

A hipertrófiás myocardium reverz elektromos remodellációjának vizsgálata patkánymodellben

Ruppert Mihály^{1,2*}, Barta Bálint András^{2*}, Korkmaz-Icöz Sevil¹, Li Shiliang¹, Oláh Attila², Mátyás Csaba², Németh Balázs Tamás², Benke Kálmán², Sayour Alex Ali², Karck Matthias¹, Merkely Béla², Radovits Tamás^{2*}, Szabó Gábor^{1*}

¹Ruprecht-Karls Egyetem Szívsebészeti Klinika, Kísérleti Kutató Laboratórium, Heidelberg

²Semmelweis Egyetem, Kísérleti Kutató Laboratórium, Városmajori Szív- és Érsebészeti Klinika, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Ruppert Mihály, SE, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Kardiológiai Központ – Kardiológiai Tanszék, Kísérleti Kutató Laboratórium, 1122 Budapest, Városmajor u. 68., e-mail: ruppertmis@gmail.com

Bevezetés: Széles körben elfogadott, hogy a fokozott nyomásterhelés által előidézett bal kamrai (BK) szívizom-hipertrófia (BKH) kialakulását a myocardium fokozott aritmia hajlama kíséri. Szintén ismert, hogy a fokozott utóterhelés megszüntetése az átépült szívizomszerkezet visszaalakulását, ún. reverz remodellációját eredményezheti, amely együtt járhat az aritmogenitás egyidejű csökkenésével. Ennek ellenére a myocardium reverz elektromos átépülését kísérő sejtszintű változásokat kevesen vizsgálták. Ezért jelen tanulmányunkban célunk volt a BKH kialakulásának és visszafejződésének elektrokardiográfias nyomonkövetése, és az elektrofiziológiai változások háttérében meghúzódó sejtszintű és funkcionális történések azonosítása.

Módszerek: Patkánymodellünkben a fokozott nyomásterhelést az aorta műtéti beszűkítésével (aortic banding; AB) biztosítottuk 6 (AB-6hét), illetve 12 hét (AB-12hét) időtartamra. A szívizom-hipertrófia kialakulása után, a reverz remodellációt a szűkület eltávolításával (Debanding) idéztük elő. A kontrollcsoportot áloperált állatok alkották. A BKH kialakulását, és visszafejződését elektrokardiográfiával és szívultrahang-vizsgálattal követtük. A fehérje-expressziót western blottal tanulmányoztuk. A miokardiális fibrózist picosirius vörös festéssel vizsgáltuk.

Eredmények: A szűkület eltávolítása a BKH jelentős visszafejlődését eredményezte, amelynek mértéke korrelált a megnyúlt korrigált QT-intervallum regressziójával. (cQT: 68,7±1,6 vs. 91,0±1,9 ms Debanding vs. AB-12hét, p<0,05). A fokozott nyomásterhelés megszüntetése továbbá eredményesen előzte meg a bal kamra funkcionális hanyatlását, és egyúttal megőrizte a pitvar-kamrai átvezetést (PQ: 47,5±1,2 vs. 53,8±1,9 ms Debanding vs. AB-12hét, p<0,05). Mindemellett az utóterhelés csökkentése megakadályozta a QRS-komplexum kiszélesedését (QRS: 21,8±0,5 vs. 24,9±0,7 ms Debanding vs. AB-12hét, p<0,05), amellyel az intersticiális kollagén mennyiségének csökkenése állt párhuzamban.

Következtetések: A BKH visszafejlődése a szívfunkció romlásának és a miokardiális fibrózis súlyosbodásának gátlásával együtt hozzájárul a nyomáscsökkenés által kiváltott reverz elektromos remodellációhoz.

Kulcsszavak: bal kamrai szívizom-hipertrófia, fokozott nyomásterhelés, nyomásterhelés csökkentése, elektrokardiogram, reverz elektromos remodelláció

Reverse electrical remodeling following pressure unloading in a rat model of myocardial hypertrophy

Introduction: Pressure overload-induced left ventricular myocardial hypertrophy (LVH) is characterized by increased proarrhythmic vulnerability. In contrast, pressure unloading leads to reverse remodeling and decreases LVH-associated arrhythmogenicity. However, cellular changes that occur during reverse electrical remodeling have been studied less. Therefore, we aimed to provide an electrocardiographic characterization of a rat model of LVH that underwent pressure unloading and to simultaneously identify the underlying cellular and functional alterations.

Methods: LVH was induced in rats by abdominal aortic banding for 6 or 12 weeks. Sham-operated animals served as controls. Pressure unloading was evoked by removing the aortic constriction after week 6 (Debanding). Serial echocardiography and electrocardiography were performed to investigate the development and the regression of LVH. Protein expression levels were detected by western blot. Myocardial fibrosis was assessed by Picosirius red staining.

Results: Pressure unloading resulted in the regression of LVH in correlation with the reversion of the prolonged corrected QT interval (cQT: 68.7±1.6 vs. 91.0±1.9 ms Debanding vs. AB week 12, P<0.05). Furthermore, pressure unloading prevented the functional decompensation of LVH and simultaneously preserved adequate atrioventricular conduction (PQ: 47.5±1.2 vs. 53.8±1.9 ms Debanding vs. AB week 12, P<0.05). Finally, pressure unloading effectively preceded the broadening of the QRS complex (QRS: 21.8±0.5 vs. 24.9±0.7 ms Debanding vs. AB week 12, P<0.05) in parallel with the attenuation of interstitial collagen accumulation.

Conclusions: The regression of LVH with maintained cardiac function and decreased myocardial fibrosis contributes to pressure unloading-induced reverse electrical remodeling.

Keywords: left ventricular hypertrophy; aortic banding; pressure unloading; reverse electrical remodeling

*A szerzők azonos mértékben járultak hozzá a közleményhez

Készült Ruppert et al. Hypertens Res 2017; 40: 637–645. közleményének felhasználásával a SpringerNature Kiadó írásos engedélyével (1)

Bevezetés

A bal kamra hosszan tartó nyomásterhelésének (pl. hipertónia, aortastenosis) hatására bal kamrai szívizom-hipertrófia fejlődik ki (BKH), amely a malignus kamrai aritmiák és így a hirtelen szívhalál alapvető rizikófaktora (2). Ennek magyarázatául szolgál, hogy a krónikusan fennálló hemodinamikai terhelés nemcsak a szívizomsejtek méretének növekedésével, hanem jellegzetes elektrofiziológiai változásokkal is együtt jár. Erre utal az elektromos remodelláció fogalma, amely fokozott intersticiális fibrózist (3), a Ca^{2+} homeosztázis fehérjéinek megváltozott expresszióját (4) valamint a réskapcsolatok lecsökkent számát foglalja magába (5). Ezen celluláris változások a BKH kialakulása során eltérő időben jelentkeznek, és eltérő mechanizmussal vezetnek kamrai aritmiákhoz.

A BKH-t kísérő leggyakoribb elektrofiziológiai eltérés az akciós potenciál (AP) megnyúlása, amely az EKG-n megnyúlt QT-intervallum formájában jelenik meg. Hátterében repolarizációs zavar áll (3), amely a csökkent kifelé irányuló K^+ (6), illetve a fokozott befelé irányuló Ca^{2+} -áramra (4) vezethető vissza. A repolarizációs idő megnyúlása a korai és a késői utódepolarizációkra egyaránt hajlamosít (7, 8). Ezzel összhangban a korán, funkcionális szempontból még kompenzált stádiumban lévő BKH mellett fellépő hirtelen szívhalál esetekért elsősorban triggerelt aktivitások felelnek (3).

Továbbá a vezetés lassulására utaló QRS-komplexum kiszélesedése szintén gyakran megfigyelhető dekompenzált BKH-ban és szívelégtelenségben (9), amit a jelentős miokardiális fibrózis (10), és a réskapcsolatok alacsony száma magyarázhat (5). A vezetés sebessége viszont nem egyenlő mértékben lassul minden szívizomterületen, ezért a myocardium refrakteritás szempontjából inhomogénné válik (11), amely folyamatok együttesen re-entry típusú kamrai tachyarrhythmiai kialakulására hajlamosítanak.

