed, A.; Zieroth, S.; Netticadan, T. Potential of resveratrol in the treatment of heart failure. *Life Sci.* **2014**, *95*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gupta, P.K.; DiPette, D.J.; Supowit, S.C. Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 218–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wojciechowski, P.; Juric, D.; Louis, X.L.; Thandapilly, S.J.; Yu, L.; Taylor, C.; Netticadan, T. Resveratrol arrests and regresses the development of pressure over load-but not volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 962–968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Danz, E.D.; Skramsted, J.; Henry, N.; Bennett, J.A.; Keller, R.S. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 1589–1597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Xia, N.; Daiber, A.; Förstermann, U.; Li, H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1633–1646. [[CrossRef](#)]
18. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122. [[CrossRef](#)]
19. Gu, X.S.; Wang, Z.B.; Ye, Z.; Lei, J.P.; Li, L.; Su, D.F.; Zheng, X. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 323–335. [[CrossRef](#)]
20. Dyck, G.J.B.; Raj, P.; Zieroth, S.; Dyck, J.R.B.; Ezekowitz, J.A. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 904. [[CrossRef](#)]
21. Xia, N.; Forstermann, U.; Li, H. Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1403*, 132–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schwager, J.; Richard, N.; Widmer, F.; Raederstorff, D. Resveratrol distinctively modulates the inflammatory profiles of immune and endothelial cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Carrizzo, A.; Puca, A.; Damato, A.; Marino, M.; Franco, E.; Pompeo, F.; Traficante, A.; Civitillo, F.; Santini, L.; Trimarco, V.; et al. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension* **2013**, *62*, 359–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Simental-Mendía, L.E.; Guerrero-Romero, F. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* **2019**, *58*, 7–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Riba, A.; Deres, L.; Sumegi, B.; Toth, K.; Szabados, E.; Halmosi, R. Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 6819281. [[CrossRef](#)]
26. Sung, M.M.; Dyck, J.R.B. Therapeutic potential of resveratrol in heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1348*, 32–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Rosei, E.A.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D.L.; Coca, A.; de Simone, G.; Dominiczak, A.; et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 3021–3104. [[CrossRef](#)]
28. Crapo, R.O.; Casaburi, R.; Coates, A.L. ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *166*, 111–117.
29. Johnson, B.D.; Beck, K.C.; Olson, L.J.; O'Malley, K.A.; Allison, T.G.; Squires, R.W.; Gau, G.T. Ventilatory constraints during exercise in patients with chronic heart failure. *Chest* **2000**, *117*, 321–332. [[CrossRef](#)]
30. Dyer, M.T.D.; Goldsmith, K.A.; Sharples, L.S.; Buxton, M.J. A review of health utilities using the EQ-5D in studies of cardiovascular disease. *Health Qual. Life Outcomes* **2010**, *8*, 13. [[CrossRef](#)]
31. Karlsson, J.; Emgard, M.; Brundin, P.; Burkitt, M.J. Trans-Resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tertButyl hydroperoxide: Electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Spanier, G.; Xu, H.; Xia, N.; Tobias, S.; Deng, S.; Wojnowski, L.; Forstermann, U.; Li, H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPX1) and NADPH oxidase subunit (NOX4). *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 111–116.

