

# A szívizom intracelluláris kalcium ion homeosztázisának zavara primer dilatatív és diabéteszes kardiomiopátiában

Doktori értekezés

**Dr. Kemecei Péter Imre**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ivanics Tamás, egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kékesi Violetta, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Szigeti Gyula, főosztályvezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor, egyetemi tanár,  
kandidátus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Várnai Péter, egyetemi docens, Ph.D.  
Angyalné Dr. Pataki Ágnes,  
elektrofiziológus, Ph.D.

Budapest  
2013

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Irodalmi áttekintés .....	6
2.1. Szív ciklus és az elektromechanikai kapcsolás.....	6
2.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ felszabadulás .....	7
2.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ spark .....	7
2.1.3. Kontrakció és kontraktilis apparátus .....	8
2.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ szekvesztráció.....	10
2.1.5. A $\text{Ca}^{2+}$ tranziens kialakításában résztvevő csatornák és pumpák.....	11
2.2. Kardiomiopátia .....	17
2.2.1. Neuroendokrin hatások szívelégtelenségben.....	18
2.2.2. Molekuláris változások kardiomiopátiában.....	24
2.2.3. Kezelési lehetőségek szívelégtelenségben.....	27
2.3. Primer dilatatív kardiomiopátia .....	29
2.3.1. MLP elhelyezkedése és funkciója .....	30
2.3.2. MLP szerepe emberben .....	32
2.3.3. A MLP hiánya által okozott molekuláris elváltozások.....	32
2.4. Szerzett kardiomiopátia .....	33
2.4.1. Molekuláris változások metabolikus szindrómában.....	33
2.4.2. Renin- angiotenzin rendszer eltérései metabolikus szindrómában.....	35
2.4.3. Oxidatív stressz .....	35
2.4.4. O-GlcNAciláció.....	36
2.4.5. Kardiális szubsztrát metabolizmus .....	36
2.4.6. Fruktóz hatása kísérleti állatokban .....	37
3. Célkitűzések .....	39
4. Módszerek .....	40
4.1. Kísérleti állatok .....	40
4.1.1. MLP-KO kísérletek .....	40
4.1.2. A metabolikus szindróma állatmodellje .....	40
4.2. Langendorff szív preparátum, Indo-1 AM fluoreszcens technika.....	41
4.3. Echokardiográfia .....	43
4.4. Adatfeldolgozás és kiértékelés .....	44
4.5. Az SR $\text{Ca}^{2+}$ transzporterek kinetikus paramétereinek számítása.....	44
4.6. RNS izoláció, reverz transzkripció, kvantitatív valós idejű PCR (qPCR).....	45
4.7. Western blot analízis .....	46
4.8. Statisztika .....	46
5. Eredmények.....	48
5.1. MLP-KO egér kísérletek .....	48
5.1.1. Túlélési arány, szív- és testtömeg.....	48

5.1.2. Hemodinamikai jellemzők a perfundált szívekben .....	48
5.1.3. Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ háztartás .....	50
5.1.4. A $\text{Ca}^{2+}$ szabályozásban résztvevő fehérjék mRNS és protein szintje.....	53
5.2. Metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia .....	57
5.2.1. Általános adatok .....	57
5.2.2. Echokardiográfiás eredmények .....	58
5.2.3. Hemodinamikai funkció .....	59
5.2.4. Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ háztartás .....	62
5.2.5. A $\text{Ca}^{2+}$ szabályozásban résztvevő enzimek protein expressziója .....	64
6. Megbeszélés .....	66
6.1. MLP-KO.....	66
6.2. Metabolikus szindróma indukálta kardiomiopátia .....	69
7. Következtetések.....	76
8. Összefoglalás .....	77
9. Summary.....	78
10. Irodalom jegyzék .....	79
11. Saját publikációk .....	90
11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények .....	90
11.2. Egyéb lektorált tudományos közlemények.....	90
12. Köszönetnyilvánítás .....	91

## 1. Rövidítések jegyzéke

ACE-gátlók: angiotenzin-konvertáló enzim gátlószerei

AT-II: angiotenzin-II

ATP-áz: adenzin-trifoszfátáz enzim

$\beta$ ARK1:  $\beta$  adrenoreceptor kináz 1

$\text{Ca}^{2+}$ : kalciumion

$\text{Ca}^{2+}_i$ : intracelluláris kalciumion

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ : intracelluláris kalciumion-koncentráció