Továbbá a BKH-t és szívelégtelenséget kísérő elektrofiziológiai változások a pitvarokban is manifesztálódnak. Ezt támasztja alá, hogy szívelégtelen nyulakban szignifikánsan hosszabb PR-intervallumot, a pitvar-kamrai junkció megnyúlását és bizonyos ioncsatorna expressziós eltéréseket találtak (12).

A fokozott nyomásterhelés megszüntetése ugyanakkor, megfelelően korai stádiumban, az átépült szívizomszerkezet visszaalakulását, ún. reverz remodellációját eredményezheti (13, 14), amely előnyös elektrofiziológiai változásokkal is együtt járhat. Utóbbit támasztották alá *Rials és munkatársai* (15), akik aorta szűkített majd a szűkületet eltávolított macskamodellben a BKH regresszióját követően normalizálódott monofázisos AP hosszról (APH), szignifikánsan magasabb fibrillációs küszöbről és kevesebb kiváltható polimorf kamrai aritmiáról számoltak be. Mindezek ellenére jelenleg nem áll rendelkezésre adat a reverz elektromos remodelláció mechanizmusairól.

Ezért patkánykísérletünkben célunk volt (1) a BKH kiala-

kulásának és visszafejlődésének elektrokardiográfiával történő karakterizációja, valamint (2) a reverz elektromos remodelláció háttérében meghúzódó sejtszintű és funkcionális elváltozások egyidejű azonosítása.

Módszerek

Állatok

Hím Sprague–Dawley patkányokat (n=51) (160–180 g; Charles River, Sulzfeld, Németország) szabványos laboratóriumi körülmények között tartottunk. Vizsgálatainkat a kísérleti állatok tartásáról és felhasználásáról szóló nemzetközi szabályoknak (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Institutes of Health 1996; 85–23) megfelelően végeztük, az etikai bizottság engedélyével.

A hasi aorta beszükitésére és a szűkület eltávolítására alkalmazott eljárások

A bal kamra fokozott nyomásterhelését a hasi aorta műtéti beszükitésével idéztük elő (aortic banding, AB) (n=33), ahogy azt már korábban ismertettük (16, 17). Röviden összefoglalva, medián laparotomiát követően egy 2-0-s sebési fonál felhasználásával az aorta abdominális szakaszát, a suprarenalis síkban egy 22 G-s tű külső átmérőjével megegyező szélességűre szűkítettük (18). Az áloperált (Sham) állatok (n=18) azonos eljáráson mentek keresztül, az aorta beszükitésétől eltekintve. A 6. hét elteltével az aortaszűkített állatok egy részénél (n=11) a fonál eltávolításra került (Debanded), a fokozott nyomásterhelés megszüntetése céljából. A posztoperatív fájdalomcsillapítást szubkután adott buprenorfin injekcióval biztosítottuk.

Kísérleti csoportok

6 héttel az első műtétet követően állatainkat az alábbi öt csoportba osztottuk:

1. 6 hetes aortaszűkített csoport (AB-6hét; n=8), a csoport tagjait aortaszűkítést követően 6 hétig követtük;
2. 6 hetes áloperált csoport (Sham-6 hét; n=8), a csoport tagjait, áloperációt követően 6 hétig követtük;
3. 12 hetes aortaszűkített csoport (AB-12hét; n=14), a csoport tagjait aortaszűkítést követően 12 hétig követtük;
4. 12 hetes áloperált csoport (Sham-12 hét; n=10), a csoport tagjait, áloperációt követően 12 hétig követtük;
5. 12 hetes aortaszűkületet eltávolított csoport (Debanded; n=11), a csoport tagjai aortaszűkítésen mentek keresztül, majd a 6. hét után a szűkület eltávolításra került és az állatokat a 12. hét végéig követtük.

A szívek elektromos, morfológiai és hemodinamikai változásait a 3., 6., 9., és 12. héten végzett elektrokardiográfiás és echokardiográfiás mérésekkel követtük nyomon. A kísérleti periódus végén invazív vérnyomásmérést hajtottunk végre, majd meghatároztuk a szív- (HW) és tüdő (LW) tömegeket és a tibia hosszát (TL).

Echokardiográfia

A vizsgálatokat a korábbiakban ismertetettek szerint hajtottuk végre (19). Röviden: az állatokat 100%-os oxigénnel történő lélegeztetés mellett 5%-os indukciós, majd 1,5-2%-os fenntartó izoflurán anesztéziának vetettük alá, miközben testhőmérsékletüket automata fűtőpad segítségével 37 °C-on tartottuk. Egy HDI 5000 CV UH-géphez (ATL Ultrasound, Philips, Bothell, WA, USA) kapcsolt 10 MHz-es lineáris fejjel két dimenziós parasternalis hosszú és rövid, valamint a papilláris izmot középen metsző M-módú felvételeket készítettünk, majd ezeket szoftveres kiértékelésnek vetettük alá (HDI Lab, Philips, Bothell, WA, USA).

A következő paramétereket határoztuk meg: BK elülső falvastagság (AWT), BK hátulsó falvastagság (PWT) diasztolében (d) és szisztolében (s), valamint BK végdiasztolés- (LVEDD) és végszisztolés (LVESV) belső átmérő. Minden mérést háromszor hajtottunk végre, eredményeiket átlagoltuk.

A BK-i szívizomtömeget (LV mass) a módosított Devereux-módszer (20) alapján számítottuk: $LV_{mass} (g) = \{[(LVEDD + AWTd + PWTd)]^3 - LVEDD^3\} \times 1,04\} \times 0,8 + 0,14$. A végdiasztolés (LVEDV) és végszisztolés (LVESV) térfogatokat a prolate modell szerint határoztuk meg: $LVEDV = [(3,14/6) \times LVEDD^2] \times L$ (21). A frakcionális rövidülést (FS) és az ejekciós frakciót (EF) a következő képletek alapján számítottuk: $FS = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$ és $EF = (LVEDV - LVESV / LVEDV) \times 100$.

Elektrokardiográfia

Szubkután elhelyezett tüelektródákkal 12 elvezetéses EKG-t regisztráltunk (Mortara Instrument, Milwaukee, WI, USA) (19). Az érzékenységet 10 mm/mV-ra, a futási sebességet 50 mm/s-ra állítottuk. A kiértékelést a II-es elvezetés alapján végeztük, amely során a következő paraméterek kerültek meghatározásra: szívfrekvencia; PQ- és QT-intervallumok, illetve QRS-komplexum hossza. QT-intervallumot a QRS első kitérésétől a T-hullám végéig mértük, és a korrekcióját (QT_c) a Bazett-formula patkányokhoz igazított változatával számoltuk: $[nQT_c = QT / (RR/f)^{1/2}]$ (22).

Invazív hemodinamikai vizsgálat

A kísérleti periódus végén invazív hemodinamikai vizsgálatot hajtottunk végre (16) pentobarbitállal (60 mg/kg, ip.) altatott, tracheotomizált és intubált patkányokon, amelyek testhőmérsékletét fűtőpad segítségével végig 37 °C-on tartottuk. A bal véna jugularis externát folyadék adagolás céljából polietilén katéterrel kanuláltuk, míg a jobb arteria carotis communison egy 2F-s nyomás- és térfogatmérő konduktancia mikrokatétert (SPR-838, Millar Instruments, Houston, Tx, USA) vezetünk az aorta ascendensbe, majd a stabilizációs idő leteltével a bal kamrába. A következő paramétereket határoztuk meg: szisztolés és diasztolés vérnyomás (sBP és dBP), artériás középnyomás (MAP) és BK-i végszisztolés (LVESP) és végdiasztolés (LVEDP) nyo-

másértékek. A hemodinamikai mérések végeztével az állatokat kivézetéssel eutanizáltuk.

Szövettan

A BK-i myocardium darabjait 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A hipertrófia értékelése céljából a BK 5 µm-es, transmuralis, azonos magasságból származó, hematoxillin-eozinnal festett metszetein lemértük és átlagoltuk 100 db longitudinálisan orientált cardiomyocita transnuclearis átmérőjét (CD). A miokardiális fibrózis mértékét picrosirius vörössel festett metszeten szemikvantitatív pontozás segítségével osztályoztuk (0: nincs jelen, 1: enyhe, 2: közepes és 3: súlyos) állatonként 20 véletlenszerűen kiválasztott látótérben.

