

Az elmúlt pályázati periódus fő célkitűzése a myocardium szív ciklus alatt bekövetkező  $Ca^{2+}_i$  változásainak valós idejű nyomonkövetése, és az intracelluláris  $Ca^{2+}_i$  homeosztázisban szerepet játszó szabályozási mechanizmusok részletes vizsgálata volt, az in vivo-hoz közel álló körülmények között. A  $Ca^{2+}_i$  homeosztázisban számos csatorna illetve transzport fehérje vesz részt. Ezek individuális szerepe az intracelluláris  $Ca^{2+}_i$  mozgásokban direkt módon nem vizsgálható, így célul tűztük ki egy olyan modell kidolgozását, amely lehetővé teszi az intracelluláris  $Ca^{2+}_i$  mozgásokban kulcsszerepet játszó szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz (SERCA2a) és rianodin csatornák (RyR2) kinetikai vizsgálatát.

További célkitűzésünk volt, hogy a megismert törvényszerűségeket patológiás körülmények között is tanulmányozzuk. Különböző etiológiájú akut és krónikus szívelégtelenségben a  $Ca^{2+}_i$  ciklikus változásainak változásai nem ismertek, így azok vizsgálata lehetőséget kínál potenciális terápiás stratégiák kidolgozására.

## I. A $Ca^{2+}_i$ tranziens kvantitatív analízise

Az általunk kidolgozott modell a rianodin csatorna és a SERCA2a működését írja le, és magában foglalja az intracelluláris kalcium pufferek kötési tulajdonságait is. A modell segítségével szimulálható a  $Ca^{2+}_i$  tranziens egy adott szív ciklus alatt. A kísérleteket izolált patkány szíveken végeztük. Jól ismert, hogy ebben a speciesben – és más kis rágcsálókban – az intracelluláris  $Ca^{2+}_i$  mozgások cca. 92 %-ért a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő felszabadulás, illetve az oda történő szekvesztráció a felelős. Ezért a modell a cardiomyocytát egy kompartmentűnek tekinti és minimális számú paramétert használ, így a modell a sarcolemmális L-csatornát és a  $Na^+/Ca^{2+}$  kicserélőt sem tartalmazza. A  $Ca^{2+}_i$  ciklikus változásait – csakúgy mint minden további kísérletünkben – felszíni fluorimetriásan, indo 1-AM feltöltés után határoztuk meg. A modell egyenletek segítségével kiszámoltuk a kalcium felszabadulás sebességét az SR-ből:

$$V_{RyR2} = k_{ch} \left( 1 - \frac{t^4}{t^4 + t_{0.5}^4} \right) \quad 0 \leq t \leq T$$

A  $k_{ch}$  paraméter egyenlő a maximális kalcium felszabadulási sebességgel a ryanodin csatornán keresztül, a  $t_{0.5}$  paraméter az az időpont, ahol a kalcium fluxus a fél maximumot eléri. Kiszámoltuk továbbá a SERCA2a  $V_{max}$ -át és  $k_m$ -jét is:

$$V_{\text{SERCA2a}} = \frac{V_{\text{max}}}{(k_m/[Ca^{2+}]_i)^4 + 1}$$

Az egyenlet, megfelel a klasszikus Michaelis-Menten kinetikának, a Hill-koefficiens értékét 4-re állítottuk be. Az intracelluláris kalcium pufferek aktivitását a következő egyenlet írja le:

$$B = 1 + \sum_{i=1}^4 B_i \frac{k_{d,i}}{([Ca^{2+}]_i + k_{d,i})^2}$$

A jelzett 4 puffer a calmodulin, a troponin C, az SR és a sarcolemmális kalcium kötő fehérjék.

A modell egyenlet, amely a  $Ca^{2+}_i$  változását írja le, az előzők értelmében:

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \frac{V_{\text{RyR2}} - V_{\text{SERCA2a}}}{B}$$

A modell alkalmazhatóságának tesztelésére a béta adrenerg isoproterenolt és a SERCA2a gátló cyclopiazonsavat használtuk, és eredményeinket összevetettük a klasszikus biokémiai módszerekkel kapott eredményekkel. Megállapítottuk, hogy modellünk alkalmas az intracelluláris kalcium homeosztázis analizálására.