CAMK:  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin dependens protein kináz

cAMP: ciklikus AMP

CICR: kalciumindukált kalcium-felszabadulás ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release)

CPS: ciklopiazonsav, a SERCA2a specifikus gátlószere

DAG: diacil-glicerol

DCM: dilatatív kardiomiopátia

DHPR: dihidropiridin receptor, L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna

$+dP/dt_{\max}$ : a bal kamrai nyomásgörbe felszálló szárának maximális meredeksége: az inotrópia jellemzője

$-dP/dt_{\max}$ : a bal kamrai nyomásgörbe leszálló szárának maximális meredeksége: a luzitropia jellemzője

EDP: bal kamrai végdiasztolés nyomás (end-diastolic pressure)

EDV: végdiasztolés térfogat (end-diastolic volume)

EF: ejekciós frakció

ET: endotelin

$\text{ET}_1$ : endotelin 1 receptor

FFA: szabad zsírsav (free fatty acid)

FS: frakcionális rövidülés (fractional shortening)

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

$G_i$  protein: inhibitoros heterotrimer G protein

$G_s$  protein: serkentő heterotrimer G protein

IGF-1: inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)

IVSd: interventrikuláris szeptum átmérő

$\text{IP}_3$ : 1,4,5- inozitol-trifoszfát

L-tubulus: longitudinális tubulus

LVIDd: bal kamra belső átmérője diasztolében (left ventricular internal diameter)

LVIDs: bal kamra belső átmérője szisztolében (left ventricular internal diameter)

MetS: metabolikus szindróma

MLC: miozin könnyűlánc (miosin light chain)

MLCK: miozin könnyűlánc kináz (miosin light chain kinase)

MLP-KO: muscle lim protein knock out

NCX: a szarkolemmában található  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -kicserélő pumpa

O-GlcNAc: O-kapcsolt N-acetilglükózamin

OGT: O-GlcNAc transzferáz

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PKG: protein kináz G

PLB: foszfolambán (phospholamban)

P-PLB: foszforilált foszfolambán

PP: bal kamrai pulzusnyomás (pulse pressure)

PV: pulzus térfogat

RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

RyR2: a szarkoplazmás retikulum szívspecifikus rianodin receptora

SERCA2a: a szarkoplazmás retikulum szívspecifikus  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz pumpája

SR: szarkoplazmás retikulum

Tn-C: troponin C

Tn-I: troponin I

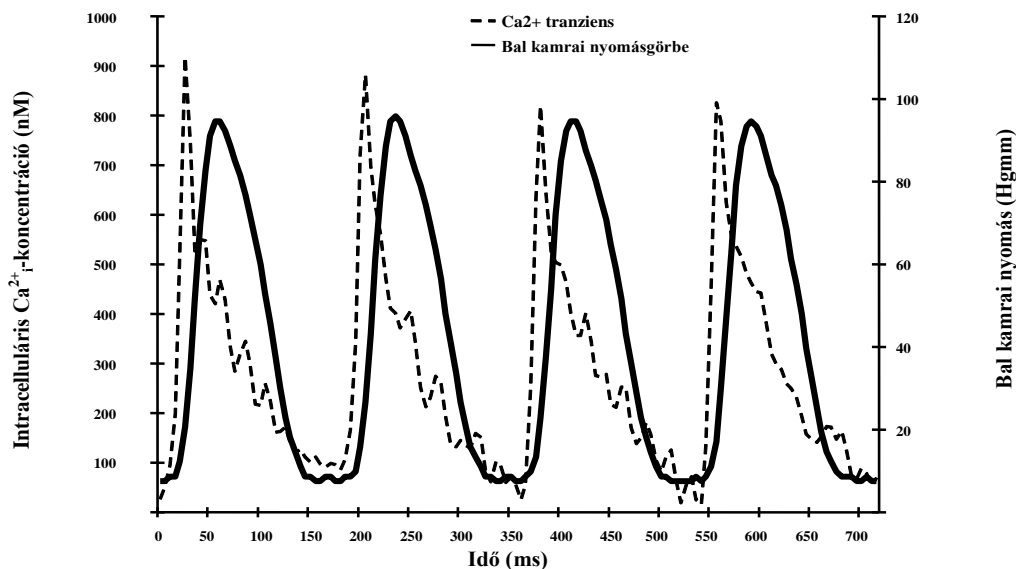
Tn-T: troponin T

T-tubulus: transzverzális tubulus

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Szív ciklus és az elektromechanikai kapcsolás