Immunoblot analízis

Western blotot végeztünk a korábban ismertetett módon (23). BK-i szívizomszövetet homogenizáltunk, majd a fehérje oldatokat gélelektroforézisnek vetettük alá. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk és elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A vizsgált célpontjaink a következők voltak: Connexin-43 (Cx43) L-típusú Ca^{2+} -csatorna Protein $\alpha 1C$ (LTCC) és szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATPáz 2 (SERCA2). A membránokat tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az immunblotokat kemilumineszcens módszerrel (PerkinElmer, Rodgau-Juegesheim; Németország) hívtuk elő és az intenzitásukat a Chemi-smartTM 5100 rendszerrel (Peqlab, Biotechnologie, GmbH, Erlangen, Németország) detektáltuk. A fehérje denzitásokat kvantifikáltuk, a denzitás értékeket GAPDH-ra normalizáltuk és tüntettük fel.

Statisztika

Minden adatot átlagérték \pm SEM formájában adtuk meg. Az adatok normáloszlását Shapiro-Wilk-tesztel ellenőriztük. Normáloszlás esetén, egy utas varianciaanalízist (ANOVA) és Tukey-féle post hoc tesztet hajtottunk végre. Normáloszlás hiányában Kruskal-Wallis és Dunn-tesztet végeztünk. A sorozatos EKG- és UH-vizsgálatok eredményeit csoporton belül ismétléses egy utas ANOVA-val és Tukey-féle post hoc tesztel vizsgáltuk. A különböző paraméterek közti korrelációkat Spearman-tesztel igazoltuk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Az aorta szűkítésének és a szűkület eltávolításának hatása az artériás vérnyomásra

Az aorta abdominalis műtéti beszűkítése szignifikánsan emelkedett BPs-t, BPd-t és MAP-t eredményezett az AB-6hét és AB-12hét csoportokban, míg a szűkület eltávolítása az említett paraméterek csökkenését idézte elő a Debanded állatoknál (1. táblázat).

1. TÁBLÁZAT. A vizsgálati csoportok alapparaméterei

	Sham 6. hét	Sham 12. hét	AB 6. hét	AB 12. hét	Debanded 12. hét
HW (g)	1,25±0,02	1,54±0,05	2,08±0,10*	2,49±0,07**	1,70±0,08 [#]
HW/TL (g/cm)	0,31±0,01	0,35±0,01	0,50±0,02*	0,57±0,02**	0,38±0,02 [#]
LW (g)	1,49±0,06	1,83±0,03	1,82±0,06	2,12±0,19	1,90±0,05
LW/TL (g/cm)	0,37±0,02	0,41±0,01	0,44±0,01	0,48±0,04	0,43±0,01
SBP (Hgmm)	144±3	143±5	224±8*	201±9*	173±5 ^{**#}
DBP (Hgmm)	117±2	118±3	158±4*	153±5*	135±3 ^{**#}
MAP (Hgmm)	126±2	126±3	180±4*	171±6*	148±3 ^{**#}
LVESP (Hgmm)	133,4±5,9	121,0±7,4	195,8±8,5*	184,0±7,7*	166,0±3,8 ^{**}
LVEDP (Hgmm)	4,5±0,6	5,5±0,6	5,8±1,0	8,2±1,4	5,6±0,4

Rövidítések: AB, aorta szűkített; DBP, diasztolés vérnyomás; HW/TL szívtömeg/tibiahossz; LVEDP, bal kamrai végdiasztolés nyomás; LVESP, bal kamrai végszisztolés nyomás; LW/TL, tüdőtömeg/tibiahossz; MAP, artériás középnyomás; SBP, szisztolés középnyomás. Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtunk meg. *p<0,05 vs. azonos korú Sham, **p<0,05 vs. AB-6hét, [#]p<0,05 vs. AB-12hét.

Miokardiális remodelláció és a nyomásterhelés megszüntetése által indukált reverz remodelláció

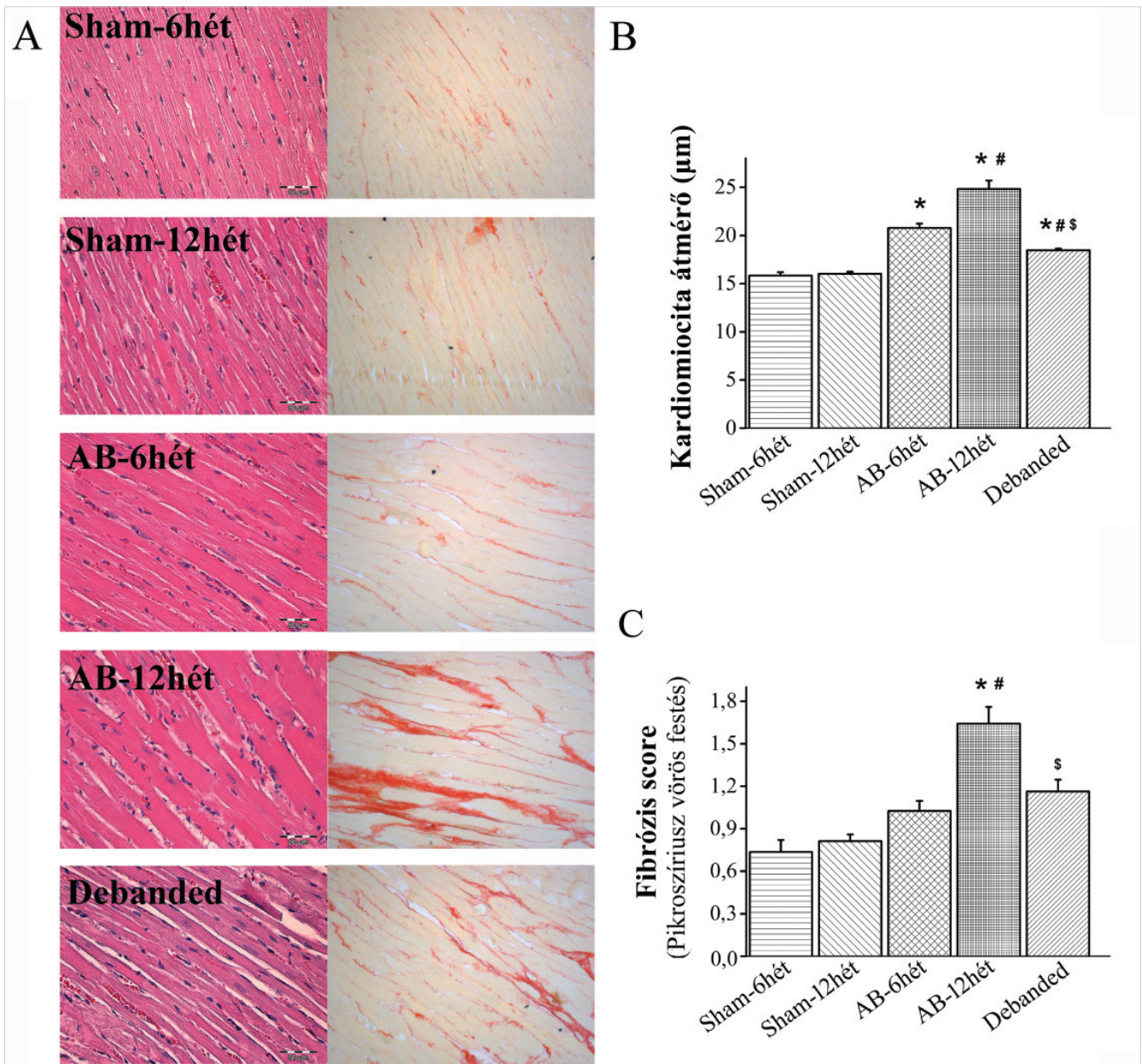
Az AB-csoportokban a BKH fennállását az ultrahanggal mért BK-i tömegindexek már a 3. hét leteltével igazolták (2. táblázat). Ezt a 6. héten megfigyelt CD és

HW/TL arányok is alátámasztották (1. táblázat; 1. A, B és 3B ábrák). Ellenben a picosirius-festett metszeten nem találtunk különbséget a miokardiális fibrózist illetően a 6 hetes aortaszűkített csoportban (1. A és C ábrák). A 6. hét után a szívizom-hipertrófiára funkcionális szempontból kompenzált stádium volt jellemző,

