

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



Ph.D. tézisfüzet

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. Rövidítések jegyzéke

A	késődiasztolés kamrai telődési sebesség
ACE	angiotenzin-konvertáló enzim
AI	aggregációs index
ARB	angiotenzin receptor-blokkoló
ARNI	angiotenzin receptor/neprilizin inhibitor
ATP	adenozin-trifoszfát
CRP	C-reaktív protein
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
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
HFrEF	csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség
Htc	hematokrit
ICD	implantálható kardioverter defibrillátor
IL	interleukin
IVC	inspiratórikus vitálkapacitás
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
LORCA	lézer asszisztált optikai rotációs sejt analizátor
M	Myrenne aggregációs index
MRA	mineralokortikoid-receptor antagonist
mRNS	hírvivő ("messenger") ribonukleinsav
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	nitrogen monoxid
NT-proBNP	B-típusú nátriuretikus peptid N-terminális prohormonja
NYHA	szívelégtelenség funkcionális beosztása (I-IV)
Pa	pascal
PV	plazma viszkozitás
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RES	rezveratrol
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
TAPSE	trikuspidális annulusz szisztolé alatti kitérése
t _{1/2}	aggregációs féléletidő
VV	teljes vér viszkozitás
vvt	vörösvértest
6MWT	6 perces járásteszt
γ (gamma)	küszöb nyírasi sebességgrádiens

II. Bevezetés

1. Szívelégtelenség

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. A szívelégtelenség előfordulása folyamatosan emelkedik világszerte. A fejlett országokban a populáció körülbelül 2%-a szenved szívelégtelenségben. A szívelégtelenség leggyakoribb etiológiai tényezőinek mind a férfiak, mind a nők körében a hipertónia és a koszorúér-betegség tekinthető

A szívelégtelenség az EF alapján három nagy csoportra osztható: csökkent szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFrEF, EF<40%), mérsékelt csökkenő szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFmrEF, EF: 40-49%) és megtartott szisztolés bal kamra funkcióval járó szívelégtelenség (HFpEF, EF≥50%) A nem gyógyszeres, a rendelkezésre álló korszerű eszközös és a modern, evidenciákon alapuló gyógyszeres kezelés mellett az elmúlt évtizedekben a szívelégtelenség korábban rendkívül kedvezőtlen mortalitási mutatói sokat javultak ugyan, de az egészségügyi költségvetésre rótt teher továbbra is jelentős. A krónikus szívelégtelen betegek gyógyszeres kezelésének alapját azok a gyógyszerek alkotják, amelyek igazoltan csökkentik a betegség mortalitását, javítják az életminőséget, csökkentik a hospitalizációs események számát. Patofiziológiai megfontolások és klinikai vizsgálatok eredményei alapján számos bizonyíték áll rendelkezésre a neurohormonális gátló ACE-inhibitorok/ARB-k, MRA-k, ARNI és a béta-receptor blokkolók alkalmazására a tünetek mérséklése és a prognózis javítása tekintetében.

Habár ezen támadáspontok mellett javult a betegek túlélése HFrEF-ben, a betegség hosszú távú kimenetele továbbra is rossznak tekinthető. A fentiek miatt mindenképpen szükséges új terápiás lehetőségek feltárása szívelégtelenségben. Az újonnan alkalmazott hatóanyagok mind az állatkísérletes, mind a humán klinikai vizsgálatokban többek között olyan támadáspontokon keresztül fejtik ki hatásukat, mint a miokardiális kontraktilitás, a citokinek, a miokardiális metabolizmus vagy éppen az oxidatív stressz, melyek összességében ígéretes, alternatív megközelítései lehetnek a szívelégtelenség jövőbeni terápiájának.

