

A humán pericardialis folyadék biokémiai összetételének és vasomotor hatásának vizsgálata

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

Zoltan Nemeth



Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Kardiovaszkuláris betegségek klinikai és molekuláris szintű új mechanizmusainak,
diagnosztikájának és terápiájának kutatása Program

Programvezető

Szokodi István, M.D., Ph.D., D.Sc.

Témavezető

Prof. Koller Ákos, M.D., Ph.D., D.Sc.

Társtémavezető

Prof. Cziráki Attila, M.D., Ph.D.

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Transzlációs Medicina Intézet, és Szentágothai János Kutatóközpont

2016

Pécs

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

ADMA	asymmetricus dimethyl-arginin
AMI	acut myocardialis infarctusnak
Ang II	angiotenzin II
ASE	Amerikai Szívultrahang Társaság (American Society of Echocardiography)
AVR	aorta billentyű csere
BQ123	ET _A antagonist
CABG	coronaria bypass műtét (Coronary Artery Bypass Graft műtét)
CKD	krónikus vesebetegség
CCS	Kanadai Kardiovaszkuláris Társaság (Canadian Cardiovascular Society)
Dd	bal kamra vég-diasztolés átmérő
DDAH	dimetilarginin dimetilaminohidroláz
Ds	bal kamra vég-szisztolés átmérő
eGFR	becsült Glomerulus Filtrációs Ráta (estimated Glomerular Filtration Rate)
eNOS	endotheliális nitrogen-monoxid szintáz
ET-1	endotelin-1
ET _A	ET-1 receptor
ISZB	koszorúér-betegség/ischemiás szívbetegség
IVS	interventricularis septum vastagság
LA	bal pitvar területe
L-Arg	L-arginin
LVEF	bal kamra ejectió fratio
LVM	bal kamra tömege
miRNS	mikro-RNS
MVR	mitrális billentyű csere
NAD(P)H-oxidáz	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz
NCP	nem-szívbeteg
NE	norepinephrin
NO	nitrogen-monoxid
PF	pericardialis folyadék
PF _{CABG}	CABG betegből származó pericardialis folyadék
PF _{VR}	VR betegből származó pericardialis folyadék
PRMT-1	protein arginin methyl-transferase-1
PRMT1	protein metiltranszferáz 1
PW	bal kamra hátsó fal vastagság
RA	jobb pitvar területe
RAS	renin-angiotensin-rendszer
ROS	reaktív oxigén származékok
RV	jobb karma területe
sCr	serum kreatinin
VR	billentyű műtét (valve replacement)

BEVEZETÉS

A pericardialis folyadék

A pericardialis folyadék (PF) nagyjából 15-50 ml viszkozus, szalmasárga filmréteggént helyezkedik el a pericardium rétegei között¹.

A PF élettani szerepe, miszerint csökkenti a súrlódást a pericardium és a szív felszíne között, így gördülékennyé téve a szív mozgását a pericardium zsákban, hosszú idei elfogadott volt a klinikusok között. Ez az elképzelés azonban megdőlni látszott, amikor a PF elektrolit és sav-bázis összetételét meghatározták². Ezt követően a PF összetételének feltérképezését célzó intenzív kutatás indult el valamint számos szabályozó biomarkert is kimutattak benne³.

Az ADMA, mint signalmolekula szabályozza a nitrogén monoxidot

Az L-Arg/NO-rendszer és az ADMA

Ismert, hogy a metilált L-arginin (L-Arg) származék ADMA csökkenti a nitrogén monoxid (NO) biológiai elérhetőségét⁴.

Az NO az NO-szintáz (NOS) enzimek hatására keletkezik a prekursor aminosavból, az L-Arg-ból⁴. Az NO több funkcióval rendelkezik, többek között szabályozza a vazomotor tónust, és attenuálja a sejtproliferációt és szövet növekedést⁴. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy az ADMA, mint „fals” szubsztrát, kompetitíve gátolja az endotheliális NO-szintáz (eNOS) aktivitását, így az NO termelődését⁴. Valamint, korábbi közleményünkben már beszámoltunk róla, hogy az ADMA a vascularis renin-angiotensin-rendszer (RAS) aktiválásán keresztül a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődését is kiváltja, melyek csökkentik az NO biológiai hatásosságát⁵. Továbbá, az ADMA emelkedett plasmaszintjét is leírták különböző kardiovaszkuláris betegségekben⁶. Ezen eredményeket tovább erősítették olyan funkcionális klinikai tanulmányok, melyek a plasma ADMA szintjét és a szívfunkciók összefüggését vizsgálták⁷.

Az ADMA lehetséges szerepe a cardialis remodelingben

A cardialis remodeling mechanizmusait pathophisiologiai/adaptív (pl. sérülések) folyamatok iniciálják, melyeket mechanikai (falfeszülés) és molekuláris mechanizmusok szabályoznak⁸.

A cardialis hypertrophia a cardialis remodeling egyik típusa, amely során – többek között – a szívizom sejtek méretének növekedése és átrendeződésük a kamra falak vastagodásához vezet⁸. A cardialis hypertrophia folyamatai adaptív vagy maladaptív, fiziológiai (terhelés-indukálta cardialis hypertrophia) vagy patológiás folyamatok (nyomás és/vagy volumen túlterhelés) által kiváltott jelenségek, de myocardialis infarctus is kiválthatja⁹. A mechanikai erők mellett localisan ható faktorok, mint pl. citokinek és növekedési faktorok is részt vesznek a cardialis hypertrophia kialakulásában¹⁰.

A fentiek alapján az ADMA közvetlenül vagy közvetetten szerepet játszhat a cardialis hypertrophia-ban/remodelingben.

Vasoactív anyagok a pericardialis folyadékban

Endotelin-1

Egyre több adat mutatja, hogy a PF számos vasoactív anyagot tartalmaz, mint pl. az endothelinek¹¹, catecholaminok¹², adenin nucleotidok¹³, natriuretikus peptidek¹⁴, angiotensin II¹⁵, és prosztoglandinok¹⁶.

Ismert, hogy az endothelinek, mint az endothelin-1 (ET-1) erős vasoconstrictor peptidek, és fontos szerepet játszanak az értónus szabályozásában (receptorain: ET_A és ET_B), valamint növekedési faktorként működnek számos sejtfeleségben¹⁷. A BQ123 ET_A receptor antagonistát széleskörben használják az ET-1 által kiváltott vasokonstrictio tanulmányozásához¹⁷.

Az ET-1 szerepét igazolták a hipertonia és egyéb érbetegségek kialakulásában¹⁷. Emellett kimutatták, hogy az ET-1 pericardialis szintje emelkedettebb ischemiás szívbetegségben (ISZB), összehasonlítva a nem-ISZB-vel¹⁵. Továbbá, az intrapericardialisan adott ET-1 kamrai arrhythmiát indukál kutyában¹⁸. Ez igazolhatja azon feltételezést, miszerint a PF anyagai elérhetik, sőt hatást gyakorolhatnak a cardialis interstitiumra, tehát a PF paracrin anyagként is viselkedhet.

Összefoglalva, a pericardialis folyadéknak fontos mechanikai szerepe van, azonban további élettani szerepét számos tanulmány mutatja, miszerint szabályozhatja a coronaria keringést és a cardialis remodelinget¹⁹. Szívbetegek pericardialis folyadékában számos vasoactiv anyagot, növekedési faktort, és biomarkert tartalmaz, melyek szintje gyakran magasabb, mint a plasmában mérhető szint.

Ezek alapján feltételezzük, hogy a PF-nek nem kizárólag mechanikai szerepe van, hanem a szív szöveteit és a coronaria keringést is szabályozhatja.

HIPOTÉZIS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján két fő hipotézist fogalmaztunk meg: 1) A nyomás és/vagy volumen túlterhelés miatt kialakult billentyűbetegségben szenvedő betegek pericardialis folyadékának (PF) **ADMA**-szintje hozzájárulhat a szív morfológiai változásaihoz; **2)** Szívbetegek pericardialis folyadékában – az ischemia/hypoxia vagy ischemia/reperfusio miatt – a vasoconstrictor anyagok, mint az endothelinek olyan szintet érnek el, amely kiváltja az artériák **vasomotor** válaszát.