2. TÁBLÁZAT. Szívuultrahang-paraméterek változásai a szívizom-hipertrófia kialakulása és visszafejlődése során

		Sham (n=10)	AB (n=14)	Debanded (n=11)
3. hét	Testtömeg (g)	370±8	354±5	350±11
	LV mass index (g/kg)	2,6±0,1	4,5±0,2*	4,9±0,2*
	LVEDV (μl)	441,8±19,8	412,2±16,0	471,6±20,9
	LVESV (μl)	133,3±9,7	113,5±7,3	138,1±11,2
	FS (%)	39,4±1,3	43,8±1,3	42,1±1,3
	HR (ütés/min)	341±13	357±7	358±9
6. hét	Testtömeg (g)	467±7 [†]	450±11 [†]	471±17 [†]
	LV mass index (g/kg)	2,8±0,1	4,7±0,1*	4,4±0,2*
	LVEDV (μl)	605,6±24,5 [†]	628,5±19,8 [†]	625,3±28,4 [†]
	LVESV (μl)	198,6±7,3 [†]	223,2±21,5 [†]	201,3±13,4 [†]
	FS (%)	38,7±1,3	38,0±1,8	39,8±1,2
	HR (ütés/min)	337±10	363±12	355±13
9. hét	Testtömeg (g)	527±9 ^{††}	518±14 ^{††}	482±14 [†]
	LV mass index (g/kg)	2,5±0,1 [†]	4,6±0,2*	3,3±0,2 ^{††}
	LVEDV (μl)	618,7±14,6 [†]	708,3±36,6 ^{††}	619,8±29,5 [†]
	LVESV (μl)	197,8±11,4 [†]	350,1±34,1 ^{**††}	210,6±14,1 ^{#†}
	FS (%)	40,3±1,4	28,2±1,6 ^{**††}	38,6±1,1 ^{#†}
	HR (ütés/min)	339±15	353±8	331 ±9
12. hét	Testtömeg (g)	569±10 ^{††§}	556±13 ^{††§}	542±17 ^{††§}
	LV mass index (g/kg)	2,5±0,1	4,2±0,2 ^{**§}	2,9±0,1 ^{#†§}
	LVEDV (μl)	653,0±18,1 [†]	759,6±38,9 ^{††}	657,1±26,1 ^{††}
	LVESV (μl)	207,96±12,2 [†]	404,6±40,2 ^{**††}	208,2±16,1 ^{#†}
	FS (%)	39,6±1,3	25,3±1,7 ^{**††}	39,9±1,3 [#]
	HR (ütés/min)	328±14	366±9	363±11

Rövidítések: FS, frakcionális rövidülés; HR, szívfrekvencia; LVEDV, bal kamrai végdiasztolés volumen; LVESV, bal kamrai végszisztolés volumen; LV mass index, bal kamrai tömegindex. Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtunk meg. *p<0,05 vs. Sham, [†]p<0,05 vs. AB, ^{††}p<0,05 vs. 3 hetes, ^{†††}p<0,05 vs. 6 hetes, [§]p<0,05 vs. 9 hetes.

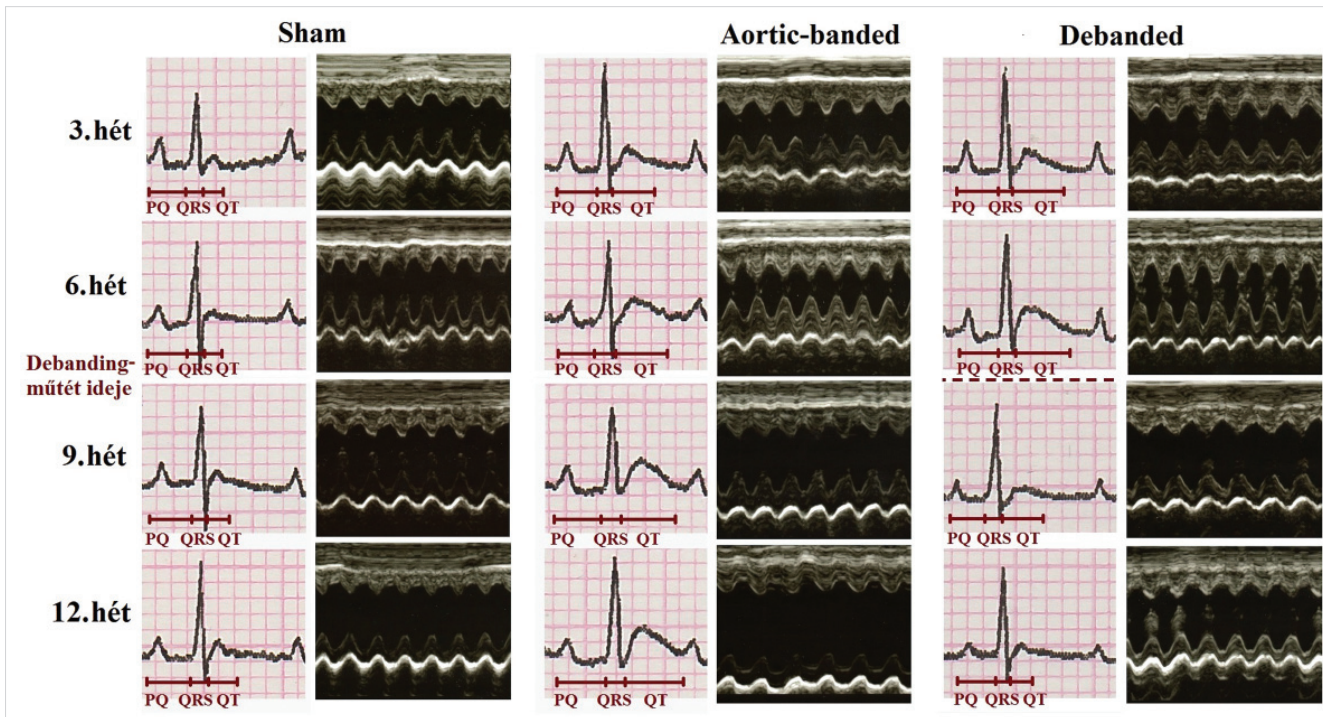


1. ÁBRA. Miokardiális remodelláció és nyomásterhelés megszüntetése által indukált reverz remodelláció. A 6 és 12 hetes aortaszűkített csoportjainkban a BKH fennállását a cardiomyocita átmérő (CD) emelkedett értéke jelezte (A, B), amely szignifikáns mértékben csökkent nyomásterhelés megszüntetését követően (A, B). Továbbá a 12 hetes aortaszűkített csoportban jelentős mértékű miokardiális fibrózissal volt kimutatható. A nyomásterhelés megszüntetése ugyanakkor eredményesen csökkentette a kollagén intersticiális felhalmozódását is (A, C). A reprezentatív képek (a) hematoxillin-eozin- és picrosirius-festett metszetekről készültek 20-szoros nagyítással. A jelzőskála 50 µm-es. Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtunk meg. *p<0,05 azonos korú Sham, #p<0,05 vs. AB-6hét, §p<0,05 vs. AB-12 hét

amelyet a megtartott EF- és FS-értékek igazoltak (2. táblázat, 1. A és 1. C ábrák).

A szívfunkció romlása a 9. héten kezdődött, és ez a 12. hétre további romlást mutatott. A kísérleti periódus végéhez közelítve az AB-12hét csoportban az EF és a FS szignifikáns csökkenését, valamint LVESV jelentős növekedését mutattuk ki az AB-6hét csoporthoz viszonyítva (2. táblázat és 3. D ábra). Emellett a 12 hetes aortaszűkített csoportban az LVmass, CD, HW/TL arány és a miokardiális fibrózis szignifikáns emelkedé-

sét észleltük, akár a kontrollcsoport akár az AB-6hét csoport értékeihez hasonlítva (1. táblázat, 1. A–C ábrák). Továbbá a LVEDP és a LW/TL arány értékeiben egy erős növekvő tendencia volt megfigyelhető az AB-12hét csoportban. A nyomásterhelés megszüntetése a Debanded csoportban az AB-12hét csoporthoz képest szignifikáns mértékben csökkentette az LVmass, CD, HW/TL arány értékeit (1. táblázat; 1.A, B és 3. B ábrák) és védett az intersticiális kollagén felhalmozódással szemben is (1. A és C ábrák). A szűkület eltávolítása



2. ÁBRA. A BKH kialakulásának és visszafejlődésének folyamatát szemléltető reprezentatív elektrokardiográfias és echokardiográfias felvételek. A BKH kialakulásának és visszafejlődésének morfológiai, funkcionális és elektromos eltéréseit szemléltető reprezentatív M-módú, a papilláris izmokat a középső síkban metsző szívultrahang és II-es elvezetésű EKG-felvételek

továbbá megelőzte a szívfunkció fokozatos hanyatlását (2. táblázat és 3. D ábra).