33. Thirunavukkarasu, M.; Penumathsa, S.V.; Koneru, S.; Juhasz, B.; Zhan, L.; Otani, H.; Bagchi, D.; Das, D.K.; Maulik, N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin and heme oxygenase. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 720–729. [[CrossRef](#)]
34. Yildiz, F.; Terzi, A.; Coban, S.; Celik, H.; Aksoy, N.; Bitiren, M.; Cakir, H.; Ozdogan, M.K. Protective effects of resveratrol on small intestines against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 1781–1785. [[CrossRef](#)]
35. Sharma, S.; Chopra, K.; Kulkarni, S.K.; Agrewala, J.N. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *147*, 155–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Shen, M.Y.; Hsiao, G.; Liu, C.L.; Fong, T.H.; Lin, K.H.; Chou, D.S.; Sheu, J.R. Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: Pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br. J. Haematol.* **2007**, *139*, 475–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cho, I.J.; Ahn, J.Y.; Kim, S.; Choi, M.S.; Ha, T.Y. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367*, 190–194. [[CrossRef](#)]
38. Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **2006**, *444*, 337–342. [[CrossRef](#)]
39. Lin, Y.; Zhu, M.; Su, Z. The pursuit of balance: An overview of covariate-adaptive randomization techniques in clinical trials. *Contemp. Clin. Trials* **2015**, *45*, 21–25. [[CrossRef](#)]
40. Wilson, D.J.; North, N.; Wilson, R.A. Comparison of Left Ventricular Ejection Fraction Calculation Methods. *Echocardiography* **1998**, *15*, 709–712. [[CrossRef](#)]
41. Cameli, M.; Mondillo, S.; Righini, F.M.; Lisi, M.; Dokollari, A.; Lindqvist, P.; Maccherini, M.; Henein, M. Left Ventricular Deformation and Myocardial Fibrosis in Patients with Advanced Heart Failure Requiring Transplantation. *J. Card. Fail.* **2016**, *22*, 901–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Qin, F.; Siwik, D.A.; Luptak, I.; Hou, X.; Wang, L.; Higuchi, A.; Weisbrod, R.M.; Ouchi, N.; Tu, V.H.; Calamaras, T.D.; et al. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circulation* **2012**, *125*, 1757–1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sulaiman, M.; Matta, M.J.; Sunderesan, N.R.; Gupta, M.P.; Periasamy, M.; Gupta, M. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *298*, H833–H843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Matsumura, N.; Takahara, S.; Maayah, Z.H.; Parajuli, N.; Byrne, N.J.; Shoieb, S.M.; Soltys, C.M.; Beker, D.L.; Masson, G.; El-Kadi, A.O.S.; et al. Resveratrol improves cardiac function and exercise performance in MI-induced heart failure through the inhibition of cardiotoxic HETE metabolites. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2018**, *125*, 162–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Magyar, K.; Halmosi, R.; Palfi, A.; Feher, G.; Czop, L.; Fulop, A.; Battyany, I.; Sumegi, B.; Toth, K.; Szabados, E. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2012**, *50*, 179–187. [[CrossRef](#)]
46. Hart, N.; Sarga, L.; Csende, Z.; Koltai, E.; Koch, L.G.; Britton, S.L.; Davies, K.J.; Kouretas, D.; Wessner, B.; Radak, Z. Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *61*, 53–59. [[CrossRef](#)]
47. Voduc, N.; la Porte, C.; Tessier, C.; Mallick, R.; Cameron, D.W. Effect of resveratrol on exercise capacity: A randomized placebo-controlled crossover pilot study. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2014**, *39*, 1183–1187. [[CrossRef](#)]
48. Gliemann, L.; Schmidt, J.F.; Olesen, J.; Biensø, R.S.; Peronard, S.L.; Grandjean, S.U.; Mortensen, S.P.; Nyberg, M.; Bangsbo, J.; Pilegaard, H.; et al. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5047–5059. [[CrossRef](#)]
49. Amin, H.Z.; Amin, L.Z.; Wijaya, I.P. Galectin-3: A novel biomarker for the prognosis of heart failure. *Clujul. Med.* **2017**, *90*, 129–132. [[CrossRef](#)]
50. Brinchmann, M.F.; Patel, D.M.; Iversen, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2018**, *2018*, 9186940. [[CrossRef](#)]
51. Militaru, C.; Donoiu, I.; Craciun, A.; Scorei, I.D.; Bulearca, A.M.; Scorei, R.I. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: Effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition* **2013**, *29*, 178–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Gaggin, H.K.; Januzzi, J.L. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 2442–2450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chase, S.C.; Fermoye, C.C.; Wheatley, C.M.; Schaefer, J.J.; Olson, L.J.; Johnson, B.D. The effect of diuresis on extravascular lung water and pulmonary function in acute decompensated heart failure. *ESC Heart Fail.* **2018**, *5*, 364–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gehlbach, B.K.; Geppert, E. The pulmonary manifestations of left heart failure. *Chest* **2004**, *125*, 669–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Malaguarnera, L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients* **2019**, *11*, 946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yan, A.T.; Yan, R.T.; Cushman, M.; Redheuil, A.; Tracy, R.P.; Arnett, D.K.; Rosen, B.D.; McClelland, R.L.; Bluemke, D.A.; Lima, J.A.C. Relationship of interleukin-6 with regional and global left-ventricular function in asymptomatic individuals without clinical cardiovascular disease: Insights from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 875–882. [[CrossRef](#)]
57. Mann, D.L. Innate immunity and the failing heart: The cytokine hypothesis revisited. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1254–1268. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Research Article

Hemorheological Alterations in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction Treated by Resveratrol

Roland Gal ^{1,2}, Dora Praksch ^{1,2}, Peter Kenyeres^{1,2}, Miklos Rabai^{1,2}, Kalman Toth^{1,2}, Robert Halmosi^{1,2}, and Tamas Habon ^{1,2}

¹Division of Cardiology, 1st Department of Medicine, Medical School, University of Pécs, Hungary

²Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Hungary

Correspondence should be addressed to Roland Gal; gal.roland@pte.hu

Received 29 February 2020; Accepted 30 May 2020; Published 1 July 2020

Academic Editor: Leonardo De Luca

Copyright © 2020 Roland Gal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objectives. Several beneficial effects of resveratrol have already been published. This study evaluated the effect of resveratrol on the hemorheological parameters in patients with heart failure with reduced ejection fraction. **Methods.** In our double-blind, placebo-controlled human clinical trial, we enrolled 60 outpatients with heart failure. Patients were randomized into two groups: receiving either 100 mg resveratrol capsule daily or placebo for 3 months. Hematocrit was determined by microhematocrit centrifuge. Plasma and whole blood viscosity was evaluated by capillary viscometer. Erythrocyte aggregation was measured by both LORCA and Myrenne aggregometers. LORCA ektacytometer was used for measuring erythrocyte deformability. Exercise capacity was assessed by a 6-minute walk test. **Results.** Resveratrol treatment did not have any significant effect on hematocrit and viscosity. The erythrocyte deformability also remained unchanged. However, significant improvement of red blood cell aggregation was observed in the resveratrol group compared to baseline after 3 months. Furthermore, positive correlation was found between the exercise capacity and the hemorheological properties (Hct, WBV, and RBC aggregation and deformability) as well. **Conclusion.** These findings indicate that resveratrol can significantly reduce red blood cell aggregation, which may positively influence microcirculation, which may contribute to the improvement of tissue perfusion and oxygen supply in heart failure.

1. Introduction

Heart failure (HF) continues to be a significant cause of cardiovascular mortality. Over the past few decades, numerous medical and device-based therapies have been developed for the management of heart failure; however, mortality remains high even in optimally treated patients [1]. Heart failure is a systemic, multifactorial disease, in which complex structural, neurohumoral, cellular, and molecular changes lead to volume overload, increased sympathetic activity, and redistribution of circulation and result in different, developing clinical signs and symptoms in parallel [2, 3]. Complex impairment of peripheral and coronary blood flow in HF including restricted microcirculation, attenuated regulatory mechanisms, and impaired hemorheological properties causes reduced oxygen utilization contributing to the symptoms and progression of heart failure [4–6].