2. Rezveratrol és a szívelégtelenség

A vörösbor nagy mennyiségben tartalmaz polifenol vegyületeket (rezveratrol, katechin, kvercetin, stb.), azonban a kardioprotektív hatásért elsősorban vörösbor rezveratrol (RES) tartalmát teszik felelőssé (francia paradoxon). A RES (3,5,4 -trihydroxystilbene) egy non-flavonoid polifenol, mely környezeti stressz hatására termelődik növényekben (pl. szőlő, mogyoró, áfonya). A RES kardioprotektív hatásának hátterében számos mechanizmus állhat, melyek közül mindenképpen fontos kiemelni az oxidatív stressz mérséklését, a gyulladást és hipertrófiát indukáló jelátviteli szignálok blokkolását, valamint a kalcium anyagcsere javítását. Mivel ezen patológiás folyamatok jól ismertek a szívelégtelenség patogenezisében, ezért feltételezzük a rezveratrol kedvező hatását a fenti folyamatok gátlása révén szívelégtelenségben. Az endoteliális és vaszkuláris funkciók szintén javulást mutatnak RES kezelés mellett, melynek hátterében a koleszterin és triglicerid szintek csökkenése, az endoteliális NO szintézis aktivációjának fokozódása és az emelkedő NO (értágító hatás) szintéppé szerepet játszik, mint a RES jelentős gyulladáscsökkentő hatása.

Munkacsoportunk korábban posztinfarktusos patkánymodellben igazolta a RES bevitelnek a szívelégtelenség kialakulásával szembeni protektív hatását. A RES nemcsak javította a bal kamra funkciót, hanem csökkentette a miokardiális fibrózist, az oxidatív stresszt és egyes proinflammatorikus proteinek jelenlétét. Más kutatócsoportok hasonló eredményeket írtak le különböző állatkísérletes modellekben, azonban humán klinikai vizsgálattal a RES célzottan szívelégtelenségre kifejtett hatását még nem igazolták.

3. Hemoreológiai változások szívelégtelenségben

A hemoreológia a vér áramlásánál foglalkozó tudományág. Számos multicentrikus tanulmány igazolta, hogy a hemoreológiai tényezők romlása önálló rizikófaktorként kezelendő a kardiovaszkuláris kórképekben. 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 perifériás erek és a koronáriák komplex károsodása szívelégtelenségben többek között a beszűkült keringésnek, a sérült szabályozó mechanizmusoknak és a hemoreológiai faktorok kóros változásainak tudható be. Ezen folyamatok révén csökken az oxigén utilizáció, mely hozzájárul a szívelégtelenség tüneteinek fokozódásához és a betegség progressiójához. A vvt aggregáció és deformabilitás fontos faktora a kapilláris szintű

keringésnek, beleértve természetesen a koronáriák mikrocirkulációs keringését is. Számos más klinikai állapothoz hasonlóan (pl. koszorúér betegség, vénás trombembólia), szívelégtelenség esetén is fokozódik a vvt aggregáció, mely negatívan befolyásolja a véráramlási tulajdonságait. A fentiek alapján a vvt aggregáció csökkentése a kardiovaszkuláris betegségek szempontjából pozitív hatással bírhat.

III. 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 gyulladáshoz vezető 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 fentiek mellett összefüggést kerestünk a vizsgált paraméterek és a betegek terhelhetősége között.

IV. Eszközök és Módszerek

1. A tanulmány felépítése, a vizsgált betegpopuláció főbb jellemzői, beválasztási és kizárási kritériumok

A disszertáció alapját egy egycentrumos, kettősvak, randomizált, placebo-kontrollált, saját tervezésű humán klinikai vizsgálat képezte. 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 ($EF < 40\%$) 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 fő kizárási kritériumok közé tartozott a randomizáció előtt 30 napon belül bekövetkezett kardiovaszkuláris vagy cerebrovaszkuláris esemény, valamint ugyancsak 30 napon belül elvégzett jelentős sebészeti/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.

A vizsgálat során elsőként randomizációs, majd 3 hónap múlva záróvizit történt, emellett egy közbülső, 1. hónapos vizitet is beiktattunk. Fontos kiemelni, hogy a résztvevők gyógyszerelésében az utánkövetés alatt nem történt változás, valamint végig stabil klinikai állapotúak voltak (szívelégtelenség miatti hospitalizáció nem volt az utánkövetés során). Epidemiológiai szempontból a RES és a placebo csoport között nem volt szignifikáns különbség. A résztvevők a bevonáskor az Európai Kardiológusok Társasága (ESC) aktuális 2016-os szívelégtelenség kezelési irányelve szerinti optimális gyógyszeres kezelésben részesültek.