Az elektromos remodelláció és reverz remodelláció elektrokardiográfias karakterizációja

Az aortaszűkített állatoknál már a harmadik hét leteltével a QT-intervallum szignifikáns mértékű megnyúlását tapasztaltuk, ami a kísérleti periódus végéig tovább fokozódott (2. és 3. A ábrák). A QT-intervallum megnyúlása erős korrelációt mutatott az LVmass (4. A ábra), a CD ($r=0,6332$; $p=0,0001$) és a HW/TL arány értékeivel ($r=0,8864$; $p=0,0001$). A PQ-intervallum megnyúlása a 9. héttől vált megfigyelhetővé és mértéke szignifikáns összefüggést mutatott az EF (4. B ábra), a FS ($r=-0,2874$; $p=0,0006$), és az LW/TL arány értékeivel ($r=0,2889$; $p=0,0441$). A QRS-komplexum kiszélesedését mind az AB-6hét és AB-12hét csoportnál tapasztaltuk (2. és 3. E ábra), ami jól korrelált a miokardiális fibrózis mértékével (4. C ábra), azonban a Cx43 expressziójával nem (Spearman $r=-0,04027$; $p=0,8327$). A nyomásterhelés megszüntetése az említett paraméterek (QT, PQ, QRS) szempontjából jelentős védő hatást biztosított (2–3. ábrák).

Az elektromos remodelláció és reverz remodelláció háttérben megfigyelhető fehérje expressziós változások

A western blot vizsgálat erős csökkenő tendenciát mutatott a Cx43 fehérje expressziójában mind az AB-6hét

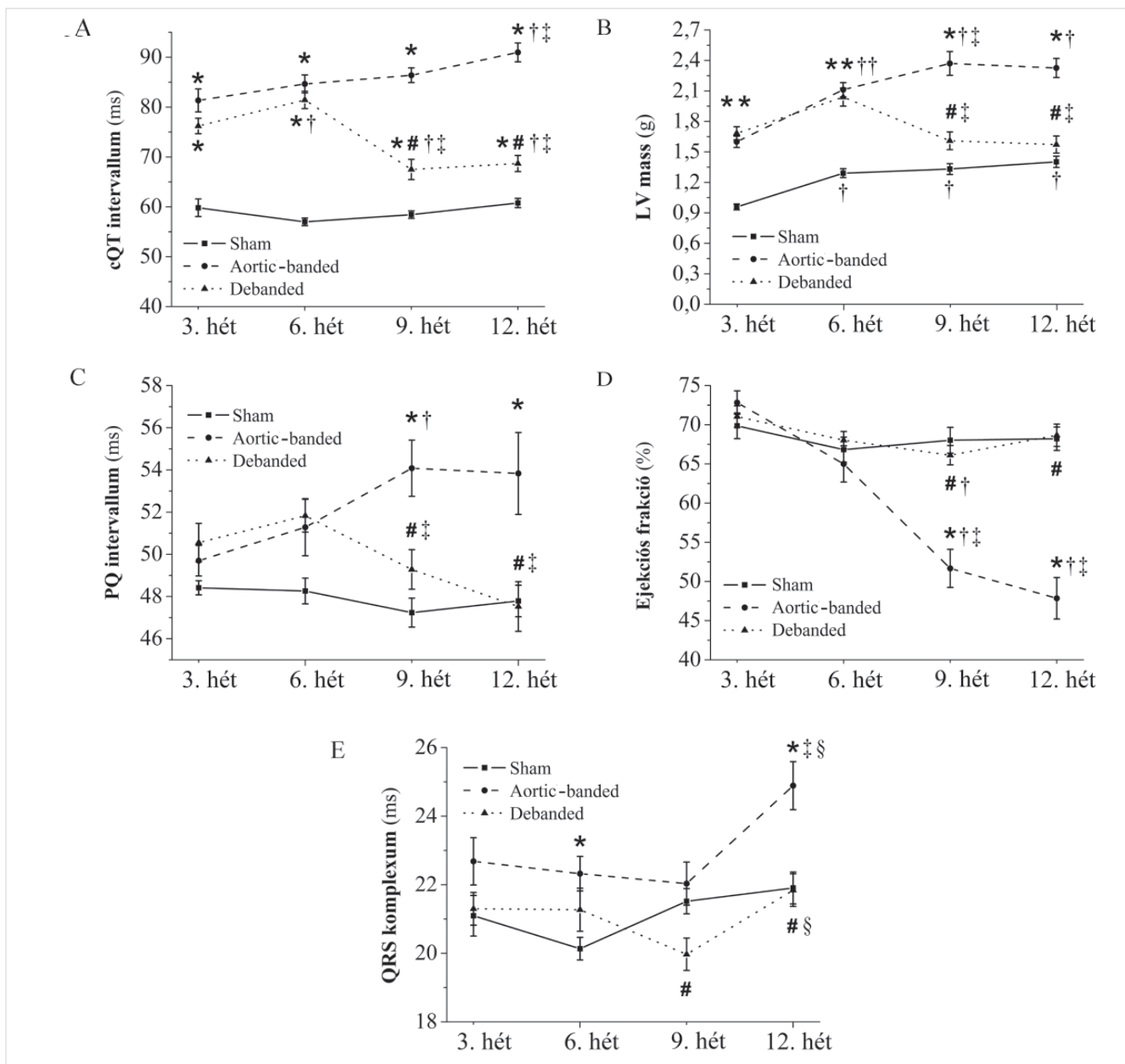
mind az AB-12hét csoportokban. A Debanded csoportban a Cx43 fehérje miokardiális szintje a kontrollcsoportok értékeihez tért vissza (5. A ábra). Az LTCC expressziója változatlan maradt minden kísérleti csoportban (5. B ábra). Ezzel szemben a hosszan fennálló nyomásterhelés következtében a 6 és 12 hetes aortaszűkített csoportokban tendenciálisan csökkent SERCA2-expresszió volt kimutatható, mely fehérje expressziója ugyanakkor a Debanded-csoportban a kontroll állatokra jellemző értékhez közelített (5. C ábra).

Megbeszélés

Jelen patkánykísérletünkben célunk volt a BKH kialakulásának és visszafejlődésének elektrokardiográfiával történő karakterizációja, valamint a reverz elektromos remodelláció háttérben meghúzódó elváltozások egyidejű azonosítása. Tudomásunk szerint ez az első vizsgálat, amely e kór állapotban az EKG-n tapasztalható eltérések és a sejtszintű-, illetve funkcionális változások közötti kapcsolatot vizsgálja.

A nyomásterhelés megszüntetése a BKH visszafejlődésével párhuzamosan helyreállította a megnyúlt QT intervallumot