Red blood cell (RBC) aggregation and deformability have an important role in capillary blood flow including coronary microcirculation. Besides many clinical states (e.g., ischemic heart disease, diabetes, and venous thrombosis), heart failure is known to be associated with increased RBC aggregation, which has a negative influence on the in vivo flow dynamics of blood. The reduction of RBC aggregation may have a positive effect on the flow properties of blood, which can be beneficial in cardiovascular diseases [7–10]. Furthermore, when the vascular autoregulatory reserve is exhausted in heart failure, the hemorheological disturbances—which can be easily compensated in healthy individuals—will have deleterious effects. Moreover, rheological disorders were found to be present even in the early stage of cardiovascular diseases, before their massive functional manifestation [5, 6, 11].

Over the past several decades, numerous reports have demonstrated enhanced expression of inflammatory cytokines

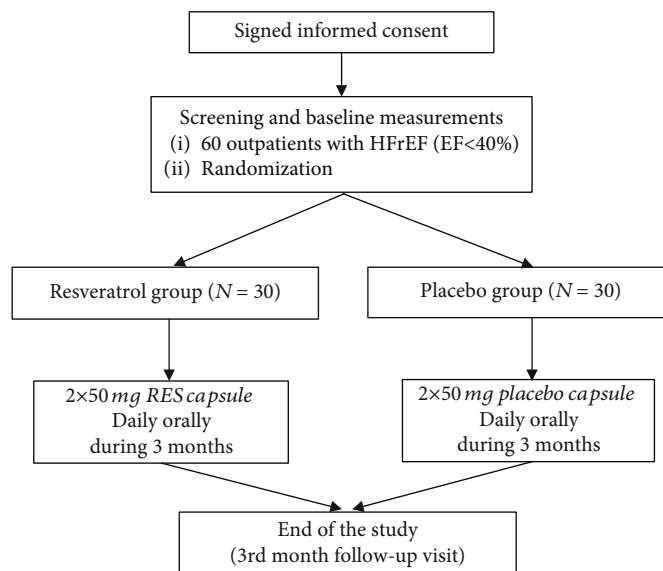


FIGURE 1: Study design.

(e.g., TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-18) and reactive oxygen species (ROS) in chronic heart failure. These pathological conditions contribute to cardiac damage (remodelling, hypertrophy, fibrosis, etc.) and peripheral vascular disturbances [12–14]. Red blood cells are also prone to oxidative stress being the first cells in the body to be exposed to stressful stimuli, which results in abnormalities in the function, morphology, and metabolism of erythrocytes [15]. The aggregation and deformability of RBCs depend on the cellular properties as well as the mechanical and physicochemical characteristics of their environment (e.g., fibrinogen, large molecular weight globulins) [16], and both are influenced by the aforementioned processes.

French people tend to have a lower incidence of cardiovascular diseases despite having similar coronary risk factors as people in other industrialized countries. This phenomenon is known as the French paradox and is attributed to the higher red wine intake by the French [17].

Red wine contains high amount of polyphenolic compounds like resveratrol (RES), catechin, and quercetin, and RES is considered to be primarily responsible for the cardioprotective effect of red wine. Resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) is a nonflavonoid polyphenolic compound produced by plants in response to environmental stress. Several mechanisms may be responsible for the cardioprotective effect of RES including reduction of oxidative stress, inflammation, and pathologic hypertrophic signaling and improved Ca^{2+} handling [18–22]. As these are important factors also in the pathogenesis of heart failure, we supposed that resveratrol may also have protective effects in heart failure.

The effects of moderate red wine consumption and the effectiveness of RES treatment on hemorheological parameters have already been evaluated in some previous animal and human trials. In a previous in vivo study of our working group, moderate red wine consumption had beneficial effect on red blood cell aggregation and deformability in healthy

volunteers. Moreover, a significant improvement of RBC deformability and platelet aggregation was observed after RES administration (10 mg daily for 3 months) in patients with chronic ischemic heart disease [8, 23, 24].

According to literature, no effects of RES on rheological properties have been reported in heart failure. Therefore, the aim of this study was to test our hypothesis that resveratrol can improve the hemorheological parameters in patients with heart failure with reduced ejection fraction.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design. Our trial was a single-center, double-blind, randomized placebo-controlled human study. The study design is summarized in Figure 1. The study was conducted in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki (1996) and International Conference on Harmonization Good Clinical Practice, as well as local and national regulations. The protocol of the trial was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs (license number 5830). Written informed consent has been provided by all patients prior to any study-related procedures.

2.2. Eligibility. 60 stable outpatients (age: 66.7 ± 2.01 years, 17 women and 43 men) with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) in NYHA (New York Heart Association) class II or III were enrolled between 01/03/2016 and 30/11/2017 into our study (ejection fraction (EF) < 40%; ischemic/nonischemic: 34/26). They were randomized into two groups (resveratrol group and placebo group): 100 mg resveratrol capsules were administered orally for 3 months (2×50 mg) in the first group ($n = 30$) and identical placebo capsules in the second group ($n = 30$). The baseline values of RES and placebo groups were compared to the age-matched control group (mean age: 67.15 ± 1.01 years, female/male: 11/9), without

heart failure (ejection fraction > 50%), and with moderate cardiovascular risk profile.

The resveratrol capsule and the matching placebo were purchased from ARGINA Nutraceuticals Ltd. (Fót, Hungary). The resveratrol capsule is commercially available and has official license for being marketed.

The main exclusion criteria were acute cardiovascular or cerebrovascular event, major cardiac surgery or intervention within 30 days prior to randomization, renal failure (estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 20 ml/1.73 m²/min), or hepatic impairment (alanine aminotransferase (ALT) or aspartate aminotransferase (AST) ≥ 2x upper limit of normal (ULN) at baseline).

All of the involved patients received the evidence-based drug treatment for heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF), including angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (or angiotensin receptor blocker (ARB)), beta-blockers, mineralocorticoid receptor antagonists (MRA), and in certain cases ivabradine. No patients were on angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNI) therapy. The preventive drug regime and the used doses were based on the actual ESC (European Society of Cardiology) heart failure guideline [2].