Célul tűztük ki 1) a PF L-Arg és ADMA szintjének meghatározását és tanulmányozását coronaria bypass (CABG) vagy billentyű (VR) műtéten áteső betegekben, valamint korreláció felállítását a PF ADMA és a szív morfológiája és funkciója között; **2)** A humán PF direkt vasomotor hatásának vizsgálatát patkány carotis artériákon, és a PF által kiváltott artériás vasomotor válaszok mechanizmusának értelmezését.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Tanulmány leírása

Betegek

A jelen tanulmányban 74, CABG vagy VR műtéten (CABG: n=42; VR: n=32) áteső (PTE ÁOK, Szívgyógyászati Klinika) beteg vett részt. További 20 nem-ISZB-s (NCP) beteg perifériás vérplasmájának ADMA szintjét tanulmányoztuk.

A tanulmány protokollját a PTE ÁOK Helyi Etikai Bizottsága (RKEB-4123/2011) jóváhagyta. A páciensek a tanulmányban való részvétel előtt beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A tanulmány illeszkedik az Orvos Világszövetség által létrehozott Helsinkai Nyilatkozat az embereken végzett orvosi kutatások etikai alapelveihez.

Állatok

Az izolált érkísérletekhez 2 hónapos hím Wistar patkányokat (N=14) használtunk (erek száma ET-1 vasomotor válaszokhoz: n=5; PF vasomotor válaszok: n=16; PF BQ123 válaszok: n=5). Minden kísérletet az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/Eu irányelve szerint végeztünk. A kísérleteket etikailag elfogadta és engedélyezte a PTE Állatkísérletes Etikai Bizottsága az Állatkísérletes Etikai Kódex alapján (No.: BA 02/2000-2/2012).

Mintagyűjtés

Humán vérplasma és pericardialis folyadék gyűjtése

A plasmamintákat az NCP betegektől, illetve a plasma és PF mintákat a szívbetegektől nyertük, melyeket heparinos vérgyűjtő csövekben gyűjtöttünk, majd ezután kb. 1 óra hosszat 5 °C-on tartottuk. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk (1200 g, 15 min) és a felülúszókat a biokémiai mérésekig és érkísérletekig -75 °C-on tartottuk.

Patkány carotis arteriák izolációja és preparálása

Az állatokat intraperitoneális ketamin injekcióval elaltattuk, majd az a. carotis communis-okat kimetszettük, ezt követően az állatokat további ketamin injekcióval túlaltattuk. Az izolált ereket (≈10 mm hosszú) mikro sebészeti eszközökkel és preparáló (sztereo-) mikroszkóp alatt hűtött (T=4°C), oxigenizált (95 % O₂, 5 % CO₂) Krebs-oldatot tartalmazó Petri csészébe helyeztük, és egyenlő (≈2 mm hosszú) hosszúságú szakaszokra vágtuk.

Az ADMA tanulmányozása pericardialis folyadékban

Echocardiographia

Minden ISZB-s beteg a műtét előtt és után kétdimenziós (2-D) transthoracicus echocardiographiás vizsgálaton vett részt. A 2-D, M-mód és Doppler echocardiographia Hewlett-Packard Sonos 5500 echocardiograph-al, és 2.5 MHz transzducerrel (Hewlett-Packard, USA) történt a legújabb Európai irányelveknek megfelelően²⁰. A következő paramétereket mértük: bal kamra vég-diasztolés átmérő (Dd), bal kamra vég-szisztolés átmérő (Ds), interventricularis septum vastagság (IVS), hátsó fal vastagság (PW), jobb karma területe (RV), jobb pitvar területe (RA), bal pitvar területe (LA). A bal kamra tömegét (LVM) az Amerikai Szívultrahang Társaság (American Society of Echocardiography-ASE) ajánlásai alapján számoltuk ki: $LVM = 0.8 (1.04 ([LVIDD + PWTD + IVSTD] 3 - [LVIDD]3)) + 0.6$ g. A bal kamra ejectiós fractiót (LVEF), mint a szisztolés funkció jelzőjét a Simpson formula szerint határoztuk meg.

Az L-Arg és ADMA koncentrációjának meghatározása

A mintákban az L-Arg és az ADMA koncentrációját folyadék kromatográfiás elválasztást követően fluoreszcens detektálással határoztuk meg. A méréseket a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékének munkatársai végezték.

A pericardialis folyadék vasomotor hatásának tanulmányozása

Mérések izolált ereken

Az érdarabokat preparálást követően izometriás myograph készülék (DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) 5 ml-es szervkamráiba (folyamatosan oxigenizált 95 % CO₂, és 5 % O₂ Krebs-oldatot tartalmaztak, melyet 36.8°C-ra melegítettünk) két rozsdamentes acéldrót (átmérő 0.04 mm) közé rögzítettük. Ezt követően az ereket előfeszítettük a saját hosszukra vonatkoztatott izometriás feszülés értékre (13.34 mN). Ez megfelel az adott ér *in vivo* mérhető

artériás középnyomás értékének. Az előfeszítést követően az ereket 60 percig inkubáltuk, és ezt követően mértük az erek izometriás feszülését (mN) Myodaq 2.01 M610+ programmal.

PF minták és vasoactív anyagok adása az erekhez

Inkubációt követően először 60 mM-os KCl-oldattal teszteltük az erek izometriás feszülését, melyet ezt követően Krebs oldattal kimostunk a szervkamrákból. Majd a következő anyagokat adtuk az erekhez: ET-1 (10^{-8} mol/L); PF (CABG és VR); BQ123 (10^{-6} mol/L). A fagyasztott PF mintákat a mérések előtt meleg vízben ($T = 20$ °C) felolvasztottuk.

ET-1-indukálta vazomotor válaszok BQ123 adását követően

Izolált patkány carotis artériákon teszteltük az ET-1 vasomotor hatását ($n=4$). A KCl (40 mM) kimosását (3-szor, 20 percig) követően ET-1-et adtunk szervkamrákba. Az izometriás görbék plató fázisának elérését követően az ET-1-et kimostuk (6-szor, 35 percig), majd a BQ123-at adtuk az erekhez, melyeket 20 percig inkubáltunk benne, majd ezt követően ismételtén ET-1-et adtunk az erekhez.

PF_{CABG} és PF_{VR} –indukálta vasomotor válaszok

Mind a CABG ($n=9$) mind a VR ($n=7$) PF vasomotor hatását izolált patkány carotis artériákon teszteltük ($N=8$, artériák: $n=16$). A KCl (60 mM) kimosását követően (3-szor, 20 percig), a PF mintákat hozzáadtuk a szervkamrákhoz. Az izometriás görbék plató fázisának elérését követően a PF-et kimostuk a kamrákból (5-ször, 20 percig), majd a kísérlet végén KCl-dal (60 mM) teszteltük az erek izometriás erejét.

PF_{CABG} indukálta vasomotor válaszok BQ123 adását követően

Az ET-1 vasomotor hatását a PF-ben ($n=5$) BQ123 (10^{-6} mol/L) adása előtt és azt követően izolált patkány carotis artériákon ($N=3$, artériák: $n=5$) teszteltük. A KCl (60 mM) kimosását (3-szor, 20 percig) követően, a PF mintákat hozzáadtuk a szervkamrákhoz, majd az izometriás görbék plató fázisának elérését követően a PF-et kimostuk a kamrákból (5-ször, 20 percig), és BQ123-at adtunk a Krebs-oldatot tartalmazó kamrákhoz (20 percig). Ezt követően a Krebs-oldatot kimostuk és ugyanazon PF-mintákat adtuk mindegyik kamrákhoz, mint a BQ123 előtt. Az izometriás görbék plató fázisának elérését követően egy másik vasoconstrictor anyagok, a norepinephrint (10^{-6} mol/L) adtuk a kamrákhoz, hogy teszteljük az erek izometriás erejét.