*op den Buijs J, Miklós Zs, van Riel NAW, Prestia CM, Szenczi O, Tóth A, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T.  $\beta$ -adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. Life Sciences, 76:1083-1098, 2005. (IF: 2.158)*

*Van Riel NAW, Ivanics T, Ligeti L, van der Vusse GJ. System Identification to analyze changed kinetics of SERCA in intact rat heart. In: Modelling and Control in Biomedical Systems Eds: D.D. Feng & E.R. Carson, 2003, pp. 123-128. Elsevier/IFAC publications, Oxford.*

A fenti kísérletekben a kalciumion mozgásaiért felelős legfontosabb fehérjék funkcionális paramétereit vizsgáltuk. Ekkor merült föl az a kérdés, hogy maguk a kísérletes körülmények – azaz a perfuzátum összetétele – hogyan befolyásolják az ion mozgásokat.

Ezért megvizsgáltuk, hogy az intracelluláris pH változásai (a  $pH_i$ -t carboxy-SNARF-fal fluorimetriásan mértük), 1. hogyan befolyásolják az izolált szív mechanikai teljesítményét és  $Ca^{2+}_i$  tranziensét, illetve 2. hogyan befolyásolják az izolált szívizomrost kontrakciós erejét és az akciós potenciál hosszát. Eredményeink arra utalnak, hogy a Tyrode oldattal létrehozott intracelluláris acidózis csökkenti az izolált szív pulzusnyomását és a  $Ca^{2+}_i$  tranziens amplitudóját, és ezzel egybecsengően csökkenti az izolált szívizomrost kontrakciós erejét, valamint megnyújtja az akciós potenciál hosszát. Ezek az eredmények magyarázhatják az irodalomban található ellentmondásos megfigyeléseket. Ugyanakkor ezek az eredmények arra is utalnak, hogy az általunk alkalmazott perfúziós médium – Krebs-Henseleit oldat – ideálisnak tekinthető.

*Fülöp L, Szigeti Gy, Magyar J, Szentandrassy N, Ivanics T, Miklós Zs, Ligeti L, Kovács A, Szénási G, Csernoch L, Nánási PP, Bányász T. Differences in electrophysiological and contractile properties of mammalian cardiac tissues bathed in bicarbonate-and HEPES-buffered solutions. Acta Physiologica Scandinavica, 178:11-18, 2003. (IF: 1.724)*

## **II. Szívelégtelenség modellek**

Az inzulin-dependens diabetes mellitus (IDDM) egyik legkomolyabb szövődménye a diabéteszes kardiomiopátia (mely koronária-szklerózis jelenléte nélkül is kialakul), és a következményes szívelégtelenség kifejlődése. A kardiomiopátiás szívfunkciózavart csökkent kontrakciós és relaxációs képesség jellemzi. Izolált kardiomiocitákon végzett vizsgálatok alapján az intracelluláris szabad kalcium ( $Ca^{2+}_i$ ) szint szabályozó folyamatainak érintettsége nagyban felelős a hemodinamikai eltérések kialakulásáért.

Nem ismert, hogy a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarok a diabéteszes kardiomiopátia kialakulása szempontjából korai szakaszban – mikor még nincsenek manifeszt kardiális tünetek – már fennállnak-e, és a betegség előrehaladtával hogyan változnak. Különösen kevés információ található az irodalomban izolált, perfundált szívpreparátumra vonatkozóan, amelyben a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarait az aktuális hemodinamikai funkció tükrében lehet vizsgálni.

A kardiomiopátiás kórképeknek egy további modellje a kemoterápiás szerként alkalmazott doxorubicin által okozott toxikus eredetű szívelégtelenség. A modellt súlyos oxidatív stressz jellemzi, amely a nukleáris enzim, a poly(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációját indukálja, amely a szívizom átépüléséhez, „remodeling”-jéhez vezet.

Célitűzésünk ennek megfelelően a következők voltak: 1. A szív korai (nem manifeszt) diabéteszes kardiomiopátiában mutatott hemodinamikai teljesítményének vizsgálata, és a feltételezett látens szívfunkciózavarok felfedése fokozott terhelés mellett. 2. A korai (4 hetes diabéteszes csoport) és a kifejelett (6 hetes diabéteszes csoport) diabéteszes kardiomiopátia hátterében álló  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarok tisztázása a szívfunkció tükrében izolált perfundált szívkészítményen. Mindezen kísérleteket streptozotocinnal (STZ) kiváltott IDDM-ben szenvedő patkányokból izolált, Langendorff szívpreparátumban végeztük el. 3. Toxikus eredetű kardiomiopátia vizsgálata doxorubicinnel indukált szívelégtelenségben izolált, perfundált patkányszívben.