The patients had baseline and 3-month follow-up visits. During visits, the compliance of the patients was checked according to self-report and counting the remaining capsules at the final (3-month follow-up) visit. During the whole study period, subjects were in stable clinical condition and received unchanged medical therapy (Table 1).

The baseline characteristics and the homogeneity of our randomized population are described in Table 1. There were no significant differences in epidemiological characteristics between the placebo- and RES-treated groups at baseline.

2.3. Hemorheological Parameters. In this hemorheological substudy, blood samples were taken on the day of randomization and after 3 months from the antecubital vein after a 12-hour fasting. Blood samples for hemorheological measurements were collected into 2 × 6 ml ethylenediaminetetraacetic acid- (EDTA-) coated Vacutainer tubes with a 21-gauge butterfly infusion set. Hemorheological measurements were carried out within 2 hours after blood sampling [25].

The following hemorheological parameters were determined: hematocrit, plasma and whole blood viscosity, and red blood cell deformability and aggregation.

2.3.1. Hematocrit. Hematocrit (Hct) was measured by Haemofuge microhematocrit centrifuge (Heraeus Instr.; Germany). Measurements were performed at room temperature (22 ± 1°C) [26].

2.3.2. Plasma and Whole Blood Viscosity. Plasma viscosity (PV) and whole blood viscosity (WBV) values were determined by a Hevimet 40 capillary viscometer (Hemorex Ltd., Hungary). Plasma was collected after blood sample centrifugation for 10 minutes at 1500 g. Apparent WBV values interpolated to 90 s⁻¹ shear rate were reported. Measurements were performed at 37°C [26].

2.3.3. Red Blood Cell Aggregation. Red blood cell aggregation measurements were carried out with a LORCA aggregometer (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer; R&R Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) based on syllectometry. 1 ml of oxygenated blood is injected into the gap between a static bob and a rotating cylinder that creates a simple shear flow. Erythrocytes are first disaggregated at high shear rate (500 s⁻¹) then the shearing is stopped. The intensity of backscattered laser light is plotted against time on a syllectogram. The aggregation behavior of blood sample is characterized by the aggregation index (AI) calculated from the first 10 seconds of the syllectogram after the shape recovery period and by the time that elapses until intensity is reduced to half of the peak amplitude ($t_{1/2}$). The smallest shear rate required for complete disaggregation (γ : gamma (1/s)) was also determined [27].

RBC aggregation was measured also by Myrenne aggregometer (MA-1 Aggregometer, Myrenne Ltd., Germany), applying the light transmission method of Schmid-Schönbein et al. This method calculates the aggregation index according to the change in intensity of transmitted infrared light during aggregation either at zero shear (M_0) or low shear (M_1 at 3 s⁻¹) after disaggregation [28].

2.3.4. Red Blood Cell Deformability. For the deformability measurement with LORCA ektacytometer, 25 μl blood was suspended in high viscosity (32.6 mPas) polyvinylpyrrolidone solution. RBCs were sheared by shear stress from 0.3 Pa to 30 Pa, and their deformation was visualized by laser diffraction. The iso-intensivity points of the diffraction pattern draw an ellipse with a longer A and a shorter B diameter. Deformation is characterized by the elongation index calculated by $(A - B)/(A + B)$. Measurements were performed at 37°C. The deformability results were also analyzed by means of the Lineweaver-Burke nonlinear equation, with calculation of the maximal elongation index (EI_{max}) at theoretical infinite shear and the shear stress value required for half of this maximal elongation ($SS_{1/2}$) [29]. However, since goodness-of-fit results proved to be below the acceptable level in several cases and rejecting such cases would have biased results, we only used the raw elongation index (EI) parameters rather than EI_{max} and $SS_{1/2}$ in the final analysis.

2.4. Six-Minute Walk Test. The six-minute walk test (6MWT) is a submaximal exercise test that measures the walking distance for 6 minutes. The test was performed on a 30 m long section of the corridor in our department according to the guideline of American Thoracic Society. The patients were in rest comfortably for 10 minutes prior to the test. The supervisor was a study nurse, who was blinded to the protocol. After 6 minutes or if the patient could not walk any further, the test was stopped and the distance and the reason for stopping (dyspnea, fatigue, chest pain, etc.) were recorded [30].

2.5. Statistical Analysis. SPSS statistical software, version 25, was used for statistical analysis. After using the Kolmogorov-Smirnov test to check the normality of the data distribution, differences between baseline and 3-month values were analyzed

TABLE 1: Baseline characteristics of the study population according to the treatment arms.

	Resveratrol (<i>n</i> = 30)	Placebo (<i>n</i> = 30)
Age (year)	65.8 ± 1.9	67.5 ± 2.1
Male	22 (73%)	21 (70%)
Ejection fraction (%)	30.06 ± 1.04	31.70 ± 1.27
NT-proBNP (pg/ml)	2998 ± 507	3139 ± 446
Serum creatinine (μmol/l)	99.77 ± 4.42	104.47 ± 4.82
Sys. BP (mmHg)	132.47 ± 3.4	128.77 ± 3.8
Dias. BP (mmHg)	79.1 ± 2.33	80.13 ± 2.66
Heart rate (beat/min)	72.2 ± 2.75	76.93 ± 2.5
<i>Etiological factors</i>		
Ischemic heart disease	17 (56.7%)	17 (56.7%)
Nonischemic (alcohol, chemotherapy, and myocarditis)	13 (43.3%)	13 (43.3%)
<i>Risk factors, comorbidities</i>		
Hypertension	22 (73%)	23 (76%)
Diabetes	13 (43%)	14 (46%)
Smoking	11 (36%)	8 (27%)
Pulmonary diseases (asthma, COPD)	7 (23%)	8 (27%)
BMI (kg/m ²)	29.3 ± 0.9	30.4 ± 1.3
Target heart rate (>70/min)	23 (76.7%)	20 (66.7%)
Atrial fibrillation	7 (23%)	10 (33.3%)
<i>Concomitant treatment</i>		
ACE inhibitor/ARB	28 (93%)	29 (97%)
Beta-blocker	29 (97%)	28 (93%)
MRA	23 (76.7%)	21 (70%)
Ivabradine	6 (20%)	6 (20%)
<i>Diuretics</i>		
Loop diuretics (furosemide, etacrynic acid)	27 (90%)	28 (93%)
Thiazide or thiazide-like diuretics (hypothiazide, indapamide, etc.)	8 (27%)	9 (30%)
<i>Device therapy</i>		
CRT-P/D	9 (30%)	7 (23.2%)
ICD	4 (13%)	3 (10%)

