

## Bevezetés

A szívizom elégtelenség epidémiás jelleget öltött, a daganatos megbetegedések mellett a halálozások fő kórokának tekinthető. Az intracelluláris kalcium ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) homeosztázis alapvetően szabja meg mind a szív pumpafunkcióját, mind relaxációs képességét. Szívizom elégtelenségben ezek a funkciók igen gyakran zavart szenvednek. A kardiális inszufficiencia igen különböző etiológiájú lehet. Ennek megfelelően az intracelluláris kalcium homeosztázis zavarai is alapvetően különbözhetnek egymástól. Jellemző módon a szívizom elégtelenség bevezető tünete a relaxációs képesség – luzitropia – csökkenése. A tünet hátterében a kalcium szekvesztráció sérülése áll. A szekvesztráció döntő eleme a szarkoplazmatikus retikulum Ca-ATPáz (SERCA2a)/foszfolambán (PLB) fehérje páros. A szekvesztráció sérülése mögött a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázisban résztvevő fehérjék csökkent expressziója és/vagy posztranlációs módosulása állhat. Későbbi tünet a kontraktilitás – inotropia – zavara, amelynek hátterében egyfelől a szívizom átépülése, másfelől a kalcium felszabadulás zavarai állnak. Bár ez a kérdéskör mind a klinikai gyakorlat, mind az elméleti élettani, kórélettani kutatások számára döntő fontosságúak, meglepő módon ennek a problémakörnek a szisztematikus kutatása meglehetősen szegényes. Pályázatunk fő célkitűzése a különböző módon kialakuló kardiális inszufficiencia és az intracelluláris kalcium homeosztázis kapcsolatának vizsgálata volt. Így kvantitatív módon jellemeztük a kalcium felszabadulás és szekvesztráció által indukált ion fluxusokat diabetes mellitus (DM) talaján kialakuló szívizom elégtelenségben, toxikus eredetű és dilatatív kardiomiopátiában, és vizsgáltuk hogyan befolyásolja hő-sokk előkezelés az iszkémia/reperfúzió elleni tűrőképességet. Kísérleteinket Langendorff szerint perfundált izolált patkány és egér szíveken végeztük, a mért paraméterek jellemezték a szívizom hemodinamikai teljesítményét, az intracelluláris kalcium ciklikus koncentráció változásait és néhány, a kalcium homeosztázis fenntartásában kulcsszerepet játszó fehérje szintjét.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a különböző kardiális inszufficiencia modelljeinkből nyert eredményeinket. Az ismertetés döntően publikált adatokon alapul, a zárójelben lévő számok a közleményjegyzékben szereplő publikációkra utalnak.

### **I. Diabéteszes kardiomiopátia (10, 16)**

Az inzulin-dependens diabetes mellitus (IDDM) egyik gyakori és súlyos szövődménye a koronária-szklerózis jelenléte nélkül is kialakuló diabéteszes kardiomiopátia, és a következményes szívelégtelenség kifejlődése. A kórképet jellemző legfontosabb hemodinamikai változások a miokardium csökkent kontrakciós és relaxációs képessége. A

hemodinamikai zavarok kialakulásáért az intracelluláris szabad kalcium szint szabályozó folyamatainak érintettsége tehető felelőssé. Ezen patofiziológias változásokat elsősorban izolált kardiomiocitákon végzett kísérletekben bizonyították.

Kevés adat található a manifeszt kardiális tüneteket még nem mutató diabéteszes kardiomiopátia korai és átmeneti szakaszára vonatkozólag. Kérdés, hogy ezekben az állapotokban a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarok már fennállnak-e, és ezek a zavarok a betegség progrediálásával hogyan változnak? Különösen kevés információ lelhető fel az irodalomban az in vivo körülményekhez közelebb álló izolált, perfundált szívpreparátumra vonatkozóan, amelyben a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarait az aktuális hemodinamikai funkció tükrében lehet vizsgálni. Az itt és az alábbiakban ismertetett összes kísérletben Langendorff szerint perfundált patkány és eger szívekben a bal kamrai nyomást a kamrába helyezett ballon katéter segítségével, a  $Ca^{2+}_i$ -t Indo-1 felszíni fluorimetriával mértük.