A kalcium ionnak ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kitüntetett szerepe van a szervezetben. Nem csak a test tartószerkezetének nagy, anorganikus részét alkotja, hanem számos szabályzó funkciót is ellát. Mind az immunrendszer, a véralvadás folyamatában, mind a sejtek helyváltoztatásában szerepet játszik. Irányítja az ingerület átvitelt, a hormonszekréciót. Elsődleges és másodlagos hírvivőként befolyásolja az intracelluláris folyamatokat. Ezek mellett központi eleme a szívizomban zajló ciklikus folyamatnak, a szív ciklusnak. A szívizom periodikus összehúzódása és elernyedése kalciumion hiányában elképzelhetetlen, mivel az elektromos jel, a depolarizáció és az izomrostok összehúzódása közötti kapcsolatot, az elektromechanikai kapcsolást a  $\text{Ca}^{2+}$  végzi. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció folyamatos ciklikus változását nevezzük  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensnek.



**1. Ábra** A  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziens (szaggatott vonal), Indo-1 fluoreszcens technika segítségével meghatározott  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentrációváltozás, és a bal kamrai nyomásgörbe (folyamatos vonal). Saját, reprezentatív ábra, a fruktóz bevitel indukálta kardiomiopátia kísérletekben a nyugalmi állapotban rögzített adatsorokból megjelenítve.

### 2.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ felszabadulás

Amikor az elektromos jel végigfut a szívmembránokon és azok T tubulusainak membránján depolarizáció formájában, és eléri egy adott sejt membránján elhelyezkedő L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat, megnyitja azokat. A lassú  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás indítja el az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció meredek, nagymértékű emelkedését, mely során a nyugalmi 100 nmol/l koncentráció 1  $\mu\text{mol/l}$  tartományba emelkedik. Ez a folyamat a sejtmembrán és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kiemelt területeire koncentrálódik. Ezeket a helyeket diádoknak vagy triádoknak nevezzük, mivel a sejtmembrán betüremkedései, a T-tubulusok, ahova az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák (DHPR) csoportosulnak, egy vagy két, ryanodin receptorban gazdag terminális ciszternával állnak kapcsolatban. A DHPR receptorok a ryanodin csatorna (RyR2) „láb”, citoszólba lógó részéhez közel helyezkednek el, ugyanakkor a szívmembránban a kapcsolat nem jelent direkt kötődést. A RyR2 csatornák aktiválódását az extracelluláris térből belépő kalciumionok hozzák létre. Ennek során a SR-ből  $\text{Ca}^{2+}$  szabadul fel, és így a lokálisan megemelkedő  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció aktiválja a szomszédos ryanodin csatornákat. Ez a folyamat, amit  $\text{Ca}^{2+}$  indukált  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulásnak (calcium induced calcium release, CICR) nevezünk, eredményezi a  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció gyors emelkedését. Ugyanakkor ez a pozitív visszacsatolásos, autokatalitikus folyamat bizonyos  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció elérése után önmagát gátolva leáll, és így a  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció emelkedése megáll, majd csökken, a párhuzamosan működő eltávolító mechanizmusoknak köszönhetően. A koncentráció megemelkedéséért felelős  $\text{Ca}^{2+}$  nagy része (92%) a SR kalcium raktárából származik (patkány és egér szívben), míg a kisebbik részt alkotó, extracelluláris térből bejutó ionok triggerként funkcionálnak (Bers 2000, Bootman és Berridge 1995, Dibb és mtsai 2007, Édes 2000, Rios és Pizarro 1988).

### 2.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ spark

A lokálisan megemelkedő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt  $\text{Ca}^{2+}$  sparknak nevezzük. Az elnevezés a konfokális lézer fluoreszcencia mikroszkópia alkalmazása során tapasztalt kicsi, tova nem terjedő  $\text{Ca}^{2+}$  felvillanások alapján történt. A  $\text{Ca}^{2+}$  spark a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulásáért felelős elemi egységek (CRU:  $\text{Ca}^{2+}$  release unit) aktivitása során keletkező  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációemelkedés, vagyis az ennek következményeként megjelenő fluoreszcens jel. Ezt több ryanodin csatorna működése hozza létre. Egyetlen RyR2 csatorna aktivitását quarknak nevezzük. A depolarizáció után kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációemelkedés alapegysége a spark, melyek összegzéséből alakul a  $\text{Ca}^{2+}$