1. A 4 hetes diabéteszes kísérletek eredményei szerint: A szív kontrakciós és relaxációs zavarai fokozott terhelés mellett már a diabéteszes kardiomiopátia korai, tünetmentes szakaszában is egyértelműen kimutathatók. A szívfunkciózavar hátterében a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis eltérései állnak. A  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarai, már a diabéteszes kardiomiopátia korai szakaszában is fennállnak, és a kórfolyamat előrehaladtával súlyosbodnak. Matematikai modellünk (lásd. előbb) által adott lehetőségeket kihasználva meghatároztuk a rianodin csatorna konduktanciáját, és a SERCA2a maximális transzport képességét. A diabéteszes szívekben mindkét kinetikai paraméter alacsonyabbnak bizonyult.  $\beta$ -adrenerg aktiválás a diabéteszes szívekben a SERCA2a transzport kapacitását a kontroll szíveknél szignifikánsan kisebb mértékben fokozta. A  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarainak hátterében feltehetőleg a  $Ca^{2+}_i$  szintjét szabályozó enzimrendszerek és csatornák (elsősorban SERCA2a, rianodin receptor,  $Na^+/Ca^{2+}$  cserélő) expresszióbeli és/vagy funkcionális zavarai, illetve a  $\beta$ -receptorhoz kapcsolt jelátviteli mechanizmus sérülése állhatnak.

*op den Buijs J, Miklós Zs, van Riel NAW, Prestia CM, Szenczi O, Tóth A, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T.  $\beta$ -adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. Life Sciences, 76:1083-1098, 2005. (IF: 2.158)*

2. Számos korábbi adat utal arra, hogy diabéteszes szívben oxidánsok és szabad gyökök termelődnek, amelyek a nukleáris enzim, a poly(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációja következtében az intracelluláris NAD(P)H és ATP raktárak kimerülnek. Logikusnak tűnő következtetés, mi szerint a PARP gátlás lassíthatja a manifeszt kardiomiopátia, valamint az azzal párhuzamos intracelluláris kalcium homeosztázis

zavarok kialakulását. A 4 hetes IDDM típusú diabéteszes modellünket némileg módosítva, a 6 hetes STZ típusú diabétesz modellünkben a PARP enzim aktivitást is gátoltuk (per os 20 mg/ttkg PJ34). Ezekben a kísérletekben az intracelluláris  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis néhány kulcsfehérjéjének szöveti szintjét is meghatároztuk (SERCA2a, RyR2, foszfolamban és  $Na^+/Ca^{2+}$  cseretranszporter) Western blot analízissel.

Eredményeink azt mutatják, hogy DM-ben a szívek hemodinamikai teljesítménye mind alapállapotban, mind  $\beta$ -adrenerg aktiváció után alacsonyabb volt, mint a kontroll szíveké. DM-ban a szívek végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szintje nőtt, valamint a SERCA2a transzport kapacitása és a RyR2 konduktanciája csökkent. A kalcium homeosztázisban szerepet játszó fehérjék szintjeit elemezve azt találtuk, hogy a RyR2 expressziója csökkent, a többi  $Ca^{2+}_i$ -kötő fehérje expressziója viszont nem változott. A PARP enzim gátlása nem befolyásolta lényegesen a DM szívek mechanikai funkcióját és  $Ca^{2+}_i$  homeosztázisát. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a SERCA2a és a RyR2 csatornák elégtelen működése kulcsszerepet játszik a DM során fellépő  $Ca^{2+}_i$ -homeosztázis zavarában. A DM ezen tranzícionális fázisában a sérült funkció hátterében a SERCA2a és a RyR2 fehérjék poszttranszlációs változásai állhatnak. Ugyanakkor, a DM ezen szakaszában a PARP enzimnek nincs szignifikáns patogenetikus szerepe a kontraktilis funkció illetve a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis változásaiban.

*Ligeti L, Szenczi O, Prestia CM, Szabó Cs, Horváth K, Marcsek ZL, van Stiphout RGPM, van Riel NAW, op den Buijs J, van der Vusse GJ, Ivanics T. Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. International Journal of Molecular Medicine, (közlésre elfogadva), 2006. (IF: 3.19)*

3. Végül perfundált patkányszív preparátumokban leírtuk az intracelluláris kalcium homeosztázist érintő zavarokat doxorubicin (DOX) által kiváltott kardiomiopátiás modellben is. E kísérletek szerint a DOX kezelés (s.c. 2.5mg/ttkg, 6 héten át) hatására a szívek végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szintje kétszeresére nőtt ( $109 \pm 22$  vs.  $222 \pm 73$  nM). Ez a magas végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szint a poly(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim gátlásával mérsékelhető volt ( $93 \pm 55$  nM). Továbbá, a PARP gátlás kivédte a DOX kezelt szívek hidrogén-peroxid által okozott további  $Ca^{2+}$ -túlterhelését és kontraktilitási zavarát is. Mindezek arra utalnak, hogy a PARP enzim aktiválódása kulcsszerepet játszik a DOX által indukált szívelégtelenség során fellépő  $Ca^{2+}_i$ -homeosztázis zavarában.