### *1. IDDM korai szakasza (10)*

A pancreas beta sejteinek kémiai ablációját (70 mg/ttkg streptozotocin, STZ) követő 4 hetes periódus tekinthető a diabétesz korai fázisának. Ekkor a hemodinamikai funkciók alapállapotban nem térnek el a kontroll szívektől. A szív kontrakciós és relaxációs zavarai ugyanakkor fokozott terhelés (beta-adrenerg aktiváció) mellett már a diabéteszes kardiomiopátia korai, tünetmentes szakaszában is egyértelműen kimutathatók, amely funkciózavar hátterében a szív a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázisának eltérései állnak. A  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarai tehát már a diabéteszes kardiomiopátia korai szakaszában fennállnak, és a kórfolyamat progrediálásával súlyosbodnak. A laboratóriumunkban kidolgozott matematikai modell segítségével meghatároztuk a rianodin csatorna konduktanciáját, és a SERCA2a maximális transzport sebességét. Ezek a kinetikai paraméterek szignifikánsan kisebbek voltak a diabéteszes szívekben a kontroll szívekhez képest. Beta-adrenerg aktiválás lehetőséget ad a SERCA2a transzport rezerv kapacitásának meghatározására. Eredményeink szerint a diabéteszes szívekben a SERCA2a rezerv kapacitása a kontroll szíveknél szignifikánsan kisebbnek bizonyult. Ezek a mérések arra utalnak, hogy a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis zavarainak hátterében feltehetőleg a  $Ca^{2+}_i$  szintjét szabályozó enzimszerek és csatornák (elsősorban SERCA2a, rianodin receptor – RyR2,  $Na^+/Ca^{2+}$  cserélő) expresszióbeli és/vagy funkcionális zavarai állhatnak. Nem zárható ki azonban a beta-receptorhoz kapcsolt jelátviteli mechanizmus sérülése sem.

## 2. IDDM átmeneti szakasza (16)

Ebben a kísérletsorozatban a DM átmeneti (tranzícionális) fázisának vizsgálatára 6 hetes STZ típusú diabétesz modellt alkalmaztunk, amelyben elemeztük hogyan módosul DM során a miokardium intracelluláris kalcium homeosztázisában kulcsszerepet játszó fehérjék (SERCA2a, RyR2, foszfolamban és  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseretranszporter) funkciója és expressziója. Vizsgáltuk továbbá, hogyan változik a DM-es szív beta-adrenerg aktiválhatósága (Izoproterenol). A fehérjék szöveti szintjét Western blot analízissel határoztuk meg. Számos adat utal arra, hogy diabetes mellitus-ban fokozódik az oxiradikál képződés. A folyamatban fontos szerepet játszik a poly(ADP-ribóz) polimeráz nukleáris enzim (PARP), amelynek aktivációja az intracelluláris NAD(P)H és ATP raktárak kimerülését okozza. Így kísérleteink következő csoportjában azt is vizsgáltuk, hogy a PARP gátlás lassítja-e a manifeszt kardiomiopátia, valamint az azzal párhuzamos intracelluláris kalcium homeosztázis zavarok kialakulását. Ebben a kísérleti csoportban a PARP enzim aktivitást telítő dózisu 20 mg/ttkg PJ34-el (per os) gátoltuk.

Eredményeink szerint a DM átmeneti szakaszában a szívek hemodinamikai teljesítménye (inotrópia, luzitropia) már alapállapotban is alacsonyabb volt, mint a kontroll szíveké. Továbbá, beta-adrenerg aktiváció jelentősen kisebb hatású volt a DM-es szívekben. Matematikai modellünk felhasználásával a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázist elemezve azt tapasztaltuk DM-ben a szívek végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  szintje nőtt, valamint a SERCA2a transzport kapacitása és a RyR2 konduktanciája csökkent. Ugyanakkor a kalcium homeosztázisban szerepet játszó fehérjék szintjeit elemezve azt találtuk, hogy csak a RyR2 expressziója csökkent, a SERCA2a, a foszfolamban és a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseretranszporter fehérjék szintjei viszont nem változtak. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a SERCA2a és a RyR2 csatornák elégtelen működése kulcsszerepet játszik a DM során fellépő  $\text{Ca}^{2+}_i$ -homeosztázis károsodásában, és az ennek következtében kialakuló kontrakció és relaxációs zavarokban. A sérült funkció hátterében a SERCA2a és a RyR2 fehérjék poszttranszlációs változásai állhatnak a DM tranzícionális fázisában, ennek következtében mind a  $\text{Ca}^{2+}_i$  felszabadulás, mind a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztráció zavart szenved. A PARP enzim gátlása azonban nem befolyásolta a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis és a hemodinamikai teljesítmény zavarait, ami arra utal, hogy a DM ezen szakaszában a PARP enzimnek nincs szignifikáns patogenetikus szerepe a kontraktilis funkció, illetve a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis változásaiban.