Statisztikai módszerek

Az eredményeket az adatok átlagaként és az átlag standard hibájaként (átlag \pm SEM) tüntettük fel. Statisztikai számításokat Microsoft Excel és SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programokkal végeztük. Statisztikailag szignifikáns különbségeket kétmintás t-próbával (Student's t-test) ($P<0.05$). A korreláció megállapításához lineáris regresszió-analízist használtunk SigmaPlot programmal.

EREDMÉNYEK

Pericardialis folyadék ADMA

A betegek klinikai jellemzői

A betegek átlag életkora és neme mindkét szívbeteg csoportban hasonló volt. A CABG csoport 35.7%-a és a VR csoport 80%-a balkamra hypertrophiás volt. A CABG csoport tagjainak nagy része hypertoniában szenvedtek és korábban acut myocardialis infarctuson (AMI) esett át. A serum kreatinin (sCr), és eGFR értékek hasonlóan alakultak mindkét szívbeteg csoportban, mely 3-as stádiumú CKD-et jelzett. A betegek pre-operatív gyógyszerelése hasonlóan alakult, habár a CABG csoport tagjai nagyobb dózisban kaptak aspirint és statint, mint a VR csoport.

A jelen tanulmányban 53 kaukázusi szívbeteg férfi és nő vett részt, akik nyitott szívműtéten estek át: 28 CABG, és 25 VR. A CABG műtétek a következők voltak: x1 CABG-0; x2 CABG-3; x3 CABG-16; x4 CABG-8; x5 CABG-1. A VR műtétek a következők voltak: AVR-17; MVR-7; AVR-MVR-1.

Az L-Arg és ADMA szintjei NCP, CABG, és VR betegekben

A plasma L-Arg és ADMA szintekben nem találtunk különbséget az NCP csoport és a szívbeteg csoportok között (L-Arg_{NCP}: 70.8±6.0 μmol/L vs. L-Arg_{CABG}: 75.7±4.6 μmol/L, p = 0.513; L-Arg_{NCP}: 70.8±6.0 μmol/L vs L-Arg_{VR}: 58.1±4.9 μmol/L, p = 0.106; ADMA_{NCP}: 0.8±0.0 μmol/L vs. ADMA_{CABG}: 0.7±0.0 μmol/L, p = 0.144; ADMA_{NCP}: 0.8±0.0 μmol/L vs. ADMA_{VR}: 0.8±0.0 μmol/L, p = 1.707). A CABG csoportban a plasma L-Arg szintek magasabbak voltak, mint a VR-ban (75.7±4.6 μmol/L vs. 58.1±4.9 μmol/L, p = 0.011), míg a PF L-Arg szintek között nem volt különbség a két csoportban (76.9±4.4 μmol/L vs. 74.8±0.0 μmol/L, p = 0.748).

A VR csoportban a PF ADMA szintje magasabb volt, mint a CABG csoportban (0.9±0.0 μmol/L vs. 0.7±0.0 μmol/L, p = 0.009).

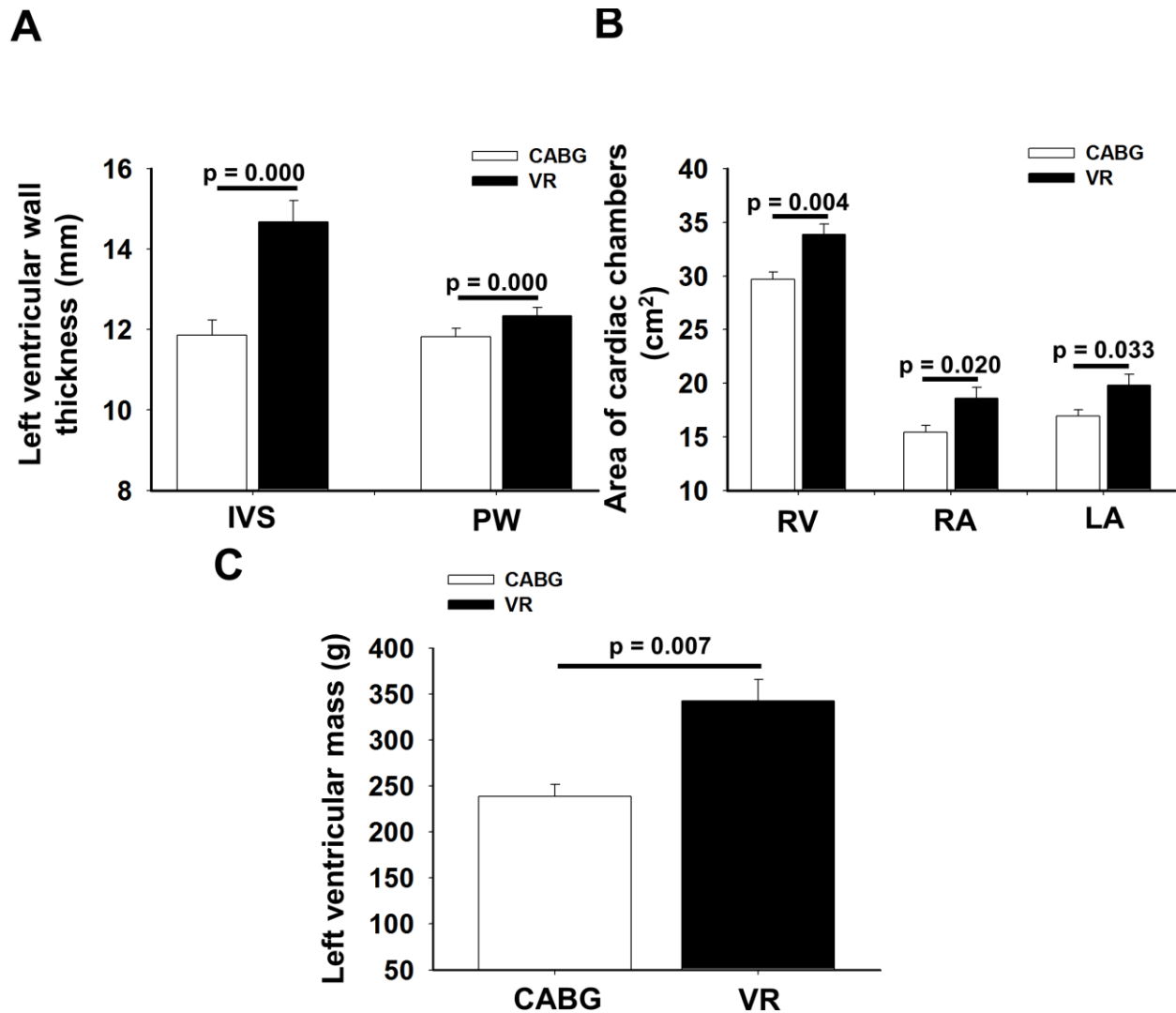
Különbséget találtunk a plasmában az L-Arg/ADMA arányban az NCP és a CABG csoport között (94.2±9.5 vs. 125.4±10.7, p = 0.044), míg az NCP és VR csoport között nem (94.2±9.5 vs. 78.3±7.7, p = 0.197). Továbbá, az L-Arg/ADMA arány mind a plasmában, mind a PF-ben magasabb volt a CABG csoportban, mint a VR csoportban (plasmában: 125.4±10.7 vs. 76.1±6.6, p = 0.004, PF-ben: 110.4±7.2 vs. 81.7±4.8, p = 0.009).

Az L-Arg és ADMA szintek közötti korrelációk a plasmában és PF-ben

Az L-Arg és ADMA szintek között a plasmában az NCP csoportban nem volt korreláció, míg a CABG csoportban pozitív korrelációt találtunk. Továbbá, mind a plasmában és PF-ben pozitív korreláció volt a CABG és a VR csoportban. Valamint pozitív korrelációt találtunk a plasma és PF L-Arg szintek között a CABG csoportban, valamint a plasma és PF ADMA szintek között a VR csoportban. Viszont nem volt korreláció sem az plasma L-Arg és PF ADMA között, sem a PF L-Arg és plasma ADMA között egyik szívbeteg csoportban sem.