koncentráció ciklikus változása, a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens. Ezeknek az elemi egységeknek élettani jelentőségük az, hogy ezek a diszkrét, jól körülírt jelenségek nem eredményezik a citoszól, így a mitokondriumok  $\text{Ca}^{2+}$  túlterhelését. A koncentrációemelkedés a citoplazma alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  diffúzibilitása miatt lokális marad, így mennyiségileg nem emelkedik túlzottan a  $\text{Ca}^{2+}$  tartalom, így az eltávolítás gyorsabb és jobban szabályzott maradhat. A spark jelensége nem csak szívmusclejtekben megfigyelhető, hanem vázizmokban, simaizmokban, neuroendokrin sejtekben, valamint olyan neuronokban, melyek RyR2 tartalmaznak (Cheng és mtsai 2008, Wier és Balke 1999).

### 2.1.3. Kontrakció és kontraktilis apparátus

A megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció vezet a kontrakcióhoz, így jön létre az elektromechanikai kapcsolat. A  $\text{Ca}^{2+}$  a vékony filamentumokhoz kapcsolódó szabályzó fehérje, a troponin (Tn) egyik alkotóeleméhez, a troponin C-hez (Tn-C) kapcsolódik, ami lehetővé teszi a kontrakciót. A troponin molekulát alkotja még a troponin I (Tn-I), ami nyugalmi állapotban gátolja az aktin miozin kapcsolódást, valamint a troponin T (Tn-T), ami biztosítja a kapcsolatot a többi troponin, és a vékony filamentumokhoz tartozó tropomiozin között. A troponin T alegységnek emberben négy izoformája ismert (Tn-T 1-4). Egészséges humán szívben a Tn-T3 dominál. A troponin C  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását számos tényező befolyásolja: csökkenti az alacsony pH, rövid szarkomerhossz, a PKA által foszforilált troponin I, illetve növeli a nagyobb szarkomerhossz, ami a Starling szabály egyik lehetséges magyarázata. (Bers 2000, Édes 2000, Opie 2004, Sommer 1995).

A vékony filamentumok fő alkotóeleme az aktin. Az aktin monomerek polimerizátuma alkotja az aktin filamentumot. Két aktin molekulalánc egymás köré csavarodva kettős hélixet alkot, amit a szintén kettős helikális szerkezetű polipeptidlánc, a tropomiozin körülölel ezzel stabilizálva azt, valamint ezzel eltakarva az aktin miozinkötőhelyeit, így alapállapotban megakadályozva az aktin-miozin interakciót. A vastag filamentumok miozimból és ez utóbbiak két könnyű (MLC) és két nehézláncból (MHC) állnak, ezek alkotják a fő láncot és keresztív-kötésekért felelős fejet. A miozin könnyű láncának két típusa van: az MLC-1 struktúrális funkciót lát el, míg az MLC-2 a szabályozásban vesz részt. Az utóbbit foszforilálja a miozin könnyűlánc kináz (MLCK), ami a  $\beta$  adrenerg stimuláció és a  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulin komplex hatására aktiválódik. A foszforiláció hatására növekszik a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenysége (Morano és mtsai 1985). Az MHC két típusa ismert az alfa és a béta. Az előbbi nagyobb ATPáz aktivitással és gyorsabb



mechanikus reakcióval rendelkezik, ellentétben az utóbbival. Mivel a miozinfilamentumok két MHC kapcsolódásával jönnek létre, ezért 3 izotípus kombináció jöhet létre: a  $V_1$  két  $\alpha$ , a  $V_2$  egy  $\alpha$  és egy  $\beta$ , a  $V_3$  két  $\beta$  izoenzimet tartalmaz. Rágcsálókban az  $\alpha$  MHC dominál, emberben a  $\beta$  MHC. Szívelégtelenségben csökken az  $\alpha$  izotípus, ami annak ellenére, hogy energetikailag előnyös, hozzájárulhat a kardiális diszfunkció romlásához. Az  $\alpha$  izoenzim mennyiségének kismértékű változása észlelhető eltérést eredményez a kontraktilis teljesítményben (Édes 2000, Herron és mtsai 2002, Schwartz és mtsai 1981).