## **II. Toxikus eredetű kardiomiopátia (12)**

A kardiomiopátiás kórképeknek egy további jól ismert modellje a kemoterápiás szerként alkalmazott doxorubicin (DOX) által okozott toxikus eredetű szívelégtelenség. Ebben a modellben súlyos oxidatív stressz alakul ki, amely a nukleáris enzim, a poly(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációját indukálja. Ez a folyamat a szívizom átépüléséhez, „remodeling”-jéhez vezet. Ebben a modellben izolált, perfundált patkányszív preparátumot használva leírtuk az intracelluláris kalcium homeosztázist érintő zavarokat. Az eredmények szerint a krónikus DOX kezelés (s.c. 2.5mg/ttkg, 6 héten át) következtében a szívek végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szintje kétszeresére nőtt ( $109 \pm 22$  vs.  $222 \pm 73$  nM), amely változás a PARP enzim gátlásával (20 mg/ttkg PJ34, per os) mérsékelhető volt ( $93 \pm 55$  nM). Továbbá, hidrogén peroxidot (600 mikrom) használva a perfuzátumban akut oxidatív stressznek tettük ki a DOX szíveket. E beavatkozás következtében a szívekben további  $Ca^{2+}_i$  túlterhelődés és kontrakciós zavar alakult ki, amelyet a PARP gátlás teljesen kivédett. Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a PARP enzim aktiválódása alapvető szerepet játszik a DOX által indukált toxikus kardiomiopátia során fellépő  $Ca^{2+}_i$ -homeosztázis zavarában.

### **III. Hő-sokk (13)**

A kardiális insufficiencia és az intracelluláris kalcium homeosztázis kapcsolatát iszkémia/reperfúzió során is vizsgáltuk. Az irodalomból jól ismert, hogy a hő-sokk (HS) előkezelés protektív hatása a posztisztkémiás funkciózavar mérséklésében, a kedvezőbb hemodinamikai paraméterek elérésében nyilvánul meg. A protektív hatás hátterében több egyidejű mechanizmus aktiválódása húzódik meg. Így például HS előkezelés hatására az intracelluláris homeosztázis egyes kulcsenzimeit foszforilálódnak, a mitokondrium ATP-függő  $K^+$ -csatornái is aktiválódnak, NO termelődik. Ezen, részben már jól ismert mechanizmusok mellett a legújabb irodalmi adatok szerint az endogén kannabinoid rendszer is aktiválódik. Ugyanakkor az eddig közölt kutatási eredmények ellentmondásosak abban a vonatkozásban, hogy, a HS terápia hatására melyik endogén kannabinoid expresszálódik. Továbbá, nem tisztázott még az sem részleteiben, hogy a hő-sokk előkezelés milyen módon változtatja meg az  $Ca^{2+}_i$ -homeosztázist működő szívpreparátumban iszkémia/reperfúzió során. Ezért terjesztettük ki a kardiális insufficiencia és a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis kapcsolatára irányuló vizsgálatokat erre a problémakörre is. Az iszkémia/reperfúzió során kialakuló  $Ca^{2+}_i$ -változásokat működő szív preparátumban vizsgáltuk hő-sokk előkezelt patkányokban. A kísérletek végén a szíveket lefagyasztottuk, és a szöveti anandamid, 1-arachidonilglicerol és 2-arachidonilglicerol (endogén kannabinoidok) szinteket meghatároztuk. Eredményeink szerint: 1. Az iszkémiát követő reperfúzió során az  $Ca^{2+}_i$ -túlterhelődés jóval kisebb mértékű

volt a hő-sokk előkezelés következtében. 2. Az endokannabinoid rendszer vonatkozásában kimutattuk, hogy HS előkezelés után iszkémia/reperfúzió a szívizomszövetben fokozott anandamid termelődését indukálja. E két eredmény arra utal, hogy az endogén kannbinoid rendszer up-regulálódása és az iszkémia/reperfúzió során kialakuló miokardiális kalcium túlterhelődés kivédése között esetleges oksági kapcsolat áll fenn. Matematikai modellünk felhasználásával a  $Ca^{2+}_i$  tranzienseket kinetikai analízisnek vetettük alá. E vizsgálatok eredményeképpen megállapítottuk, hogy a HS prekondicionált szívizomszövet kontraktilis apparátusának kalcium érzékenysége 30 perc iszkémia és azt követő 30 perc reperfúzió után is megtartott.