A betegek bevonásakor, valamint a 3. hónap végén fizikális vizsgálat, vérnyomás és testsúly meghatározás, EKG, szívultrahang vizsgálat, 6MWT, labordiagnosztika 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.

Hemoreológiai szempontból a következő paraméterek kerültek meghatározásra a randomizáció napján, majd a 3. hónap végén: Htc, a fibrinogén, PV, VV, vvt aggregáció és vvt deformabilitás. A hemoreológiai mérések kiindulási értékeit (mind RES, mind placebo csoportban) egy életkorban megegyező (életkor: $67,15 \pm 1,01$ 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.

2. 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 féle 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 féle 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.

3. Vizsgálati módszerek

3.1. Vérnyomásmérés, testsúly meghatározás

A betegek testsúly és vérnyomás paraméterei a randomizáció, az 1. hónapos és a 3. hónapos vizitek során kerültek meghatározásra.

3.2. 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}), szérumban albumin, vese- és májfunkció, szérumban 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.

3.3. Szívvultrahang 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, pulzatilis 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 méréseket ugyanazon 2 expert vizsgáló végezte, akik a kezelés tekintetében minden esetben vakok voltak, tehát nem tudták, hogy a beteg a RES vagy a placebo ágon van.

3.4. 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.

3.5. Légzésfunkciós vizsgálat

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. Méréseink során meghatároztuk a forszírozott vitálkapacitást (forced vital capacity, FVC), a forszírozott

kilégzési volumeneket és azokból származtatott paramétereket (FEV_1 ; FEV_1/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).

3.6. Életminőség kérdőív

A vizsgálatban résztvevő betegek életminőségének felméréséhez az 5 pontos “Euro Qol five dimension” (EQ-5D) kérdőívet használtuk. 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.

3.7. mRNS izolálás, mRNS szekvencia katalogizálása, RNS szekvenálás és az eredmények elemzése

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

3.8. Hemoreológiai mérések

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.

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

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 VV értéket 90 s^{-1} nyírófeszültségen adtuk meg. A mérések 37°C -os hőmérsékleten történtek.

A vvt aggregáció mérését LORCA aggregométer (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer; R&R Mechatronics, Hoorn, Hollandia) segítségével végeztük. A minta aggregációjának viselkedését az aggregációs index-el (AI) jellemezhetjük, mely az idő és a vvt aggregátumokról visszaverődő lézerfény 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 eléréshez szükséges idő. A küszöb nyírási sebességgrádiens (γ : gamma (s^{-1})) szintén megmértük, mely a vvt-k diszaggregációjához szükséges legkisebb nyíróerő. A vvt aggregáció másik módszerrel történő meghatározásához Myrenne aggregométert (MA-1 Aggregometer, Myrenne Ltd., Németország) használtunk, mely a Schmid-Schönbein-féle fény transzmissziós elv alapján működik. Az adott nyíróerőn meglévő aggregáció mértékét az aggregációs index (M, M1) jelzi, melyet a műszer a fényintenzitás görbe első 10 másodpercének görbe alatti területéből számít ki.

A deformabilitás meghatározásához használt ektacitometria (LORCA lézer diffrakciós ektacitométer) során $25\ \mu\text{l}$ -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.

V. 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 kardiális Troponin T, a vas profil paramétereire, a Hgb_{A1c} és a kvantitatív és kvalitatív vérkép tekintetében egyik ágon sem a kiindulási paraméterekkel összevetve. 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.