Echocardiographiás paraméterek a CABG és VR csoportban

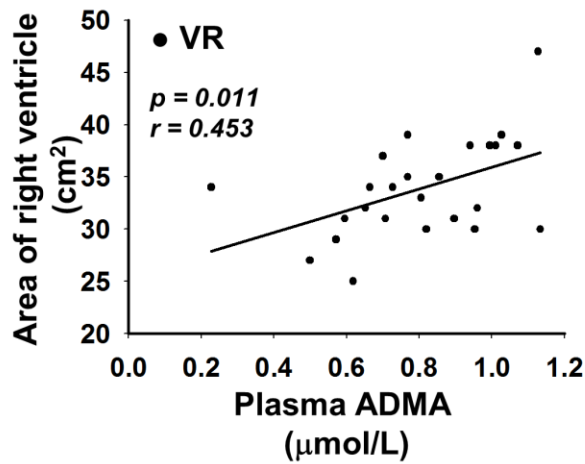
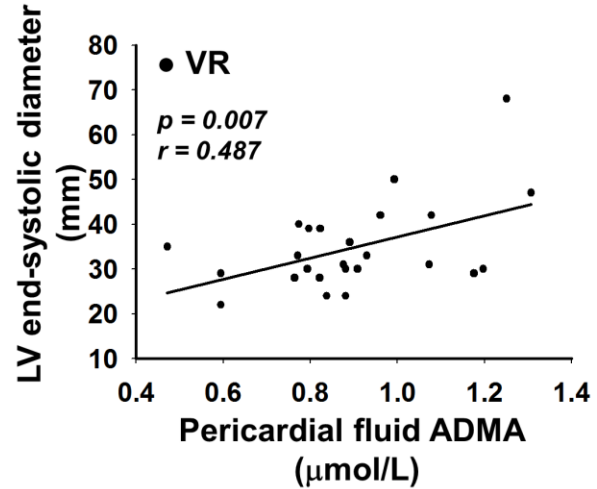
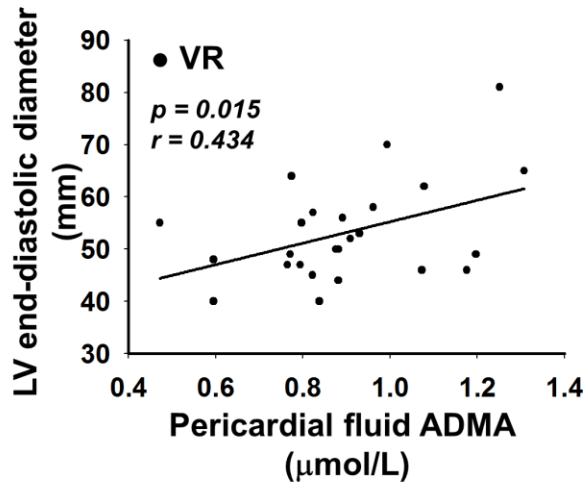
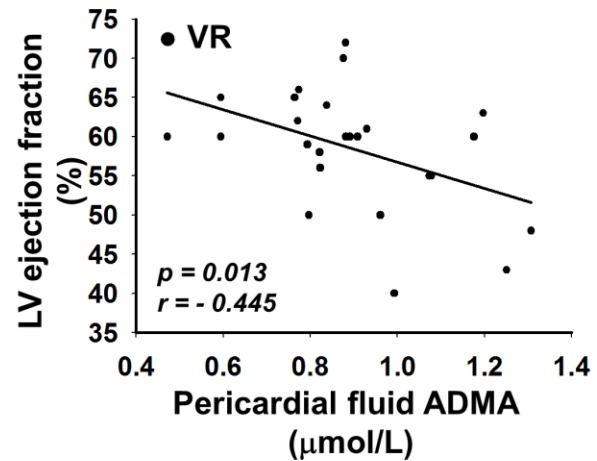
Az interventricularis septum vastagság (IVS), a bal kamra hátsó falvastagság (PW), valamint a jobb kamra (RV), a jobb pitvar (RA) és a bal pitvar (LA) területe nagyobb volt a VR csoportban, mint a CABG csoportban (**1A és B ábrák**). Továbbá, a bal kamra tömege (LVM) nagyobb volt a VR csoportban, mint a CABG csoportban (**1C ábra**), míg a bal kamra ejectiós fractio (LVEF) értéke nem különbözött a két szívbeteg csoportban.



1. Ábra A kamrák és pitvarok morfológiai paramétereit coronaria bypass (CABG, n=28) vagy billentyű műtéten (VR, n=25) áteső betegeknél. (A) interventricularis septum (IVS) és bal kamra hátsó falvastagság (PW), (B) jobb kamra (RV), jobb pitvar (RA) és bal pitvar területe (LA), valamint (C) bal kamra tömege nagyobb a VR csoportban, mint a CABG csoportban. Adatok: átlag±SEM. p<0.05.

ADMA szintek és echocardiographiás paraméterek közötti korreláció

Pozitív korrelációt találtunk a plasma ADMA szintek és az RV területe ($r = 0.453$, $p = 0.011$; **2A ábra**), a PF ADMA és a bal kamra Ds ($r = 0.487$, $p = 0.007$; **2B ábra**), és bal kamra Dd ($r = 0.434$, $p = 0.015$; **2C ábra**) között a VR csoportban. Továbbá, negatív korrelációt találtunk a PF ADMA szintek és az LVEF között a VR csoportban ($r = -0.445$, $p = 0.013$; **2D ábra**), de a CABG csoportban nem.

A**B****C****D**

2. ábra Az asymmetricus dimethyl-arginin (ADMA) szintek és echocardiographiás paraméterek közötti korrelációk billentyű (VR) műtéten áteső betegeknél. (A) plasma ADMA vs. jobb kamra területe (RV) ($y = 10.438x + 25.49$, $r = 0.453$, $p = 0.011$); (B) PF ADMA vs. bal kamra vég-szisztolés átmérő (Ds) ($y = 23.689x + 13.53$, $r = 0.487$, $p = 0.007$); (C) PF ADMA vs. bal kamra vég-diasztolés átmérő (Dd) ($y = 20.531x + 34.72$, $r = 0.434$, $p = 0.015$); (D) PF ADMA vs. bal kamra ejección fractio (LVEF) ($y = -16.779x + 73.55$, $r = -0.445$, $p = 0.013$).

A pericardialis folyadék vasomotor hatása

A betegek klinikai jellemzői

Kísérleteinkhez a pericardialis folyadék mintákat 21 coronaria bypass (CABG, n=14) vagy billentyű (VR, n=7) műtéten áteső betegtől nyertük. A VR csoportban 4 betegnél mitrális billentyűcsere, 3 betegnél aortabillentyű csere történt.