A kontraktilis apparátus funkcionális és strukturális alapegysége a szarkomer, amit a két oldalán elhelyezkedő Z-lemez zár le. Ezen keresztül kapcsolódnak össze a szarkomerek. A Z-lemez számos citoskeletális fehérjét ( $\alpha$ -aktinin, spektrin, dezmin) tartalmaz, melyek biztosítják a miofibrilláris rendszer és a sejt vázának kapcsolódását. A vékony filamentumok a Z-lemezhez rögzülnek, és összehúzódás során a két Z-lemez között elhelyezkedő miozin molekulák közé csúsznak be, ezzel közelítve egymáshoz a két szomszédos Z-lemezt. A vastag filamentumok egy elasztikus tulajdonságú molekulán, a titinen keresztül vannak kapcsolatban a Z-lemezzel (Helmes és mtsai 1996). A titin a szervezet legnagyobb molekulája, kontrakció alatt összezsugorodik, majd relaxáció során, mialatt visszanyeri kiindulási állapotát az ebben tárolt energia gyorsítja a relaxációt. A diasztolé végén a titin molekula megnyúlik, majd az előzőleg leírt módon gyorsítja a következő kontrakciót (Sutko és mtsai 2001). A titin molekula végéhez kapcsolódik a telethonin molekula, valamint a harántcsíkolt izom specifikus LIM fehérje (MLP) (Knöll és mtsai 2002). A LIM egy betűszó, ami azt a három fehérjét jelöli (Lin11, Isl-1, Mec-3), melyekben először megtalálták a LIM fehérjét.

A miozin nyugalmi állapotban ADP-t és anorganikus foszfátot (P) köt, majd a troponin C és a  $Ca^{2+}$  kapcsolódásának hatására a troponin-tropomiozin komplex olyan konformációváltáson megy keresztül, ami lehetővé teszi az aktin és a miozin kapcsolódását. Ekkor a keresztkötésekről az ADP és a P disszociál, aminek hatására megtörténik a miozinfaj erőgeneráló konformációváltása (power stroke). A nyugalmi állapotban 90 fokos miozin fej-aktin kapcsolat 45 fokra csökken. Emiatt csúszik össze az aktin és miozin (csúszófilamentum elmélet). Újabb ATP kapcsolódásával a miozinfajhoz, az aktin-miozin kapcsolat oldódik, majd az ATP hidrolizál. Az ebből származó energia csak abban az esetben szabadul fel, mikor  $Ca^{2+}$  jelenlétében az aktin-

miozin komplex újra kialakul.  $\text{Ca}^{2+}$  nélkül nincs összehúzódás, ATP nélkül nincs relaxáció (Édes 2000, Opie 2004).

#### 2.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ szekvesztráció

A szívizom kontrakciója akkor szűnik meg, mikor a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció csökken. Ebben több folyamat is részt vesz. Az extracelluláris térből bekerülő  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításáért a sejtmembránban elhelyezkedő  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő (NCX) felelős. Ez felel az  $\text{Ca}^{2+}$  7-8 % eltávolításáért (patkány és egér szívben). 3  $\text{Na}^+$  beengedésével egyidőben 1  $\text{Ca}^{2+}$  kerül ki a sejből. A transzporter mechanizmus energiaigénye nagy, közvetve 1  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása 1 ATP-be kerül. Az NCX pumpa működését befolyásolja a membránpotenciál, valamint az intra és extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció. (Nicoll és mtsai 1990)

Az  $\text{Ca}^{2+}_i$  eltávolítás nagy részét a SR membránjában lévő  $\text{Ca}^{2+}$  -ATPáz (SERCA) 2a típusa biztosítja, amely 1 ATP árán 2  $\text{Ca}^{2+}$  juttat az intracelluláris raktárba, ahol kalszekvesztrinhez kötődik. Emiatt az SR-ban a koncentráció nem emelkedik meg túlzottan, így az ellentétes irányú koncentrációgrádiens nem nehezíti az iontranszportot. Ezek következtében nagy mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  tárolása válik lehetővé, kifejezetten a T-tubulusok közelében elhelyezkedő terminális ciszternákban. A SERCA2a legfőbb szabályzó fehérjéje a foszfolambán (PLB), amely defoszforilált állapotban kapcsolódik a SERCA2a-hoz. A kapcsolódás eredményeképpen a SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$  affinitása csökken. A PLB két aminosavján foszforilálható. A Ser16-on a ciklikus AMP (cAMP)-protein kináz A (PKA), a Thr17-en  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin dependens kináz (CAMK) rendszer fejt ki hatását. Az egyes pozíciók foszforiláltsága esetén a PLB elválk a SERCA2a-ról, így annak gátló hatása megszűnik. (Jeffry és mtsai 1981, Eisner és mtsai 2012)