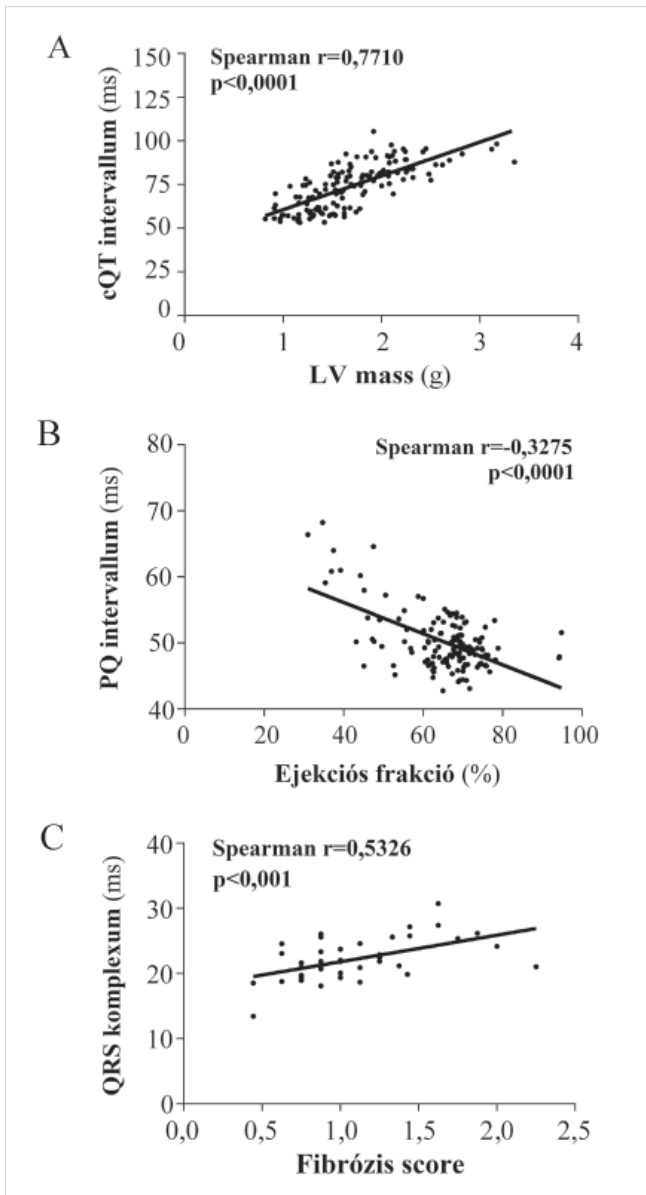
A BKH-t kísérő leggyakoribb elektrofiziológiai eltérés az AP megnyúlása (4). Az AP időtartamának növekedése az EKG-n megnyúlt QT-intervallum formájában



3. ÁBRA. A BKH kialakulásának és visszafejlődésének folyamatát szemléltető reprezentatív elektrokardiográfiás és echokardiográfiás felvételek. A BKH kialakulásának és visszafejlődésének morfológiai, funkcionális és elektromos eltéréseit szemléltető reprezentatív M-módú, a papilláris izmokat a középső síkban metsző szívultrahang és II-es elvezetésű EKG-felvételek. A krónikus nyomásterhelés hatására a cQT és az LVmass értékei már a kísérleti időtartam 3. hetére szignifikáns mértékű növekedést mutattak. Ezen értékekben a 6., 9. és 12. hétre további növekedés volt megfigyelhető (A, B). Ezzel szemben a PQ megnyúlása és az EF csökkenése csak a 9. héten jelent meg (C, D). Végül a QRS kiszélesedése a 6. hét után vált egyértelművé (E). Az LVmass a bal kamrai tömeget jelöli. Minden értéket átlag±standard hiba formájában adtunk meg. *p<0,05 vs. Sham, #p<0,05 vs. AB, †p<0,05 vs. 3 hetes, ‡p<0,05 vs. 6 hetes, §p<0,05 vs. 9 hetes

manifesztálódik, amelynek megjelenése a korábbi kísérletes eredmények alapján szoros korrelációt mutat a BKH kialakulásával (24, 25). Kísérletünkben a fokozott nyomásterhelés hatására a műtétet követően már a 3. héten jelentős mértékű BKH volt kimutatható, amely együtt járt a cQT-intervallum megnyúlásával (2., 3., 4. A ábra). A kialakult szívizom-hipertrófia a 6. a 9. és a 12. hétre további progresszió mutatott, amelyet a szig-

nifikánsan növekedett LVmass, HW/TL és CD-értékei igazoltak (1. táblázat; 1. A, B, 3. B ábrák). A BKH súlyosbodása a QT-intervallum további hosszabbodását vonta maga után (2., 3.A ábra). A BKH-ban megfigyelhető QT-intervallum megnyúlás hátterében a kifelé irányuló K⁺-áramok csökkenése és a befelé irányuló Ca²⁺-áram növekedése által előidézett meghosszabbodott repolarizációs idő állhat (4, 6).



4. ÁBRA. Az EKG-eltérések és a morfológiai, illetve funkcionális változások között megfigyelt korrelációk a BKH kialakulása és visszafejlődése során.

A bal kamrai szívizomtömegben (LVmass) megfigyelt növekvő értékek erős korrelációt mutattak a cQT-intervallum megnyúlásával (A). Fordított összefüggést találtunk az EF és a PQ-intervallum értéki között (B). Végül a miokardiális fibrózis mértéke a QRS szélességével korrelált (C). Az LVmass a bal kamrai izomtömeget jelöli

A kóréletten az AP-hosszát a repolarizációs periódus hosszától teszi függővé, amely a két antagonist ionáram egymáshoz viszonyított állapota által meghatározott. A kifelé irányuló K^+ -áram ugyanis a szarkolemma gyors repolarizációjához vezet, amelyet a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák nyílása azonnal ellensúlyoz (26). Az így létrejövő egyensúlyi állapotoknak végül a K^+ -csatornák javára bekövetkező eltolódás vet véget, amely következtében a repolarizáció teljessé válik. Ezekből következik, hogy a két említett ionáram precíz

szabályozása szükséges a fiziológias QT-intervallum fenntartásához.

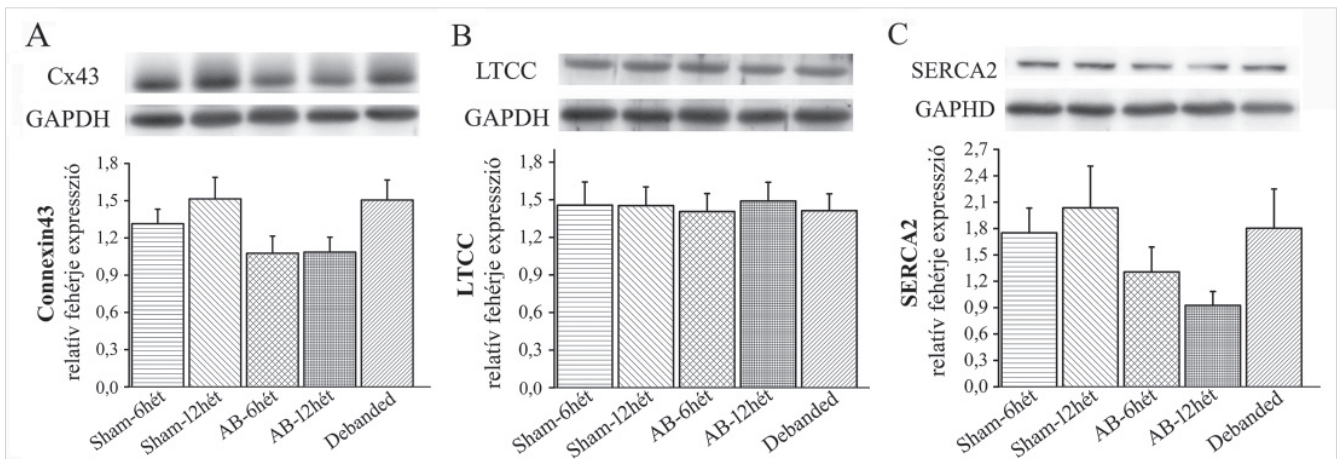
A Ca^{2+} -csatornában bekövetkező fehérje-expressziós változásokat illetően BKH és szívelégtelenség fennállása esetén megosztottak a tudományos vélemények. A nehézséget az okozza, hogy a BKH súlyossági fokától függően egyaránt jelentették az LTCC expressziójának növekedését (27), változatlanosságát (27), illetve csökkenését (28) is. Humán szívelégtelen szívizom-mintákon végzett vizsgálatok megtartott Ca^{2+} -áramot találtak a miokardiális LTCC kifejeződésének csökkenése ellenére, amit a csatorna fokozott foszforilációjával magyaráztak (28). Rágcsálókban a Ca^{2+} -homeosztázisért felelős fehérjék megváltozott expresszióját azonosították a BKH-ban fennálló fokozott befelé irányuló Ca^{2+} -áram fő okaként (4). Hipotézisük szerint a SERCA2 expressziójának csökkenése közvetett módon hozzájárul az LTCC fokozott aktivitásához BKH fennállása esetén. A SERCA2 csökkenése ugyanis csökkent Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} -felszabaduláshoz vezet a szarkoplazmás retikulumból, amely következtében a citoplazma lokális Ca^{2+} -koncentráció alacsony marad és így az LTCC csatorna Ca^{2+} -függő inaktivációja lassúbbá válik. Vizsgálatunkban az LTCC expressziója változatlan maradt a BKH kialakulásának ellenére (5. B ábra). Azonban a SERCA2 kifejeződése erős tendenciát mutatott a csökkenés irányába (5. C ábra), ami tehát indirekt módon a mi modellünkben is hozzájárulhatott a QT-intervallum megnyúlásához.