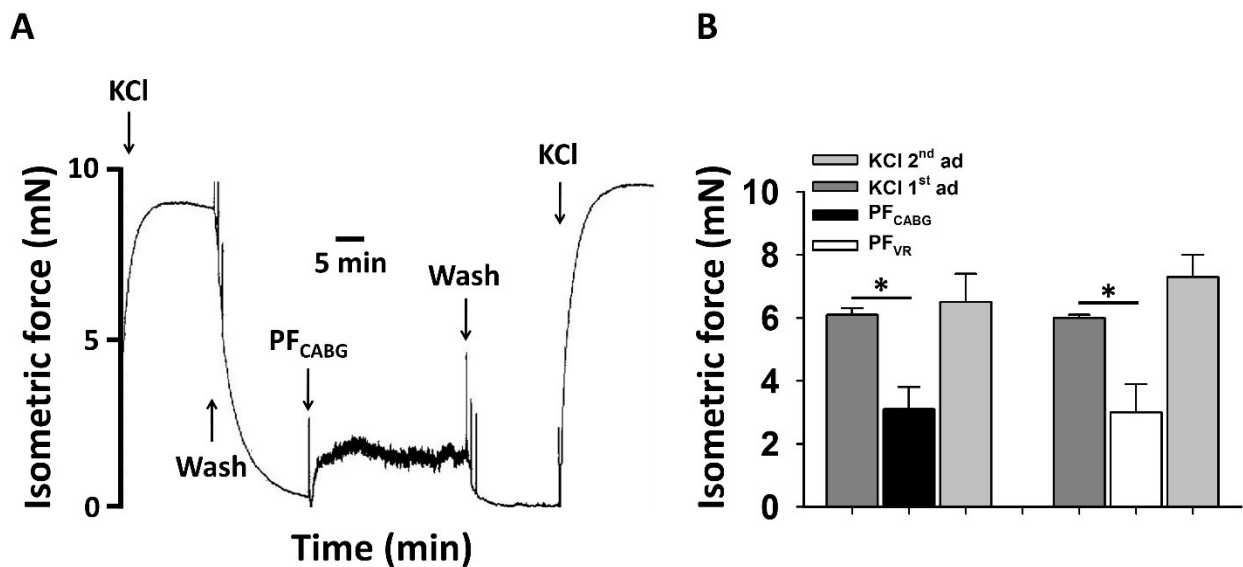
A Kanadai Kardiovaszkuláris Társaság (Canadian Cardiovascular Society - CCS) angina pectoris klasszifikációja alapján 1 betegnél enyhe vagy mérsékelt (Class 1-2), 5 betegnél mérsékelt (Class 2), 4 betegnél mérsékelt vagy súlyos (Class 2-3), 4 betegnél súlyos (Class 3) angina pectoris állt fenn.

ET-1-indukálta vasomotor válaszok BQ123 adása előtt és után

Az ET-1 az izolált arteriák isometriás erejét növelte, amely a BQ123 (10^{-6} mol/L) adását követően jelentősen ($p < 0.05$) csökkent (BQ123 előtt: 5.5 ± 0.3 mN vs. BQ123 után: 1.0 ± 0.4 mN).

Humán PF indukálta vasomotor válaszok

A **3A ábra** mutatja, hogy a PF az izolált arteriák isometriás erejét 2.2 mN értékig növeli. Mind a PF_{CABG} mind a PF_{VR} növelte az izolált arteriák isometriás erejét (PF_{CABG} , 3.1 ± 0.7 mN; PF_{VR} , 3.0 ± 0.9 mN) (**3B ábra**), de a PF_{CABG} és PF_{VR} által indukált isometriás erők nagysága között nem volt különbség ($p > 0.05$). Továbbá, a PF_{CABG} és PF_{VR} által indukált isometriás erők értéke kisebb volt ($p < 0.05$), mint a 60 mM/L KCl által indukált (PF_{CABG} , 3.1 ± 0.7 mN vs. KCl előtt, 6.1 ± 0.2 mN; PF_{VR} , 3.0 ± 0.9 mN vs. KCl előtt, 6.0 ± 0.1 mN).



3. ábra Patkány carotis arteriák KCl (60 mM/L) coronaria bypass (CABG; n = 9) vagy billentyű (VR; n = 7) műtéten áteső betegtől származó pericardialis folyadékra (PF) adott vasomotor válaszai. (A) A PF_{CABG} az izolált arteriák isometriás erejének növekedését indukálja KCl (60 mM/L) adása előtt és azt követően. (B) A PF_{CABG} és PF_{VR} növeli az izolált arteriák (n = 16) isometriás erejét KCl (40 mM/L) adása előtt és azt követően is. Adatok: átlag \pm SEM; *, $p < 0.05$ KCl hatásához képest a PF_{CABG} PF_{VR} hatásai.

PF_{CABG} indukálta vasomotor válaszok BQ123 adásával

A KCl növelte az izolált arteriák isometriás erejét (5.4 ± 0.5 mN), melyet a KCl kimosását követően a PF_{CABG} szintén növelt (2.6 ± 0.5 mN). A BQ123 (10^{-6} mol/L) adását, illetve a benne történő inkubációt (20 perc) követően, az erek PF_{CABG} által indukált isometriás ereje jelentősen csökkent (0.8 ± 0.1 mN). A KCl második hozzáadása ugyancsak növelte az isometriás erőt (5.8 ± 0.6 mN). Különbség ($p < 0.05$) volt a BQ123 előtt és után adott PF_{CABG} által kiváltott isometriás erők nagyságában (BQ123 előtt, 2.6 ± 0.5 mN vs. BQ123 után, 0.8 ± 0.1 mN).

EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Jelen tanulmányunkban két új eredmény született: **1)** A metilált L-Arg származék asymmetricus dimethyl-arginin (ADMA) szintjei szívbeteg pericardialis folyadékában korreláltak a cardialis hypertrophia/remodeling paramétereivel; **2)** Szívbeteg pericardialis folyadék az izolált arteriák constrictióját váltotta ki, amiben szerepe volt az ET-1-nek.

A humán pericardialis folyadék bioaktív molekulákat és szabályozó anyagokat tartalmaz

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a humán PF bioaktív molekulákat és szabályozó anyagokat (ionok, gázok, fehérjék, vasoactív anyagok és metabolitok) tartalmaz^{2, 11}. Az is kiderült, hogy ezen anyagok szintje különböző szívbetegségekben eltérő¹⁵. Továbbá, szívbetegben bizonyos anyagok, mint pl. az ET-1 magasabb koncentrációban vannak jelen a PF-ben, mint a plasmában¹¹.

ADMA a pericardialis folyadékban

Újabban, a signalmolekulaként, illetve a nitrogén-oxid szintáz (NOS) „fals” szubsztrátjaként számon tartott, a PRMT1 enzim által az L-Arg-ból szintetizálódó és a DDAH enzim révén lebomló ADMA került a figyelem középpontjába. Az ADMA emelkedett plasmaszintjét írták le számos cardiovascularis betegségben, ezért mint cardiovascularis rizikófaktort is említik⁶. Azt is kimutatták, hogy az ADMA, részben az endothelialis NOS (eNOS) direkt gátlásán, részben az NO biológiai elérhetőségének csökkentésén keresztül – a vascularis renin-angiotensin-rendszer (RAS) aktiválásán, és reaktív oxigén származékok (ROS) generálásán keresztül - károsítja a NO által mediált arteriás funkciókat⁵.

A humán PF jelentős mennyiségű ADMA-t tartalmaz

Azt találtuk, hogy a CABG vagy VR műtéten áteső betegek PF-a jelentős mennyiségű L-Arg-t és ADMA-t tartalmaz. Korábbi tanulmányok mutatják a humán plasma L-Arg és ADMA koncentráció értékeit (L-Arg: 50 és 100 $\mu\text{mol/L}$, ADMA: 0.3-0.8 $\mu\text{mol/L}$)²¹. Jelen tanulmányunkban az NCP csoport L-Arg és ADMA plasma szintjei a fent említett értékek közé estek.

Miután egészséges ember pericardialis folyadék nyilvánvalóan nem került vizsgálat alá, így nem rendelkezünk pontos referencia értékkel a PF L-Arg és ADMA-t szinteket illetően.

Ismert, hogy az ADMA plasma szintjei különböző cardiovascularis betegségekben eltérést mutatnak⁶. Azt találtuk, hogy az L-Arg plasma és PF szintjei a CABG és VR csoportban hozzávetőlegesen 100-szor magasabbak voltak, mint az ADMA szintek. Továbbá, a plasma ADMA szintje a fent említett referencia érték felső határa alatt volt CABG csoportban, míg azt meghaladta a VR csoportban²¹. Valamint a VR csoportban a PF ADMA szintjei magasabbak voltak, mint a CABG csoportban.

PF ADMA és balkamra hypertrophia/remodeling

A balkamra hypertrophia a krónikus haemodinamikai túlterhelés és nem-haemodinamikai faktorok interakciójának eredménye²².