Szenczi O, Kemecei P, Holthuijsen MFJ, van Riel NAW, van der Vusse GJ, Pacher P, Szabó Cs, Kollai M, Ligeti L, Ivanics T. Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochemical Pharmacology*, 69:725-732, 2005. (IF: 3.436)

### III. Iszkémia/reperfúzió

A kísérlet sorozat célja az iszkémiás szív intracelluláris kalcium homeosztázisának elemzése volt. Régóta ismert, hogy az iszkémiát követő reperfúzió során a szív kalcium túlterhelést szenved. Hiányzik ugyanakkor a  $Ca^{2+}_i$  túlterhelés kvantitatív elemzése és annak kapcsolata a sarcolemma degradációjával. A szíveket 30 perces „no-flow” iszkémiának tettük ki, amelyet 30 perces reperfúzió követett. Megállapítottuk, hogy az iszkémiát követő reperfúzió alatt mind a kalcium felszabadulás, mind a kalcium szekvesztrálódását végző folyamatok sérülnek. A végdiasztolés nyomás reperfúzió alatti növekedésének hátterében az ebben a periódusban bekövetkező végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  növekedése áll. A reperfúziós periódusban membrán degradáció is bekövetkezik, amelyet a szöveti arachidonsav tartalom fokozódása jelzett. Az  $Ca^{2+}_i$  emelkedés és az arachidonsav koncentráció fokozódás között szoros korreláció volt kimutatható, ami a reperfúzió során bekövetkező  $Ca^{2+}$ -dependens foszfolipáz  $A_2$  aktivációra utal.

Miklós Zs, Ivanics T, Roemen THM, Van der Vusse GJ, Dézsi L, Szekeres M, Kemecei P, Tóth A, Ligeti L. Time related changes in calcium handling in the isolated ischemic and reperfused rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 250(1):115-124, 2003. (IF: 1.763)

### IV. Hő-sokk előkezelés

A hő-sokk (HS) előkezelés protektív hatása a posztiszkémiás funkciózavar mérséklésében, a kedvezőbb hemodinamikai paraméterek elérésében nyilvánul meg. A kedvező hatás kialakulásáért több egyidejű mechanizmus aktiválódása lehet felelős. Hő-sokk előkezelés hatására kulcsenzimek foszforilálódnak, a mitokondrium ATP-függő  $K^+$ -csatornái is aktiválódnak, NO termelődik és nem utolsósorban az endogén kannabinoid rendszer is aktiválódik. Az eddigi kutatási eredmények ellentmondásos adatokat közölnek arra vonatkozóan, hogy a hő-sokk terápia hatására melyik endogén kannabinoid

expresszálódik. Az irodalomban arról sincs egyértelmű állásfoglalás, hogy a hő-sokk előkezelés milyen módon változtatja meg az  $\text{Ca}^{2+}_i$ -homeosztázist működő szívpreparátumban. Ezekkel a kísérleteinkkel ezt a problémakört vizsgáltuk. Az  $\text{Ca}^{2+}_i$ -változást működő szív preparátumban vizsgáltuk iszkémia és reperfúzió során hő-sokk előkezelt patkányokban, majd a szivek anandamid, az 1-arachidonilglicerol és a 2-arachidonilglicerol szintjét meghatároztuk. Kísérleteink eredményeit összegezve: Hő-sokk előkezelés „jótékony” hatásának következtében az iszkémiát követő reperfúzió során az  $\text{Ca}^{2+}_i$ -túlterhelődés kisebb mértékű. Kimutattuk, hogy a hő-sokk előkezelés az endokannabinoidok közül az anandamid fokozott termelődését váltja ki a szívizomszövetben iszkémia/reperfúzió során. E két eredmény esetleges oksági kapcsolatra utalhat az endogén kannbinoid rendszer „up-regulálódása” és az iszkémia és reperfúzió során kialakuló miokardiális kalcium túlterhelődés kivédése között. A  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziensek kinetikai analizisének eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy a hő-sokk prekondicionált miokardium kontraktilis apparátusának kalcium érzékenysége 30 perc iszkémia és azt követő 30 perc reperfúzió után is megtartott.

*Szenczi O, Kemecsei P, Miklós Zs, Ligeti L, Snoeckx LHEH, van Riel NAW, op den Buijs J, Van der Vusse GJ, Ivanics T. In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 449:518-525, 2005. (IF: 2.26)*