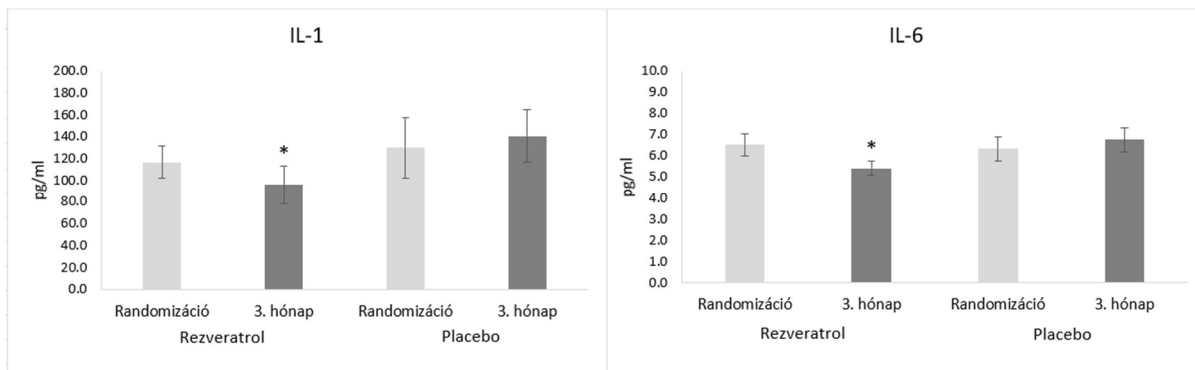
2. A gyulladássos paraméterek változása rezveratrol kezelés mellett

Az akut fázis fehérvérjék (CRP, ferritin) szintje és a fehérvérsejtszám nem változott szignifikánsan egyik ágon sem a 3 hónapos kezelés végén. 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 (1. ábra).

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.



1. ábra. A rezveratrol hatása a gyulladási 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.

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

A BMI változása nem változott szignifikánsan sem a RES ($29,31\pm 0,99$ kg/m² versus $29,06\pm 1,01$ kg/m², NS), sem a placebo ($31,04\pm 1,46$ kg/m² versus $31,34\pm 1,39$ kg/m², NS) ágon a 3 hónapos kezelés végén a kiindulási értékekkel összehasonlítva. Nem találtunk továbbá szignifikáns változásokat az EKG paraméterek, a vérnyomás és a szívfrekvencia értékek esetében sem az 1 hónapos, illetve a 3 hónapos mérések esetében.

5. A rezveratrol hatása az echokardiográfiai paraméterekre

A vizsgálat kezdetén az echokardiográfiai 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: $29,19\pm 1,04$ % versus $33,40\pm 1,20$ %, $p<0,01$ és Simpson-formula: $30,06\pm 1,04$ % versus $34,60\pm 1,44$ %, $p<0,01$). A bal kamrai globális longitudinális "strain" (GLS, %) szintén szignifikánsan javult ($-8,40\pm 0,62$ % versus $-9,58\pm 0,73$ %, $p<0,05$) a kezelt ágon a kezelés végére a kiindulási értékekhez viszonyítva. A fentiekkel ellentétben a placebo ágon szignifikáns változás nem

volt kimutatható. A diasztolés funkció tekintetében az E/A ($1,18 \pm 0,15$ versus $1,54 \pm 0,19$, $p < 0,05$) és az E/e' ($15,55 \pm 1,43$ versus $19,94 \pm 1,43$, $p < 0,05$) arányok szignifikáns különbséget mutattak a RES és a placebo csoport között a 3 hónapos kezelést követően.

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.

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, 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.

1. 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 végdiasztolésban; LVIDs: bal kamra belső átmérője végszisztolésban; PW: hátsó fal vastagsága; SV: verővolumen; SW: septum falvastagsága.

8. A rezveratrol hatása a szívelégtelen betegek életminőségére

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 tudtunk 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

Az elemzés során legfontosabb eredménynek az bizonyult, 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). A fentiekkel ellentétben a Komplex II és a Komplex IV működését érdemben nem befolyásolta a RES kezelés.

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.

A vvt aggregáció esetében az AI és a 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 M1 ($13,96 \pm 0,42$ 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 (2. táblázat).

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

2. 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
M_I	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_I 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 M_I 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).

VI. 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). A fenti mechanizmusokból adódóan a RES erős antiinflammatorikus és vérlemezke aggregáció gátló hatással is rendelkezik. 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 háttérében a profibrotikus intracelluláris jelátviteli utak blokkolása, valamint antiinflammatorikus hatás állhatott. Más kutatócsoportok is hasonló eredményeket publikáltak kísérletes szívelégtelen modelleken végzett vizsgálataik eredményeképp.