#### **IV. Acidózis hatása a $Ca^{2+}_i$ homeosztázisra (1)**

Közismert, hogy iszkémia/reperfúzió (I/R) intracelluláris acidózist okoz. Felmerült a kérdés, hogy acidózis per se hogyan befolyásolja az intracelluláris kalcium homeosztázist. A rosszul permeáló szerves pufferek, mint pl. a Tyrode oldat intracelluláris acidózist alakítanak ki. Ezt kihasználva kísérleteinkben az általánosan használt ( $CO_2/HCO_3^-$  alapú) Krebs-Henseleit puffert (HEPES alapú) Tyrode oldatra cseréltük ki. Vizsgáltuk, hogy az intracelluláris pH csökkenése (a  $pH_i$ -t carboxy-SNARF-al 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 szerint a Tyrode oldattal létrehozott intracelluláris acidózis csökkenti a szív kontraktilis erejét és a  $Ca^{2+}_i$  szekvesztráció sebességét, és ezzel analóg módon csökkenti az izolált szívizomrost kontrakciós erejét, valamint megnyújtja az akciós potenciál hosszát.  $P^{31}$ -NMR spektroszkópiával nyert adatok szerint a szívizom intracelluláris pH-ja 7,2. Ugyanakkor a különböző SERCA izoformáknak a pH optimuma 7,0-7,7 között van, vélhetően az alkalmazott Tyrode oldat a miokardium pH-ját ez alá az érték alá viszi, magyarázva a SERCA2a lassult transzport sebességét. Ugyanakkor ezek az eredmények arra is utalnak, hogy az általunk alkalmazott perfúziós médium – Krebs-Henseleit oldat – ideálisnak tekinthető.

#### **V. Dilatatív kardiomiopátia (publikálás alatt)**

A dilatatív kardiomiopátia (DCM) modelljéül a muszkuláris LIM protein (MLP)-KO egértörzset választottuk. A LIM protein „scaffold” fehérje, melynek hiányában csökken a szívkontraktilitás, ami szívhipertrófiához, később dilatációhoz vezet. 3 és 9 hónapos egerek szíveit izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk. Ebben a kísérletsorozatban az

intracelluláris kalcium homeosztázis fenntartásában szerepet játszó kulcsfehérjék mRNS szintjét rt-PCR-rel határoztuk meg. A szarkoplazmatikus retikulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázának súlyát a  $\text{Ca}^{2+}$  transzportban a transzporter gátlásával (ciklopiazonsav, CPA 5  $\mu\text{M}$ ) becsültük meg. A 3 hónapos MLP-KO egerek bal kamrai luzitóp funkcióját jellemző  $-\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$  ( $1489 \pm 171$  Hgmm/s) elmaradt a hasonló korú, kontroll egyedekéhez képest ( $1784 \pm 164$  Hgmm/s). A 9 hónapos hibrid és KO egerek  $-\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$  értékeiben nem találtunk különbséget (Hibrid:  $1520 \pm 290$ , KO:  $1635 \pm 362$  Hgmm/s). A szívfunkciót jellemző többi hemodinamikai paraméter tekintetében nem észleltünk eltérést a KO és a hibrid csoport között. CPA hatás alatt a  $+\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$ , és a  $-\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$  szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető minden kísérleti csoportban. A 3 hónapos MLP KO szívekben azonban a CPA válasz szignifikánsan nagyobb volt az azonos korú hibrid csoportban észlelthez képest: a  $+\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$  (hibrid:  $2394 \pm 691$ , KO:  $1271 \pm 363$  Hgmm/s) és a  $-\text{dP}_{\text{bk}}/\text{dt}_{\text{max}}$  (hibrid:  $965 \pm 323$ , KO:  $506 \pm 139$  Hgmm/s) nagyobb mértékben csökkent, míg a végdiasztolés bal kamrai nyomás jelentősebb emelkedést mutatott (hibrid:  $10.3 \pm 2.7$ , KO:  $17.8 \pm 4.1$  Hgmm). SERCA2a gátlás alatt ennek megfelelően a fiatalabb állatokban a kontrollhoz képest megnőtt a végdiasztolés kalcium koncentráció (hibrid:  $176 \pm 39$ , KO:  $322 \pm 92$  nM), a 9 hónaposakban viszont már mérséklődött a különbség a beteg és a kontroll csoport között. A  $\text{Ca}^{2+}$ -szekvesztráció sebességének csökkenése ( $-\text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}_{\text{max}}$ ) alacsony dózisu CPA-infúzió során csak a 3 hónapos MLP KO állatokban volt nyilvánvaló. A rianodin receptor (RyR2), a nátrium-kalcium kicserélő (NCX) mRNS szintjei a DCM különböző stádiumaiban nem változtak. A DCM korai szakaszában (3 hónapos) csökkent a SERCA2a mRNS szintje (22% a kontrollhoz képest), míg a betegség manifeszt szakaszában (9 hónapos) megegyezett a kontroll állapottal (110% a kontrollhoz képest). Eredményeink arra utalnak, hogy a betegség korai szakaszában a SERCA2a mRNS szintje és működése sérül, majd a DCM késői szakaszában eddig nem ismert szabályozó mechanizmusok révén restituálódik.