A jelen tanulmányban a VR csoport nagy része aorta stenosisos beteg volt, ami a balkamrában krónikus nyomástúlterhelést okoz²³. A balkamra hypertrophia jelző echocardiographiás paraméterek a VR csoportban nagyobbak voltak, mint a CABG csoportban (**1 ábra**).

Az elmúlt évtizedben számos meggyőző eredmény született azzal kapcsolatban, hogy az NO jelenléte gátolja a myocardium hypertrophias növekedését²⁴. Az ADMA és a cardiovascularis betegségek közti kapcsolatot bővítheti az ADMA által indukált cardialis hypertrophia. Számos alternatív mechanizmus vetődött fel, amelyek az ADMA és a cardialis hypertrophia kapcsolatát magyarázzák⁷. Kimutatták, hogy az ADMA képes aktiválni a fibroblaszt növekedési factor receptorokat a cardiomyocyton, valamint localisan aktiválja a renin-angiotensin-aldosteron rendszert, ezáltal hozzájárulhat a myocardialis hypertrophia és a fibrosis kialakulásához²⁵.

A cardialis hypertrophia/remodeling megelőzéséhez tehát az NO és a normál NOS aktivitás szükséges, azaz az emelkedett ADMA, így a csökkent NO cardialis hypertrophiahoz/remodelinghez vezethet.

A **4. ábrán** összefoglaltuk az ADMA szerepét a szív morphológiájának szabályozásában. Korábban már felvetettünk egy potenciális mechanizmust, mely szerint az emelkedett serum ADMA csökkenti az NO biológiai elérhetőségét²⁶. Azt is kimutattuk, hogy az emelkedett ADMA szint aktiválja a renin-angiotensin rendszert (RAS) az artériák falában, és növeli az Ang II termelődését, valamint aktiválja a NAD(P)H oxidázt, ami a reaktiv oxigén származékok növekedéséhez vezet, melyek csökkentik az NO biológiai elérhetőségét⁵. Az is ismert, hogy az emelkedett Ang II funkcionál növekedési hormonnként is²⁷. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a korábbi tanulmányokkal és azt sugallják, hogy az NO csökkent szintje²⁸, valamint az emelkedett RAS aktiváció²⁹ együttesen hozzájárulnak a cardialis hypertrophia kialakulásához. A jelen tanulmányban a pericardialis folyadék emelkedett ADMA szintje a VR csoportban korrelált a bal kamra hypertrophiaival, így az ADMA, mint biomarker, pericardialis szintje jelentőséggel bír (**4. ábra**).

Az ADMA szerepe a cardialis remodelingben - myocyták proliferációjának csökkentése

A jelen és korábbi eredmények alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy az emelkedett pericardialis ADMA szintek, melyek olyan fontos pathophysiologiai mechanizmusokat jeleznek, mint az abszolút vagy relatív cardialis ischemia és hypoxia, és az NO csökkent biológiai elérhetősége, amelyek – együttesen a localisan felszabadult növekedési hormon Ang II-vel – hozzájárulhatnak a cardialis hypertrophia és remodeling kialakulásához (**4. ábra**). A pericardialis folyadék analízisa értékes diagnosztikus eszköz lehet, míg annak összetételébe való beavatkozás és hatásának módosítása új terápiás alternatívákat adhat a cardialis funkció és struktúra javítása érdekében.

A pericardialis folyadék vasomotor hatása

Jelen tanulmányunkban feltételeztük, hogy a szívbetegek pericardialis folyadéka növeli a patkány arteriák isometriás tónusát. Vizsgálatainkhoz izolált patkány carotis artériákat használtunk, mivel több publikáció kimutatta, hogy a patkány carotis artériák a humán coronaria erekben végbemenő eseményeket tükrözik^{30-33 34-36}.

A humán pericardialis folyadék kiváltja az izolált arteriák kontrakcióját

A CABG és VR betegek pericardialis folyadéka jelentősen megnövelte a patkány izolált carotis arteriák isometriás tónusát (**3. ábra**). Az arteriák PF indukálta vasomotor válaszainak karakterisztikája és erőssége különbözött a KCl-től (**3. ábra**). A KCl indukálta válaszgörbék szigmoidak voltak, míg azok, melyeket a PF indukált hirtelen emelkedő meredek szakasszal kezdődtek, melyet egy hosszan tartó plató fázis követett (**3. ábra**).

A PF indukálta válaszgörbe tartósan fennálló plató fázisa azt sugallja, hogy a PF tartós hatású constrictor(okat) tartalmaz. Korábban Clarke és mtsai kimutatták, hogy az ET-1-nek tartós constrictor hatása van, mely alapján feltételezzük, hogy a humán PF fő constrictor anyaga az endothelin³⁷. Saját kísérleti rendszerünkben a 60 mM-os KCl és 10⁻⁸ M-os NE az erek maximális kontrakcióját váltotta ki. A PF által kiváltott maximális kontrakció kisebb volt a KCl és NE-hez képest, de önmagában jelentős, ami azt mutatja, hogy a PF-ben jelenlévő endothelin fontos szereppel bír coronaria erek átmérőjének szabályozásában.

A PF_{CABG} és PF_{VR} által kiváltott arteriás kontrakciók erősségében nem mutatkozott különbség, ami azt sugallja, hogy a CABG és VR betegek pericardialis folyadékában egy közös mechanizmus emeli az endothelin szintet. Egyre több adat mutatja, hogy a coronaria és billentyű betegségben a vasoaktív anyagoknak kiemelkedő szerepe van³⁸⁻⁴⁰ és a jelen eredmények is egy lehetséges vasoconstrictor hatásmechanizmust látszanak igazolni

A PF endothelin szerepe az izolált arteriák isometriás kontrakciójában

Régóta ismert, hogy az ET-1 egy erős vasoconstrictor peptid, melynek fontos szerepe van az endothel dysfunctio kialakulásában, többek között az NO-val történő kölcsönhatás révén¹⁷. Számos tanulmány jelent meg az endothelin(ek)-nek cardiovascularis betegségek kialakulásában betöltött szerepével kapcsolatban¹⁷. Azt is kimutatták, hogy az ET-1 magas koncentrációban van jelen szívbetegek pericardialis folyadékában³, ami azt sugallja, hogy az ET-1-nek jelentős szerepe van a PF-ben – így nem kizárólag a systemás vérkeringésben – hanem a coronaria keringésben és a cardialis functiókban is.

Korábbi és a jelen eredmények is azt mutatják, hogy az ET-1 növeli az izolált arteriák isometriás erejét, melyet a szelektív ET_A receptor antagonistá BQ123 jelentősen csökkent¹⁷. Jelen tanulmányunkban azt találtuk, hogy a PF_{CABG} által indukált arteria kontrakció jelentősen csökken BQ123 adásával, ami jelzi, hogy a PF_{CABG} constrictor hatását jelentős részben az emelkedett ET-1 koncentráció eredményezi, mely főleg az ET_A receptoron keresztül érvényesül^{11, 32}.

Fontos megjegyezni, hogy a jelen tanulmányban résztvevő, CABG vagy VR műtéten áteső betegek, ahogy korábbi tanulmányok is leírják, a műtét előtt számos ischemiás és ischemia/reperfusiós periódusokon estek át⁴¹. Az ET-1-ről már bebizonyosodott, hogy az ischemia/reperfusiós károsodás egyik mediátora⁴¹. Tehát logikusnak tűnik, hogy a PF-ben lévő ET-1 vasomotor hatású szintjét mindkét szívbeteg csoportban a gyakori hypoxiás periódusok eredményezték.

A fentiek alapján feltételezünk, egy új, physiologiás és pathophysiologiás körülmények között is működő, coronariakeringést szabályozó útvonalat, mely a pericardialis folyadék révén valósul meg. Miután a pericardialis folyadékban képződő vagy oda secretált vasoactív anyagok szabadon diffundálhatnak a pericardialis térben, így a PF, mint transzport közeg a szív felszínének különböző területeire juttathatja a szabályozó anyagokat. Ezért felvetjük a pericardialis folyadék - mint harmadik folyadéktér - szerepét a coronaria keringés, és esetleg a szív működés szabályozásában, ami a pericardialis téren keresztüli új terápiás lehetőséget jelenthet a szívbetegek gyógyításában.