Baseline characteristics of the study population according to the treatment arms. Values are expressed as mean ± SEM. There were no significant differences in characteristics between RES- (resveratrol-) and placebo-treated groups at baseline. ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB: angiotensin receptor blocker; BMI: body mass index; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CRT-P/D: cardiac resynchronization therapy-pacemaker/defibrillator; Dias. BP: diastolic blood pressure; ICD: implantable cardioverter-defibrillator; MRA: mineralocorticoid receptor antagonist; NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; Sys. BP: systolic blood pressure.

by paired two-sample Student's *t*-test. Differences between the groups were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) test. Data are expressed as mean ± SEM (standard error of mean). Significance level was defined as $p < 0.05$. The homogeneity of the groups was tested by Levene's *F*-test. The impact of parameters on 6MWT results was analyzed by the Pearson correlation analysis.

3. Results

3.1. Hemorheological Parameters. The apparent WBV was increased ($p < 0.05$) in heart failure patients, but Hct and

PV did not show any difference in either resveratrol or placebo group compared to the control group at baseline. According to our results, resveratrol had no effect on Hct, PV, or WBV and no difference was observed between the two groups (RES and placebo) either at baseline or after the 3-month follow-up period (Table 2).

The AI and the threshold shear rate (γ) were significantly higher, and aggregation half time ($t_{1/2}$) was significantly lower in both the resveratrol and placebo groups compared to the control group at baseline ($p < 0.05$). The M_1 measured by Myrenne ($p < 0.05$), the LORCA AI ($p < 0.05$), and LORCA γ ($p < 0.05$) decreased significantly after RES treatment.

TABLE 2: Effect of resveratrol on hemorheological parameters.

	Control N = 20	Baseline	Placebo N = 30	3 rd month	
		Resveratrol N = 30		Resveratrol N = 30	Placebo N = 30
Hematocrit (%)	43.35 ± 0.63	45.03 ± 0.98	44.93 ± 0.98	44.76 ± 0.93	44.10 ± 1.02
WBV (mPas)	4.04 ± 0.07	4.59 ± 0.13 [#]	4.55 ± 0.14 [#]	4.45 ± 0.13	4.42 ± 0.13
PV (mPas)	1.28 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.31 ± 0.02	1.32 ± 0.02	1.32 ± 0.02
<i>RBC aggregation (Myrenne)</i>					
M	5.91 ± 0.25	6.02 ± 0.36	6.38 ± 0.28	5.90 ± 0.31	6.36 ± 0.28
M ₁	13.77 ± 0.78	13.96 ± 0.42	14.14 ± 0.47	13.46 ± 0.40 *	13.84 ± 0.51
<i>RBC aggregation (LORCA)</i>					
AI	69.37 ± 1.1	73.36 ± 1.02 [#]	72.08 ± 1.04 [#]	70.55 ± 0.99 *	70.15 ± 1.14
t _{1/2} (s)	1.57 ± 0.11	1.23 ± 0.08 [#]	1.34 ± 0.09 [#]	1.45 ± 0.08 *	1.51 ± 0.11
γ (1/s)	112.75 ± 4.43	161.92 ± 11.02 [#]	160.39 ± 12.54 [#]	133.70 ± 7.25 *	138.60 ± 9.12

Values are expressed as mean ± SEM. [#]Significant difference in the resveratrol or placebo groups compared to the control group at baseline; *significant difference in 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values of the resveratrol group ($p < 0.05$). Baseline: measured values at randomization in the resveratrol group or in the placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months; AI: aggregation index; t_{1/2} (s): aggregation half time; M and M₁ values: aggregation indices at different rotation speeds of the aggregometer; PV: plasma viscosity; RBC: red blood cell; WBV: whole blood viscosity; γ (1/s): threshold shear rate.