Jelen egycentrumos, kettősvak, randomizált klinikai vizsgálatunkban a résztvevő tünetes, HFrEF betegpopuláció kiindulási klinikai jellemzői között nem volt statisztikailag jelentős különbség (a randomizációt úgynevezett “adaptive minimization” módszerrel végeztük). 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.

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. Azonban kiemelendő, 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. Vizsgálatunkban a placebo ágon a GLS értéke nem mutatott változást a vizsgálati periódus végén, azonban a RES-el kezelt betegeknél 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, 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 (CCS) betegpopulációban alkalmazott kis dózisu (napi 10 mg) RES kezelés mellett javult a diasztolés bal kamra funkció, míg a szisztolés bal kamra tekintetében nem volt szignifikáns javulás, ellenben egy kedvező tendencia volt megfigyelhető.

Azonban nemcsak a szív pumpafunkciója, hanem a betegek 6MWT-el meghatározott terhelhetősége is szignifikánsan javult 3 hónapos RES kezelést követően. Eredményeink összhangban vannak az irodalomban fellelhető állatkísérletes modelleken végzett preklinikai vizsgálatokkal, 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 (VO₂max). Ezenfelül Glieman és munkatársai azt találták, hogy idősebb férfiaknál a RES terápia mérsékelte a testmozgás pozitív kardiovaszkuláris hatásait és visszafogta az

edzésprogram során tapasztalt $VO_2\text{max}$ növekedést. 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, melyet humán klinikai vizsgálat során is igazoltak. 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.

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. Militaru 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. 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.

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). Gehlback és munkatársai azt találták, hogy a szívtranszplantáción átesett betegeknél nemcsak a ventilációs volumenek, hanem az áramlási sebességek (FEV_1) is jelentős javulást mutattak. 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. A fenti kedvező változások paralelnak tekinthetőek 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. 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. 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 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. Szívelégtelenségben a romló perifériás keringés, a károsodott oxigén transzport (hipoxia) és megnövekedett oxidatív stressz lehet elsősorban felelős a vvt-k rendellenességéért. Az oxidatív stressz a vvt-ben morfológiai, funkcionális és metabolikus abnormalitásokat idéz elő, mely magában foglalja a vvt aggregáció és deformabilitás károsodását is. A ROS hatására a citoskeletális és membrán fehérjék oxidációja, valamint lipidperoxidáció megy végbe, ezen folyamatok pedig kóros mértékű vvt adherenciához és aggregabilitáshoz vezetnek. Jelen vizsgálat során kapott eredményeink igazolták a megnövekedett vvt aggregációt szívelégtelen betegek körében összevetve a hasonló korú, de nem szívelégtelen, közepes kardiovaszkuláris rizikóprofillal rendelkező betegpopulációval. Emellett a hipoxia okozta htc emelkedés (megnövekedett eritrocita termelés) és magasabb vér viszkozitás is leírásra került már szívelégtelenségben, 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 termelés okozta csontvelő depresszió következtében.

Irodalmi adatok alapján a RES-nek szerepe lehet a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának megelőzésében. A vörösbor 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. További állatkísérletes modellekben a RES növelte az vvt-k stabilitását az ozmotikus fragilitás csökkentése révén. A fentiek mellett a RES protektív hatást gyakorolt az endoteliális funkcióra és értágító tulajdonságokkal is rendelkezett. Munkacsoportunk által korábban végzett humán vizsgálatban igazolt endoteliális diszfunkcióval rendelkező betegek körében a RES kezelés javította a vaszkuláris relaxációt. Irodalmi adatok alapján a RES befolyásolja továbbá a vérplazmában lévő proteinek tulajdonságait is, többek között megvédi a fibrinogént a kóros konformációs változásoktól, 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.

Vizsgáltunk 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.

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 – 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.

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. 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. 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.

VII. 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 háttérében 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.

VIII. 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 beteganyagon.
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.

IX. 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.

X. 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 remodelingre, illetve a betegek életminőségére. *Cardiologia Hungarica*. 2011;41(5):354-361.

Kumulatív impakt faktor: 14.032