Ugyanakkor a szűkület eltávolítása a Debanded csoportban az LVmass, a HW/TL és a CD értékeket szignifikáns mértékben csökkentette, igazolva ezáltal a BKH regresszióját (1. táblázat, 1. A, B és 3. B ábrák). A hipertrófia visszafejlődéséhez a QT-intervallum rövidülése társult (2., 3. A ábrák), amelynek háttérében a SERCA2-fehérje expressziója által mutatott erős növekedő tendencia is állhat (5. C ábra).

A nyomásterhelés megszüntetése védett a szív funkcionális dekompenzációjával szemben és meggátolta a PQ-intervallum megnyúlását.

Vizsgálatunkban a QT-intervallummal ellentétben a PQ-intervallum megnyúlása nem követte a szívizom-hipertrófia növekedésének mértékét, ellenben korrelált a szívfunkció romlásával (4. B ábra). Eredményeinkkel összhangban, csökkent balkamra-funkcióval rendelkező, pangásos szívelégtelenségben szenvedő nyulakon végzett korábbi vizsgálatok az pitvar-kamrai junction megnyúlásáról, bizonyos ioncsatornák expressziós szintű változásairól és következményesen a PR-intervallum megnyúlásáról számolnak be (12).

Aortaszűkített állatainkban a pumpafunkció romlását a 9. hét elteltével az EF és a FS szignifikáns csökkenése jelezte (2. táblázat, 3. B ábra). Emellett a LVEDP és LW/TL hányados értékeiben megfigyelt növekvő tendencia bizonyítékul szolgált a diasztolés diszfunkció és a visszaható szívelégtelenség fennállására. A szívfunkció romlását jelző paraméterek (csökkent EF, FS és növe-



5. ÁBRA. A reverz elektromos remodelláció során megfigyelt fehérje-expressziós változások. A Cx43 immunblot analízise a 6 és 12 hetes aortaszűkített csoportban tendenciális csökkenést mutatott (A). Az LTCC expresszió mértéke az összes kísérleti csoportban változatlan maradt (B). Ugyanakkor a SERCA 2 fehérje szintjében a 6 és 12 hetes aortaszűkített csoportokban jelentős csökkenést tapasztaltunk, bár ezen változások mértéke sem érte el a statisztikai szignifikancia határát (C). A nyomásterhelés megszüntetése eredményesen előzte meg az említett fehérje-expressziós eltéréseket (A–C). A Cx43 a Connexin43-t, az LTCC az L-típusú Ca²⁺-csatorna fehérje α 1C-t, a SERCA2 a szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca²⁺-ATPáz 2-t jelöli. Minden adatot átlagérték±SEM formájában adtuk meg. *p<0,05 vs. Sham, #p<0,05 vs. AB-6hét, §p<0,05 vs. AB-12hét.

kedett LW/TL hányados) szoros összefüggést mutattak a PQ-távolság megnyúlásával, amely szintén a 9. héttől vált megfigyelhetővé. Ebből kifolyólag feltételezhetjük, hogy kisállat-modellünkben a csökkent bal kamrai teljesítmény miatt másodlagosan megnövekedett bal pitvari nyomásterhelés hozzájárulhatott a PQ-intervallum megnyúlásához.

Ugyanakkor a nyomásterhelés megszüntetése eredményesen előzte meg a BK funkcionális romlását és meggátolta a PQ-intervallum meghosszabbodását (3. C, D ábrák és 2. táblázat).

A nyomásterhelés megszüntetése megelőzte a QRS-komplexum kiszélesedését, csökkentette a miokardiális fibrózis mértékét és helyreállította a Cx43 expresszióját

A széles QRS-komplexum a súlyosan szívelégtelen betegek gyakran diagnosztizált EKG eltérése (9), amely a halálozás pontos előrejelzőjének bizonyult (29). A QRS-komplexum kiszélesedésének hátterében a kamrák elektromos vezetőképességének lassulása áll. Az elektromos impulzus szívizomsejtek közti továbbítását fysiológias körülmények fennállása esetén a következő két tényező biztosítja.

Az optimális ingerületvezetéshez egyrészt szükség van az egyes szívizomsejteket összekötő interkalált lemezekben található kis ellenállású intercelluláris ioncsatornák megfelelő denzitására, amelyek felépítésében a Cx43 fehérje kitüntetett szerepet játszik (30). Ebből adódóan a Cx43 szerepe a szívelégtelenség talaján kialakuló aritmiákban intenzív kutatások tárgyát képezi. Expressziójának csökkenését számos különböző etiológiájú szívelégtelen beteg szívéből származó mintán kimutatták (31, 32). Ugyanakkor kompenzált BKH-ban megtartott vagy akár fokozott Cx43 fehérje-expressziót

írtak le (31). Mindemellett aortaszűkített patkányokon végzett kísérletekben a Cx43 kóros, egyenlő sejtfelületi eloszlását találták, ami az interkalált lemezekben csökkent koncentrációt eredményezett (33). A mi kísérletünkben a Cx43 szívizomszöveti expressziójának erősen csökkenő tendenciáját találtuk a 6. és 12. héten, bár ez nem érte el a szignifikancia küszöbét (5. A ábra). Másrészt a szívizomsejtek közti kapcsolatot az intersticiális fibrózis mértéke is befolyásolja (3). Bár a kollagén struktúra adja a szív vázát, az extracelluláris mátrix túlzott felhalmozódása a sejtek közti kapcsolat zavarát idézheti elő, ami károsodott ingerületvezetést eredményezhet (10). Vizsgálatunkban a fokozott nyomásterhelés hatására csak a 12. hét elteltével találtunk jelentősen fokozott miokardiális fibróziót.

Állatainkban a Cx43 expressziója nem, viszont a kollagén felhalmozódás mértéke szignifikáns korrelációt mutatott a QRS-komplexum kiszélesedésével. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy kísérletünkben a miokardiális fibrózis növekedése járult hozzá leginkább a megfigyelt QRS-kiszélesedéshez.

Másrészről a nyomásterhelés megszüntetése megelőzte a myocardium fibrotikus elváltozásait (1. A, C ábrák) és visszaállította a Cx43 expresszióját, ami együttesen védelmet biztosított a QRS-komplexum kiszélesedése ellen, és megtartotta a normális vezetést.

Következtetések

Vizsgálatunkban a fokozott nyomásterhelés kiváltotta BKH-t a QT- és PQ-intervallumok megnyúlása és a QRS-komplexum kiszélesedése jellemezték. Az EKG-eltérések a BKH kifejlődésének funkcionálisan különböző stádiumaiban jelentek meg, amelyek hátte-

rében egyedi patomechanizmusokat azonosítottunk. A QT-intervallum megnyúlása jól korrelált a szívizom-hipertrófia kialakulásával, így már annak kompenzált stádiumában is jelen volt. A QT-intervallum megnyúlása mögött a SERCA2 szívizomszöveti kifejeződésének csökkenését azonosítottuk, mint fő molekuláris mechanizmust. A PQ-intervallum meghosszabbodása továbbá összefüggést mutatott a BKH funkcionális dekompenzációjával. Mindemellett kimutattuk, hogy a QRS kiszélesedéséért elsősorban a miokardiális fibrózis fokozódása, és nem a Cx43 expressziójának csökkenése tehető felelőssé.

A nyomásterhelés megszüntetése ugyanakkor maga után vonta a BKH szignifikáns regresszióját és a SERCA2 expressziójának helyreállítását, amely folyamatok együtt jártak a QT-intervallum megrövidülésével. Továbbá a nyomásterhelés megszüntetése megőrizte a BK funkcionalitását és ez által védett a PQ-intervallum megnyúlásával szemben is. Végül a csökkent miokardiális fibrózis és a fokozott Cx43 expresszió kivédte a QRS kiszélesedését is.

Limitációk

Vizsgálatainkat kizárólag fiatal hím patkányokon végeztük. Így további kutatások szükségesek a kor és a nem befolyásoló hatásának, illetve a fajok közti esetleges különbségek tisztázására.