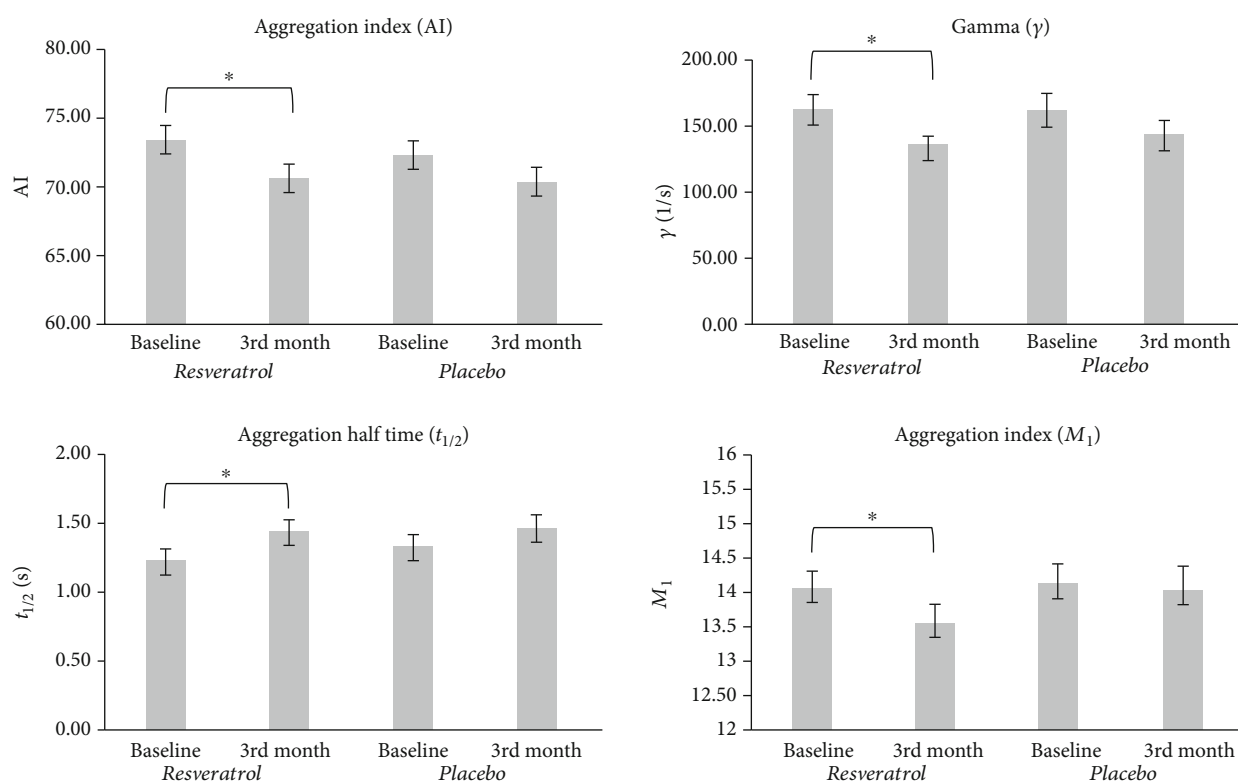


FIGURE 2: Effect of resveratrol on red blood cell aggregation. Values are expressed as mean ± SEM. Star (*) = significant difference in 3rd month values of the resveratrol group compared to the baseline values of the resveratrol group ($p < 0.05$). Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months; M₁ value: aggregation index at 3 s⁻¹ rotation speed of the Myrenne aggregometer; AI: aggregation index measured by LORCA aggregometer; t_{1/2} (s): aggregation half time; γ (1/s): threshold shear rate.

TABLE 3: Effect of resveratrol on red blood cell deformability.

	Baseline		3rd month	
	Resveratrol (EI)	Placebo (EI)	Resveratrol (EI)	Placebo (EI)
Shear stress				
30 (Pa)	0.619 ± 0.003	0.623 ± 0.001	0.621 ± 0.002	0.623 ± 0.001
3 (Pa)	0.415 ± 0.004	0.420 ± 0.003	0.414 ± 0.004	0.422 ± 0.003
0.3 (Pa)	0.008 ± 0.009	0.009 ± 0.006	0.005 ± 0.007	0.009 ± 0.006

Values are expressed as mean ± SEM. There was no difference in the EI values at any shear stresses between the placebo, resveratrol baseline, and 3rd month groups. Baseline: measured values at randomization in the resveratrol or placebo group; 3rd month: patients treated with resveratrol or placebo for 3 months. EI: elongation index; Pa: pascal.

Furthermore, $t_{1/2}$ measured by LORCA also demonstrated a significant ($p < 0.05$) alteration after 3 months compared to baseline (Table 2, Figure 2).

The deformability of RBCs at any measured shear stresses did not show significant changes in either group after 3 months compared to baseline (Table 3), though an increasing tendency of EI at high shear stress could be seen in the resveratrol group.

3.2. Six-Minute Walk Test. The 6-minute walk distance improved significantly (275 ± 19.3 m vs. 298 ± 21.6 m, $p < 0.05$) after RES treatment compared to baseline but did not change in the placebo group (NS).

3.3. Relationship between 6-Minute Walk Distance and Hemorheological Variables. Hematocrit ($r = 0.343$, $p < 0.05$) and whole blood viscosity ($r = 0.308$, $p < 0.05$) had a moderate positive correlation with the 6MWT (correlation indices of the baseline pooled group). In the resveratrol group, significant correlation could be revealed between the 6-minute walk distance and the erythrocyte aggregation after 3 months: lower M_1 aggregation index ($r = -0.269$, $p < 0.05$) and lower γ (-0.417 , $p < 0.05$) were associated with longer walk distance. In addition, in this subgroup, significant positive correlation was found between 6MWT and EI at high shear stresses (EI30: $r = 0.480$, $p < 0.005$).

4. Discussion

The altered hemorheological factors in heart failure may play an important role in the complex impairment of microcirculation and the progression of heart failure. In previous studies, hemorheological parameters (WBV, plasma fibrinogen level, and RBC aggregation and deformability) were found significantly worse in heart failure patients than in healthy people [6]. Reduced peripheral blood flow, oxygen transport (hypoxemia), and increased oxidative stress in heart failure are described to cause RBC disorders [5, 6, 15]. Damage to red blood cells by ROS results in abnormalities in the function, morphology, and metabolism of erythrocyte including RBC aggregation and deformability [15, 31]. Cytoskeletal and membrane proteins and lipids are oxidized by ROS, which possibly increases the tendency of “damaged” erythrocytes to adhere with other erythrocytes thereby increasing RBC aggregation [32]. Our results demonstrated increased erythrocyte aggregation in heart failure patients compared

to age-matched patients with moderate cardiovascular risk profile without heart failure (Table 2). Moreover, hypoxemia-induced rise in hematocrit (increased erythrocyte production) and elevated blood viscosity were observed in heart failure [6, 26], while in advanced stages of heart failure hematocrit level often decreases due to increased plasma volume (hemodilution), iron deficiency, and/or bone marrow depression caused by excessive cytokine and ROS production [33, 34].