A legkisebb mértékben a szarkolemma  $\text{Ca}^{2+}$  pumpája és a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  uniportere járul hozzá az  $\text{Ca}^{2+}_i$  eltávolításához. Ezek a lassú folyamatok a teljes kapacitás 1-1%-át biztosítják (patkány és egér szívben). Patológias körülmények között, a magas  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció a mitokondrium túlzott  $\text{Ca}^{2+}$  terheléséhez vezet, amely apoptotikus folyamatokat eredményez citokróm c és a kaspázok felszabadításával (Bers 2000).

### 2.1.5. A $\text{Ca}^{2+}$ tranziens kialakításában résztvevő csatornák és pumpák

#### *Feszültségfüggő $\text{Ca}^{2+}$ csatornák*

Ezeken a csatornákon keresztül beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  váltja ki az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedését. Az elektrokémiai gradiens mentén beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  okozza a ryanodin csatornákon keresztüli kalcium indukált kalcium felszabadulást az SR-ból. A depolarizáció során megemelkedő membránpotenciál nyitja a csatornák ezen típusát. A nyitást eredményező membránpotenciál alapján megkülönböztethetjük alacsony feszültség aktivált T típusú csatornákat, valamint magas potenciál indukált L, N, P típusú csatornákat (Mikala és mtsai 1996). A két utóbbi nem található meg a szívizomban, ezek főként a központi idegrendszerben fordulnak elő. Szívizomban a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulásért az L típusú csatorna felelős. A szív munkaizomrostok T-tubulusaiban fordul elő nagyobb koncentrációban. Viszonylag magas membránpotenciálnál aktiválódik (-40 mV), majd lassú inaktivációt mutat (Nowycky és mtsai 1985). Ezek mind feszültségfüggő, mind  $\text{Ca}^{2+}$  dependens mechanizmusok szabályozzák. A molekula több alegységből áll:  $\alpha 1$ , maga a csatornát képező fehérje, rajta keresztül áramlik be a  $\text{Ca}^{2+}$  és ide kötődnek a  $\text{Ca}^{2+}$  antagonisták; erősen glikolizált  $\alpha 2$ ; a  $\beta$  a szabályzásban vesz részt és hasonlóan az  $\alpha 1$  alegységhez, foszforilálhatja a protein kináz A és a protein kináz C (PKC), továbbá még megkülönböztetünk  $\gamma$ ,  $\delta$  alegységeket. Az  $\alpha 1$  alegység alakítja ki a pórust, amely 6 transzmembrán régióból áll, és a "gating" (kapuzás) mechanizmusért felelős (Hosey és mtsai 1996, Tianyan és mtsai 1997).

A csatornát különböző molekulák gátolhatják, ezek közé tartoznak a dihidropiridinek, fenilalkilaminok, benzotiazepinek, difenilmetilpiperazinok. A dihidropiridinek (DHP) affinitása és specificitása a legnagyobb a csatornához, emiatt gyakran nevezik DHP receptoroknak (DHPR) is. A csatorna működését befolyásolhatja továbbá az alacsony pH, valamint a PKA is (Hosey és mtsai 1996).

A  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatására a receptorhoz kapcsolt heterotrimer  $G_s$  protein aktiválja az adenilát ciklázot, ami növeli a ciklikus AMP (cAMP) mennyiségét. A cAMP fokozza a PKA aktivitását, ami foszforilálja a csatorna egyes alegységeit, így megnöveli a működő DHPR mennyiséget és a csatornák konduktanciáját. A koffein hatása is ezen

a rendszeren keresztül történik, ugyanis gátolja a foszfodiészteráz enzimet, ami a cAMP magasabb koncentrációjához vezet.

A csatorna szabályzásában a cGMP rendszer is részt vesz, ami protein kináz G-t (PKG) aktivál. Ez defoszforilálhatja a DHP receptorokat, valamint stimulálhatja cAMP foszfodiészterázt, ami a cAMP szint csökkenéséhez vezet (Hosey és mtsa 1996, Treinys és Jurevicius J. 2008).