Bár az elektrofiziológiai fundamentumok közősek a patkányok és emberek közt, bizonyos különbségek, úgymint a magasabb szívfrekvencia, rövidebb AP-időtartam, és a repolarizációért felelős K^+ -csatornák eltérő eloszlása, struktúrája és funkciója, említést érdemelnek.

Annak ellenére, hogy az AB a nyomásterhelés okozta BKH elfogadott modellje, az abdomiális aorta műtéti beszűkítése következtében a vesék hipoperfúziója alakulhat ki, ami a renin–angiotenzin–aldoszteron-rendszer aktiválódásával, így volumenretencióval járhat (34). Tehát nem zárható ki, hogy a modellünkben kifejlesztett BKH-hoz volumenterhelés is hozzájárult.

Bemutatott kísérletes eredményeink direkt átültetése a klinikai gyakorlatba a fentebb ismertetett különbségek miatt nem lehetséges. Ugyanakkor vizsgálatunk olyan fontos összefüggésekre világít rá a reverz elektromos remodelláció során, mely megfigyelések alapjául szolgálhatnak további humán vizsgálatoknak.

Köszönetnyilvánítás

Jelen munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH (NVKP-16-1-2016-0017, „Nemzeti Szívprogram”); az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-I-6-SE kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja (R.M.), a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (R.T.), a Baden-Württemberg tartomány és a Ruprecht-Karls Egyetem Orvostudományi kara (SK-I); támogatta. Elismerés illeti Patricia Kraft, Tobias Mayer, Karin Sonnenberg, Lutz Hoffmann és Gregor Viktória munkáját.

Irodalom

- Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Li S, Merkely B, Karck M, Radovits T, et al. Reverse electrical remodeling following pressure unloading in a rat model of hypertension-induced left ventricular myocardial hypertrophy. *Hypertens Res* 2017; 40: 637–645. doi: 10.1038/hr.2017.1
- McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1987; 317: 787–792. doi: 10.1056/NEJM198709243171302
- Wolk R. Arrhythmogenic mechanisms in left ventricular hypertrophy. *Europace* 2000; 2: 216–223. doi: 10.1053/eupc.2000.0110
- Ahmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, et al. Changes in Ca^{2+} cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2000; 86: 558–570. doi: 10.1161/01.RES.86.5.558
- Teunissen BE, Jongsma HJ, Bierhuizen MF. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodeling. *Eur Heart J* 2004; 25: 1979–1989. doi: 10.1016/j.ehj.2004.08.007
- Tomita F, Bassett AL, Myerburg RJ, Kimura S. Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 75: 296–303. doi: 10.1161/01.RES.75.2.296
- Guo W, Li H, London B, Nerbonne JM. Functional consequences of elimination of $I_{(to,f)}$ and $I_{(to,s)}$: Early after depolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking $Kv1.4$ and expressing a dominant-negative $Kv4$ alpha subunit. *Circ Res* 2000; 87: 73–79. doi: 10.1161/01.RES.87.1.73
- Hill JA. Hypertrophic reprogramming of the left ventricle: Translation to the ECG. *J Electrocardiol* 2012; 45: 624–629. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2012.08.003
- Kashani A, Barold SS. Significance of QRS complex duration in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 2183–2192. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.071
- Tanaka-Esposito C, Varahan S, Jeyaraj D, Lu Y, Stambler BS. Eplerenone-mediated regression of electrical activation delays and myocardial fibrosis in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014; 25: 537–544. doi: 10.1111/jce.12390
- Wang Z, Kutschke W, Richardson KE, Karimi M, Hill JA. Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: Role of calcineurin. *Circulation* 2001; 104: 1657–1663. doi: 10.1161/hc3901.095766
- Nikolaidou T, Cai XJ, Stephenson RS, Yanni J, Lowe T, Atkinson AJ, et al. Congestive heart failure leads to prolongation of the PR interval and atrioventricular junction enlargement and ion channel remodeling in the rabbit. *PLoS One* 2015; 10: e0141452. doi: 10.1371/journal.pone.0141452
- Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Feng XH, Sheppard K, Dart A, et al. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2005; 288: H2702–2707. doi: 10.1152/ajp-heart.00836.2004
- Ruppert M, Korkmaz-Icoz S, Li S, Nemeth BT, Hegedus P, Brlecic P, et al. Myocardial reverse remodeling after pressure unloading is associated with maintained cardiac mechano-energetics in a rat model of left ventricular hypertrophy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2016; 311: H592–603. doi: 10.1152/ajpheart.00085.2016
- Rials SJ, Wu Y, Ford N, Pauletto FJ, Abramson SV, Rubin AM, et al. Effect of left ventricular hypertrophy and its regression on ventricular electrophysiology and vulnerability to inducible arrhythmia in the feline heart. *Circulation* 1995; 91: 426–430. doi: 10.1161/01.CIR.91.2.426
- Olah A, Nemeth BT, Matyas C, Hidi L, Lux A, Ruppert M, et al. Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences

- of in vivo hemodynamics. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2016; 310: H587–597. doi: 10.1152/ajp-heart.00588.2015
17. Nemeth BT, Matyas C, Olah A, Lux A, Hidi L, Ruppert M, et al. Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. *Sci Rep* 2016; 6: 37166. doi: 10.1038/srep37166
18. Kim HL, Kim YJ, Kim KH, Lee SP, Kim HK, Sohn DW, et al. Therapeutic effects of udenafil on pressure-overload cardiac hypertrophy. *Hypertens Res* 2015; 38: 597–604. doi: 10.1038/hr.2015.46
19. Korkmaz-Icoz S, Atmanli A, Radovits T, Li S, Hegedus P, Ruppert M, et al. Administration of zinc complex of acetylsalicylic acid after the onset of myocardial injury protects the heart by upregulation of antioxidant enzymes. *J Physiol Sci* 2016; 66: 113–125. doi: 10.1007/s12576-015-0403-6
20. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450–458. doi: 10.1016/0002-9149(86)90771-X
21. Pombo JF, Troy BL, Russell RO, Jr. Left ventricular volumes and ejection fraction by echocardiography. *Circulation* 1971; 43: 480–490. doi: 10.1161/01.CIR.43.4.480
22. Kmecova J, Klimas J. Heart rate correction of the QT duration in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 641: 187–192. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.05.038
23. Korkmaz-Icoz S, Vater A, Li S, Lehner A, Radovits T, Hegedus P, et al. Mild type 2 diabetes mellitus improves remote endothelial dysfunction after acute myocardial infarction. *J Diabetes Complications* 2015; 29: 1253–1260. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.06.012
24. Boulaksil M, Noorman M, Engelen MA, van Veen TA, Vos MA, de Bakker JM, et al. Longitudinal arrhythmogenic remodeling in a mouse model of longstanding pressure overload. *Neth Heart J* 2010; 18: 509–515.
25. Klimas J, Kruzliak P, Rabkin SW. Modulation of the qt interval duration in hypertension with antihypertensive treatment. *Hypertens Res* 2015; 38: 447–454. doi: 10.1038/hr.2015.30
26. Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci* 2011; 121: 11–30. doi: 10.1093/toxsci/kfr021
27. Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, et al. Increased availability and open probability of single I-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 1998; 98: 969–976. doi: 10.1161/01.CIR.98.10.969
28. Chen X, Piacentino V, 3rd, Furukawa S, Goldman B, Margulies KB, Houser SR. L-type Ca^{2+} channel density and regulation are altered in failing human ventricular myocytes and recover after support with mechanical assist devices. *Circ Res* 2002; 91: 517–524. doi: 10.1161/01.RES.0000033988.13062.7C
29. Iuliano S, Fisher SG, Karasik PE, Fletcher RD, Singh SN, Department of Veterans Affairs Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart F. Qrs duration and mortality in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 2002; 143: 1085–1091. doi: 10.1067/mhj.2002.122516
30. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 228–232. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013
31. Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 426–436. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.010
32. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, et al. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem* 2003; 242: 135–144. doi: 10.1023/A:1021154115673
33. Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, et al. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: Prevention by angiotensin ii type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 219–231. doi: 10.1006/jmcc.2000.129
34. Massart PE, Donckier J, Kyselovic J, Godfraind T, Heyndrickx GR, Wibo M. Carvedilol and lacidipine prevent cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene overexpression after aortic banding. *Hypertension* 1999; 34: 1197–1201. doi: 10.1161/01.HYP.34.6.1197