Valóban, mint korábbi tanulmányok mutatják, hogy az intrapericardialisan adott anyagok képesek hatást gyakorolni a szív működésre¹⁸ felmerül a lehetősége a cardialis functiok és a coronaria keringés intrapericardialisan adott gyógyszerekkel történő javításának. A pericardialis folyadék további tanulmányozása biomarkerek kifejlését teheti lehetővé különböző szívbetegségek, mint pl. a pericarditis, a cardialis hypertrophia és ischemia diagnosztikájában.

AZ ÚJ MEGFIGYELÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

ADMA a pericardialis folyadékban:

- 1) az L-Arg és methylált származéka, az ADMA jelen volt a pericardialis folyadékban (PF) a CABG és VR csoportban;
- 2) az L-Arg koncentrációja a plasmában magasabb volt a CABG csoportban, mint VR csoportban, míg az ADMA PF koncentrációja magasabb volt a VR csoportban, mint CABG csoportban;
- 3) pozitív korrelációt találtunk az L-Arg és ADMA szintek között a plasmában a CABG csoportban, valamint a PF-ben a CABG és VR csoportban, továbbá a plasma L-Arg és PF L-Arg szintek között a CABG csoportban, illetve a plasma és PF ADMA szintek között a VR csoportban;
- 4) az L-Arg/ADMA ratio a plasmában és a PF-ben is alacsonyabb volt a VR csoportban, mint a CABG csoportban;
- 5) pozitív korrelációt találtunk a plasmában az ADMA szintek és a jobb kamra területe között; a PF-ben az ADMA szintek és a bal kamra vég-szisztolés és vég-diasztolés értékei között, valamint negatív korrelációt a PF-ben az ADMA szintek és a bal kamra ejectio fractio értékei között a VR csoportban.

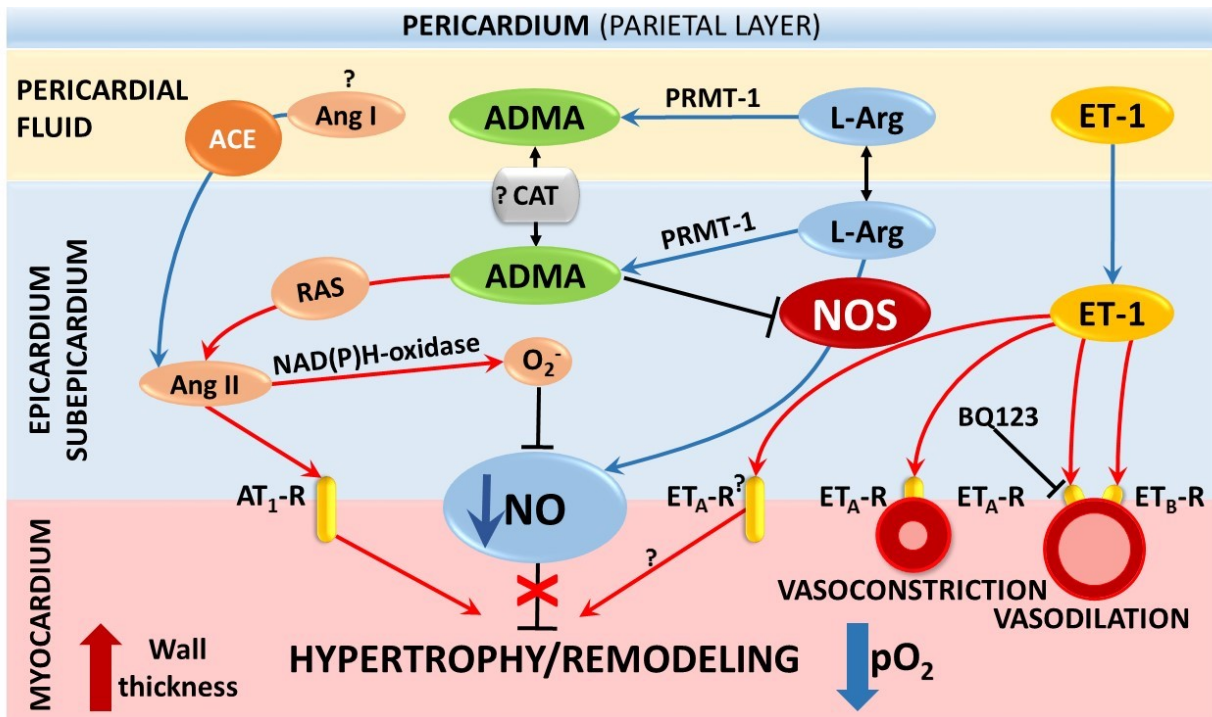
A pericardialis folyadék vasoconstrictor hatása:

- 6) szívbeteg pericardialis folyadéka növelte a patkány izolált carotis artériák isometriás tónusát;
- 7) a CABG és VR betegektől származó PF által indukált isometriás tónus nagysága nem különbözött egymástól;
- 8) a pericardialis folyadékok által indukált arteriális kontrakció szignifikánsan csökkent a szelektív ET_A receptor antagonist BQ123 adását követően.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen tanulmányunkban vizsgáltuk a pericardialis folyadék „nem-mechanikai” funkcióit. Korábbi és jelen eredményeink szerint a PF fontos paracrin functiókkal rendelkezik: a benne megtalálható signal molekulák révén befolyásolja a szív működését, annak morfológiai átalakulását és a coronariák vasomotor tónusán keresztül, a coronariákban lévő vérkeringést.

A PF biológiailag aktív anyagainak meghatározása, és vasomotor hatásának tanulmányozása új perspektívákat adhat a szív élettani, farmakológiai, és terápiás vizsgálatához. **Miután a pericardialis folyadék szabadon áramlik a szív felszíne körül, valamint eléri a cardialis interstitiumot és coronaria ereket, így felvetődik a lehetőség, hogy a pericardialis folyadék, mint „harmadik útvonal” szerepet játszik a cardialis homeostasis és coronaria keringés szabályozásában.**



4. ábra A szív szöveteiben végbemenő mechanizmusok a pericardialis folyadék bioaktív anyagai által. A pericardialis folyadék emelkedett ADMA szintje szívizom hypertrophiát/remodelinget vált ki: eszerint az NO csökkent biológiai elérhetősége és a megnövekedett Ang II együttesen szívizom hypertrophiához/remodelinghez vezetnek. A pericardialis folyadékban lévő ET-1 az ET_A-receptoron keresztül vasoconstrictiot, míg az ET_B-receptoron keresztül vasodilatatiót vált ki. ET_A-receptor blokkoló BQ123 adása vasodilatatiót vált ki. ADMA – asymmetricus dimethyl-arginin, ET-1 - endothelin-1, L-Arg - L-arginin, NO – nitrogén monoxid, NOS – NO-szintáz, RAS – renin-angiotensin-rendszer, Ang I - angiotensin I, ACE – angiotensin konvertáló enzim, Ang II – angiotensin II, ROS – reaktív oxigén származékok, O₂⁻ - szuperoxid anion, PRMT-1 – protein arginin methyl-transferase-1, AT₁-R – angiotensin II receptor, ET_A-R és ET_B-R – endothelin-1 receptorok, CAT – kationos aminosav transzporter, pO₂ – parciális oxigénnyomás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Prof. Koller Ákosnak, témavezetőmnek, aki alapvetően egyengette és iránymutatásával segítette kutatómunkámat. Köszönetet mondok Prof. Cziraki Attilának, társtémavezetőmnek a kutatásom klinikai részében nyújtott segítségért, különösen a biológiai minták gyűjtésében, és az echocardiographiás mérések kivitelezésében, valamint szakmai tanácsaiért. Külön köszönet illeti Prof. Hamar Jánost az állatkísérletekben nyújtott számos módszertani és etikai tanácsaiért. Köszönettel tartozom Prof. Kéki Sándornak és munkacsoportjának, akik a humán minták biokémiai mérését végezték, valamint PhD társaimnak és TDK hallgatóknak a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Dusikné Szommer Zsuzsanna Dalmát és Grozdicsné Visnyei Tündét a biológiai minták gyűjtésében és a mindennapi laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Hálás köszönet illeti barátomat Dr. Seffer Istvánt, akitől szintén rengeteg támogatást kaptam a kutatásokhoz.