A foszfolipáz C is módosíthatja a csatorna működését. Aktiválódása után elhasítja a foszfatidilizozitol-4,5-bifoszfát (PIP<sub>2</sub>) molekulát, így inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) és diacilglicerol (DAG) képződik. Az IP<sub>3</sub> az intracelluláris raktárakból Ca<sup>2+</sup> -t szabadít fel, míg a DAG protein kináz C-t (PKC) aktiválja. Mindkét folyamat szerepe a csatornák szabályzásában nem egyértelmű. A foszfolipáz C és a foszfolipáz A hatására keletkező a metabolitok egyrészt csökkenthetik (arachidonsav), másrészt növelhetik (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>) az L és T típusú csatornák Ca<sup>2+</sup> áteresztő képességét. (Huang 1989, Huang és mtsai 1990).

Az acetilkolin, az adenosin és hisztamin egymáshoz hasonlóan nem direkt módon gátolják a csatorna működését, hanem csökkentik a β-adrenerg stimuláció serkentő hatását. G<sub>i</sub> protein aktivációján keresztül csökkentik a G<sub>s</sub> protein által fokozott adenilát cikláz működést, így a cAMP-t képző hatását. Az előbbiekkal ellentétben a calcitonin gene-related peptid (CGRP) serkenti a Ca<sup>2+</sup> beáramlást, szintén a cAMP útvonal segítségével (Hosey és mtsa 1996, Tianyan és mtsai 1997).

A T típusú csatornák a szív munkaizomzatában csak kismértékben vannak jelen, jelentőségük csekély. A T-típusú csatornák szerepe inkább kóros állapotokban (szívhipertrófia) nő meg. Előfordulásuk alapján, mivel a sinuatrialis csomóban számuk magas, a szív pacemaker aktivitásában játszhatnak szerepet. Alacsony membránpotenciálnál már aktiválódnak és gyorsan inaktiválódnak. Ca<sup>2+</sup> dependens mechanizmusok nem befolyásolják a csatorna inaktivációját, valamint a pH csökkenésre és a β-adrenerg stimulációra sem reagál. Specifikus gátlója a Ni ion. A negatív membránpotenciálnál bekövetkező aktivációjuk miatt feltételezhető hogy a pacemaker sejtek korai depolarizációjában vesznek részt (Cribbs 2010, Hagiwara és mtsai 1988).

*Ryanodin receptorok*

A kontrakcióhoz szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  nagy része ezen a nagy konduktanciájú, mérsékelten szelektív kationcsatornán keresztül szabadul fel a SR-ból. Ez a csatorna bi- és monovalens kationokra egyaránt permeabilis. Háromféle izoformája ismert, melyből a szívben a RyR2 található meg. Nevét onnan kapta, hogy a ryanodin nevű növényi alkaloidát nagy affinitással köti. Nagy affinitású négy alegységből álló makromolekula, melynek citoplazmába benyúló része, a „láb” rész a szarkolemmában elhelyezkedő feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákkal létesít kapcsolatot. Ezt az is elősegíti, hogy a ryanodin receptorok nagy koncentrációban a SR ún. junkcionális részén, a szarkolemma betüremkedéseire, a T-tubulusokhoz közel vannak. Így mind a DHP receptorok, mind a ryanodin receptorok térben egymáshoz közel helyezkednek el, ami az  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentrációemelkedés gyorsaságát és mértékét egyaránt növeli. A ryanodin receptor a SR luminális részén kapcsolatban van a kalszekvesztrinnel, ami nagy mennyiségben képes tárolni  $\text{Ca}^{2+}$ -t, ezáltal egyrészt megkönnyíti az elektrokémia gradiens ellenében történő  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztrációt, másrészt a térbeli kapcsoltság miatt meggyorsítja a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást (Bers és Perez-Reyes 1999, Coronado és mtsai 1994, Franzini-Armstrong és Protasi 1997).