According to literature, RES may have a protective role against the development of cardiovascular diseases. Primarily, RES is thought to be responsible for the cardioprotective effect of red wine (French paradox). The bioactive polyphenol resveratrol possesses antioxidant properties, reduces oxidative stress in animal models, and may contribute to the preservation of cardiac structure and function in animals [17–19]. Animal studies showed that RES can stabilize erythrocytes by the reduction of erythrocyte osmotic fragility [35]. RES was also described to maintain vascular endothelial function and to dilate blood vessels [19]. A previous human study of our working group assessing endothelial dysfunction detected significant improvement in vasorelaxation in RES-treated patients [8]. Other authors reported that resveratrol can change the properties of plasma proteins and preserve the structure of fibrinogen from conformational alterations [36–38], which may influence RBC aggregation as well.

The effects of resveratrol on hemorheological parameters have already been evaluated in some animal and human trials; however, they have not been studied in heart failure [8, 24].

The main findings of our present trial after a 3-month follow-up period are as follows.

(1) RBC aggregation was decreased significantly in patients treated with resveratrol; (2) macrorheological parameters did not change significantly; (3) the 6-minute walk distance was increased significantly in resveratrol-treated patients; (4) relationship was detected between the 6-minute walk distance and some hemorheological variables (erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability, hematocrit, and whole blood viscosity).

We found no significant change in *Hct*, *WBV*, and *PV* values after the 3-month RES treatment. Similar results were seen in a previous study of our workgroup [8].

On the other hand, we could demonstrate a significant decrease of *RBC aggregation* in our patients after RES treatment via several parameters. Based on our results—which

confirm a previous study [6]—RBC aggregation is deteriorated significantly in patients with heart failure, while in this study RES treatment partially reversed these changes of RBC aggregation. Though some difference could be seen between the results of LORCA and Myrenne, these are probably the consequences of the different principles of operation and precision of the instruments [25].

The decrease in aggregation may be a consequence of the antioxidant properties of RES and the modifications of plasma proteins as well. According to one of the accepted theories, RBC aggregation is due to the bridging between adjacent cells by specific plasma proteins (e.g., fibrinogen, large molecular weight globulins) and influenced by the concentration and specific binding to the erythrocyte membrane of fibrinogen. It is known that polyphenols are bound to plasma proteins due to their poor water solubility. RES may change the properties of plasma proteins and RBC surface molecules, thus reducing the ability to form cross-links between cellular components and decreasing erythrocyte aggregation [23, 37, 38]. The reduction of RBC aggregation may have a positive effect on the flow properties of coronary microcirculation, which can be especially important in heart failure.

In this trial, we could not demonstrate the change of RBC deformability after RES treatment by any ektacytometry parameters.

6MWT is a routine diagnostic procedure to quantify the exercise capacity of heart failure patients [39]. In this double-blind, randomized placebo-controlled study, resveratrol-treated patients had longer walk distance after the 3-month follow-up period, which is concordant with the results of a previous study [40]. Furthermore, a positive correlation was found between the functional capacity and the favorable hemorheological alterations as well. The improving hemorheological parameters may partly contribute to the longer walk distance in patients treated with resveratrol.

5. Conclusion

In our in vivo human study, we confirmed the beneficial effect of RES on erythrocyte aggregation in heart failure. The decrease of RBC aggregation by RES may positively influence the microcirculation, tissue perfusion, and oxygen supply, which may contribute to the improvement of the coronary and peripheral blood flow and probably increase the exercise capacity of patients with heart failure with reduced ejection fraction.

5.1. Limitations of the Study. This study has potential limitations. Although the study was double-blind, randomized, (1) the number of patients enrolled was low and the (2) follow-up period was relatively short. The rheological changes observed were significant (3) but the degree of change was modest.

Several positive effects of resveratrol by different mechanisms are proven. (4) It is not known exactly whether the positive effect of resveratrol on cardiac function and exercise capacity is due to these rheological changes or other mecha-

nisms are also responsible for it. Further studies are required on heart failure patients to properly understand the exact biochemical and cellular mechanism of resveratrol.

Data Availability

The individual patient data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

All authors have approved the manuscript for submission, and we have no conflicts of interest to disclose.

Authors' Contributions

All authors made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of the data. All authors also assisted in drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

Acknowledgments

This study was supported by an Economic Development and Innovation Operative Programme Grant (GINOP 2.3.2-15-2016-00048) and by an Institutional Developments for Enhancing Intelligent Specialization Grant (EFOP-3.6.2-16-2017-0006) and Establishing Thematic Scientific and Cooperation Network for Clinical Research (EFOP-3.6.2-16-2017-0009) from the Hungarian National Research, Development and Innovation Office.

References

- [1] A. L. Bui, T. B. Horwich, and G. C. Fonarow, "Epidemiology and risk profile of heart failure," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 8, no. 1, pp. 30–41, 2011.
- [2] P. Ponikowski, A. A. Voors, S. D. Anker et al., "2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure," *European Heart Journal*, vol. 37, no. 27, pp. 2129–2200, 2016.
- [3] E. Tanai and S. Frantz, "Pathophysiology of heart failure," *Comprehensive Physiology*, vol. 6, no. 1, pp. 187–214, 2015.
- [4] H. H. Lipowsky, "Microvascular rheology and hemodynamics," *Microcirculation*, vol. 12, no. 1, pp. 5–15, 2005.
- [5] K. Matschke and F. Jung, "Regulation of the myocardial microcirculation," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 39, no. 1–4, pp. 265–279, 2008.
- [6] I. Tikhomirova, E. Petrochenko, A. Muravyov et al., "Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 65, no. 4, pp. 383–391, 2017.
- [7] K. Biro, B. Sandor, D. Kovacs et al., "Lower limb ischemia and microrheological alterations in patients with diabetic retinopathy," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 69, no. 1–2, pp. 23–35, 2018.
- [8] K. Magyar, R. Halmosi, A. Palfi et al., "Cardioprotection by resveratrol: a human clinical trial in patients with stable coronary artery disease," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 50, no. 3, pp. 179–187, 2012.