Végül a legfontosabbként, családomnak is szeretném megköszönni a sok segítséget és támogatást, nélkülük ez a munka nem készült volna el.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Baue AE, Blakemore WS. The pericardium. *The Annals of thoracic surgery*. 1972;14:81-106
2. Ben-Horin S, Shinfeld A, Kachel E, Chetrit A, Livneh A. The composition of normal pericardial fluid and its implications for diagnosing pericardial effusions. *The American journal of medicine*. 2005;118:636-640
3. Horkay F, Szokodi I, Selmecei L, Merkely B, Kekesi V, Vecsey T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life sciences*. 1998;62:267-274
4. Luneburg N, Harbaum L, Hennigs JK. The endothelial adma/no pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. *BioMed research international*. 2014;2014:501612
5. Veresh Z, Debreczeni B, Hamar J, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species. *Journal of vascular research*. 2012;49:363-372
6. Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Fukami K, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine (adma) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clinical and experimental nephrology*. 2007;11:115-121
7. Nopora M, Graczykowska A, Prochniewska K, Zdrojewski Z, Calka A, Gorny J, Stompor T. Relationship between serum asymmetric dimethylarginine and left ventricular structure and function in patients with endstage renal disease treated with hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn*. 2012;122:226-234
8. Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*. 2010;122:2727-2735
9. Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2004;26:608-615
10. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2006;7:589-600
11. Horkay F, Laine M, Szokodi I, Leppaluoto J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. Human pericardial fluid contains the highest amount of endothelin-1 of all mammalian biologic fluids thus far tested. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1995;26 Suppl 3:S502-504
12. Klemola R, Huttunen P, Laine M, Weckstrom M, Hirvonen J. Catecholamines in pericardial fluid of normotensive, spontaneously hypertensive and reserpine-treated rats. *Acta physiologica Scandinavica*. 1999;165:293-297
13. Fazekas L, Horkay F, Kekesi V, Huszar E, Barat E, Fazekas R, Szabo T, Juhasz-Nagy A, Naszlady A. Enhanced accumulation of pericardial fluid adenosine and inosine in patients with coronary artery disease. *Life sciences*. 1999;65:1005-1012
14. Soos P, Juhasz-Nagy A, Ruskoaho H, Hartyanszky I, Merkely B, Toth M, Horkay F. Locally different role of atrial natriuretic peptide (anp) in the pericardial fluid. *Life sciences*. 2002;71:2563-2573
15. Namiki A, Kubota T, Fukazawa M, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, Ebine K, Yamaguchi T. Endothelin-1 concentrations in pericardial fluid are more elevated in patients with ischemic heart disease than in patients with nonischemic heart disease. *Jpn Heart J*. 2003;44:633-644
16. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin f2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998;97:1536-1539
17. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-2440

18. Szokodi I, Horkay F, Merkely B, Solti F, Geller L, Kiss P, Selmei L, Kekesi V, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhasz-Nagy A, Toth M. Intrapericardial infusion of endothelin-1 induces ventricular arrhythmias in dogs. *Cardiovascular research*. 1998;38:356-364
19. Horkay F, Szokodi I, Merkely B, Solti F, Geller L, Kiss P, Selmei L, Horvath I, Kekesi V, Juhasz-Nagy A, Toth M. Potential pathophysiologic role of endothelin-1 in canine pericardial fluid. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;31 Suppl 1:S401-402
20. Cziraki A, Ajtay Z, Nagy A, Marton L, Verzar Z, Szabados S. Early post-operative thrombosis of the prosthetic mitral valve in patient with heparin-induced thrombocytopenia. *J Cardiothorac Surg*. 2012;7:23
21. Horowitz JD, Heresztyn T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (adma) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007;851:42-50
22. Vatner DE, Homcy CJ, Sit SP, Manders WT, Vatner SF. Effects of pressure overload, left ventricular hypertrophy on beta-adrenergic receptors, and responsiveness to catecholamines. *The Journal of clinical investigation*. 1984;73:1473-1482
23. Chambers JB. Aortic stenosis. *Eur J Echocardiogr*. 2009;10:i11-19
24. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Lin JW, Chen YL, Chen CH, Lin H, Cheng CF, Chiu WT, Wang DL, Chen JJ. Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy through cgmp-mediated suppression of extracellular-signal regulated kinase phosphorylation. *Molecular pharmacology*. 2005;68:1183-1192
25. Luo Z, Teerlink T, Griendling K, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Angiotensin ii and nadph oxidase increase adma in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2010;56:498-504
26. Physiology Do, Building BS, College NYM, Valhalla NA, Z., Scalera F, Cziraki A, Horvath I, Papp L, Sulyok E, Szabo C, Martens-Lobenhoffer J, Awiszus F, Bode-Boger SM. Stent placement in patients with coronary heart disease decreases plasma levels of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor adma. *International journal of molecular medicine*. 2009;23:651-657
27. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin ii and the heart : On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000;35:1183-1188
28. Hunter JC, Zeidan A, Javadov S, Kilic A, Rajapurohitam V, Karmazyn M. Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a rhoa-rock-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:810-818
29. Gelb BD, Tartaglia M. Ras signaling pathway mutations and hypertrophic cardiomyopathy: Getting into and out of the thick of it. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:844-847
30. Maguire JJ, Davenport AP. Eta receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *British journal of pharmacology*. 1995;115:191-197
31. Godfraind T. Evidence for heterogeneity of endothelin receptor distribution in human coronary artery. *British journal of pharmacology*. 1993;110:1201-1205
32. Tirapelli CR, Casolari DA, Yogi A, Montezano AC, Tostes RC, Legros E, D'Orleans-Juste P, de Oliveira AM. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: Involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of k⁺ channels in etb-induced relaxation. *British journal of pharmacology*. 2005;146:903-912
33. Vuurmans TJ, Boer P, Koomans HA. Effects of endothelin-1 and endothelin-1 receptor blockade on cardiac output, aortic pressure, and pulse wave velocity in humans. *Hypertension*. 2003;41:1253-1258
34. Kallikazaros I, Tsioufis C, Sideris S, Stefanadis C, Toutouzas P. Carotid artery disease as a marker for the presence of severe coronary artery disease in patients evaluated for chest pain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1999;30:1002-1007
35. Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11:1245-1249

36. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Annals of internal medicine*. 1998;128:262-269
37. Clarke JG, Larkin SW, Benjamin N, Keogh BE, Chester A, Davies GJ, Taylor KM, Maseri A. Endothelin-1 is a potent long-lasting vasoconstrictor in dog peripheral vasculature in vivo. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1989;13 Suppl 5:S211-212
38. Kolettis TM, Barton M, Langleben D, Matsumura Y. Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction. *Cardiology in review*. 2013;21:249-256
39. Volpe M, Tocci G, Savoia C. Angiotensin ii receptor blockers and coronary artery disease: 'Presumed innocents'. *European heart journal*. 2006;27:1506-1507; author reply 1508
40. Peltonen T, Taskinen P, Napankangas J, Leskinen H, Ohtonen P, Soini Y, Juvonen T, Satta J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Increase in tissue endothelin-1 and eta receptor levels in human aortic valve stenosis. *European heart journal*. 2009;30:242-249
41. Skovsted GF, Kruse LS, Larsen R, Pedersen AF, Trautner S, Sheykhzade M, Edvinsson L. Heart ischaemia-reperfusion induces local up-regulation of vasoconstrictor endothelin etb receptors in rat coronary arteries downstream of occlusion. *British journal of pharmacology*. 2014;171:2726-2738