- [9] A. S. Popel and P. C. Johnson, "Microcirculation and hemorheology," *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 37, no. 1, pp. 43–69, 2005.
- [10] J. A. Dormandy and G. Nash, "Importance of red cell aggregation in venous pathology," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 7, pp. 119–122, 2016.
- [11] T. Urdulashvili, N. Momtselidze, M. Mantskava, N. Narsia, and G. Mchedlishvili, "Hemorheological, microvascular and hemodynamic disorders during coronary heart disease," *Georgian Medical News*, vol. 136, pp. 55–57, 2016.
- [12] P. Aukrust, T. Ueland, E. Lien et al., "Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy," *The American Journal of Cardiology*, vol. 83, no. 3, pp. 376–382, 1999.
- [13] L. Gullestad, T. Ueland, L. E. Vinge, A. Finsen, A. Yndestad, and P. Aukrust, "Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers," *Cardiology*, vol. 122, no. 1, pp. 23–35, 2012.
- [14] H. Tsutsui, S. Kinugawa, and S. Matsushima, "Oxidative stress and heart failure," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 301, pp. H2181–H2190, 2011.
- [15] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Biomarkers of oxidative stress in red blood cells," *Biomedical Papers*, vol. 155, no. 2, pp. 131–136, 2011.
- [16] G. B. Nash, R. B. Wenby, S. O. Sowemimo-Coker, and H. J. Meiselman, "Influence of cellular properties on red cell aggregation," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 7, pp. 93–108, 2016.
- [17] S. Renaud and M. De Lorgeril, "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease," *The Lancet*, vol. 339, no. 8808, pp. 1523–1526, 1992.
- [18] A. Csiszar, "Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1215, no. 1, pp. 117–122, 2011.
- [19] M. M. Sung and J. R. B. Dyck, "Therapeutic potential of resveratrol in heart failure," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1348, no. 1, pp. 32–45, 2015.
- [20] B. N. M. Zordoky, I. M. Robertson, and J. R. B. Dyck, "Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1852, no. 6, pp. 1155–1177, 2015.
- [21] M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines et al., "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α ," *Cell*, vol. 127, pp. 1109–1122, 2006, 6.
- [22] X. S. Gu, Z. B. Wang, Z. Ye et al., "Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure," *Genetics and Molecular Research*, vol. 13, no. 1, pp. 323–335, 2014.
- [23] A. Toth, B. Sandor, J. Papp et al., "Moderate red wine consumption improves hemorheological parameters in healthy volunteers," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 56, no. 1, pp. 13–23, 2014.
- [24] Y. Wang, H. Cui, F. Niu et al., "Effect of resveratrol on blood rheological properties in LPS-challenged rats," *Frontiers in Physiology*, vol. 9, p. 1202, 2018.
- [25] O. K. Baskurt, M. Boynard, G. C. Cokelet et al., "New guidelines for hemorheological laboratory techniques," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 42, no. 2, pp. 75–97, 2009.
- [26] K. Toth, G. Kesmarky, and T. Alexy, "Clinical significance of hemorheological alterations," in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, O. K. Baskurt, M. R. Hardeman, M. W. Rampling, and H. J. Meiselman, Eds., pp. 392–432, IOS Press, 2007.
- [27] M. R. Hardeman, J. G. Dobbe, and C. Ince, "The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 25, pp. 1–11, 2011.
- [28] H. J. Klose, E. Volger, H. Brechtelsbauer, L. Heinich, and H. Schmid-Schonbein, "Microrheology and light transmission of blood," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 333, no. 2, pp. 126–139, 1972.
- [29] M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and N. H. Schut, "Laser-assisted optical rotational cell analyser (L.O.R.C.A.); II. red blood cell deformability: elongation index versus cell transit time," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 14, no. 4, pp. 619–630, 1994.
- [30] R. O. Crapo, R. Casaburi, A. L. Coates et al., "ATS statement: guidelines for the six-minute walk test," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 166, no. 1, pp. 111–117, 2002.
- [31] M. Becatti, R. Marcucci, A. M. Gori et al., "Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 14, no. 11, pp. 2287–2297, 2016.
- [32] P. Gyawali and R. S. Richards, "Association of altered hemorheology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome," *Redox Report*, vol. 20, no. 3, pp. 139–144, 2014.
- [33] A.-S. Androne, S. D. Katz, L. Lund et al., "Hemodilution is common in patients with advanced heart failure," *Circulation*, vol. 107, no. 2, pp. 226–229, 2003.
- [34] P. O. Iversen, P. R. Woldbaek, T. Tønnessen, and G. Christensen, "Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure," *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 282, no. 1, pp. R166–R172, 2002.
- [35] Y. Meng, M. Zhang, J. Xu, X.-M. Liu, and Q.-Y. Ma, "Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 11, no. 3, pp. 433–435, 2005.
- [36] C. Bonechi, S. Lamponi, A. Donati et al., "Effect of resveratrol on platelet aggregation by fibrinogen protection," *Biophysical Chemistry*, vol. 222, pp. 41–48, 2017.
- [37] D. Lominadze and W. L. Dean, "Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation," *FEBS Letters*, vol. 517, no. 1–3, pp. 41–44, 2002.
- [38] X. Weng, G. Cloutier, R. Beaulieu, and G. O. Roederer, "Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation," *The American Journal of Physiology*, vol. 271, 6 Part 2, pp. H2346–H2352, 1996.
- [39] P. Raj, X. Lieben Louis, S. J. Thandapilly, A. Movahed, S. Zieroth, and T. Netticadan, "Potential of resveratrol in the treatment of heart failure," *Life Sciences*, vol. 95, no. 2, pp. 63–71, 2014.
- [40] L. Gliemann, J. F. Schmidt, J. Olesen et al., "Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men," *The Journal of Physiology*, vol. 591, no. 20, pp. 5047–5059, 2013.