A csatorna kétféle módon aktiválódhat: az akciós potenciál során létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlással, valamint feszültségfüggő úton. A szívben egy L típusú csatorna több ryanodin csatornához kapcsolódik, míg a vázizomban szorosabb kapcsolat jön létre egy-egy csatorna között. Ha a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok akkumulálódnak a ryanodin receptor citoplazmatikus oldalán, akkor aktiváció következik be, és a luminális oldalon a receptorral szoros kapcsolatban lévő kalszekvesztrin molekulákból jelentős mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  szabadul fel ( $\text{Ca}^{2+}$  indukált  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás, CICR). Ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}$  jelentős mértékű felszaporodása a citoplazmatikus térben gátolja a ryanodin receptoron keresztül történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást (Bers és Perez-Reyes 1999, Coronado és mtsai 1994, Franzini-Armstrong és Protasi 1997).

A ryanodin receptor áteresztőképességét befolyásolják még egyéb tényezők is. Az adenin nukleotidok: mM-os koncentrációban növelik a csatorna nyitott állapotának valószínűségét. A  $\text{Mg}^{2+}$  mM-os tartományban gátolja a csatornát, míg a koffein: mM-os mennyiségben fokozza a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást. A koffein fokozhatja a csatorna  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását, így növeli a CICR mechanizmus hatékonyságát. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin fokozza

a  $\text{Ca}^{2+}$  ryanodin receptorra kifejtett hatását (Bers és Perez-Reyes 1999, Coronado és mtsai 1994, Franzini-Armstrong és Protasi 1997).

### *IP<sub>3</sub> receptorok*

A SR membránjában, illetve egyes elméletek szerint annak egyik szubpopulációjában, a kalcioszómákban helyezkedik el ez az inozitol-1,4,5-trifoszfátot kötő,  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást lehetővé tevő csatorna. A  $G_q$  fehérjéhez kapcsolt, PLC-útvonalon képződő másodlagos hírvivő molekula, az  $\text{IP}_3$  aktiválja. Szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat a RyR2 szerkezetével, bár molekulatömege sokkal kisebb. Konduktanciája kisebb, mint a ryanodin receptoré, ezért szerepe fiziológiai körülmények között elhanyagolható a szívizomban. Monovalens és bivalens ionok egyaránt transzportálódhatnak rajta. Működését hasonló módon szabályozza a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció, mint a ryanodin csatornát: magas koncentrációk gátolják, alacsonyak serkentik, ugyanakkor koffein gátolja a receptor aktiválódását (Bezprozvanny és mtsai 1994, Marks 2000). Szívelégtelenségben szerepe megnő, upregulációja miatt képes kisegíteni a downregulálódott ryanodin csatornák  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadításában végzett csökkent tevékenységét (Go és mtsai 1995).

### *A szarkoplazmás retikulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáza*

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ciklikus változásának fenntartásában kiemelkedő szerepet játszik a  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztrálásáért 92%-ban felelős, a szarkoplazmás retikulum membránjában elhelyezkedő transzmembrán transzporter fehérje. Nagy affinitással köti a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, ugyanakkor kapacitása alacsony. A nagy affinitás lehetővé teszi, hogy alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció esetén is működjön. A  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítás az elektrokémiai grádiens ellenében energiaigényes folyamat, emiatt a pumpa ATP-t hidrolizál. Az ATP kötése után  $\text{Ca}^{2+}$  kapcsolódik a fehérjéhez, ami lehetővé teszi az ATP bontását, melynek terminális foszfátcsoportja  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon áttevődik a pumpa három funkcionális doménje közül a fluoreszcein-izocianátot (FITC) kötő helyére, és ennek következtében a fehérje konformáció változást szenved. A folyamathoz szükséges  $\text{Mg}^{2+}$  jelenléte is. A konformációváltozás során a  $\text{Ca}^{2+}$  kötött rész a membrán ellentétes oldalára transzlokálódik. A  $\text{Ca}^{2+}$  akkor válik le, mikor az ATP hidrolizáció során képződött degradációs termékek disszociálnak és helyükre egy újabb ATP kötődik. A folyamat energiaigénye alacsonyabb, mint a később említendő  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  kicserélőé (NCX),

ugyanis 2  $\text{Ca}^{2+}$  transzportálását végzi egy ATP bontásával (Andersen és Vilsen 1998, Carafoli 2002).

A pumpa szabályzását számos tényező végzi. Az egyik a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin rendszer, amely direkt módon a pumpához kapcsolódva, vagy indirekt módon az általa aktivált protein kinázon keresztül foszforilálva a fehérjét fokozza a működését. Egyrészt megnöveli a pumpa  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását, másrészt gyorsítja a defoszforilációs-foszforilációs ciklus sebességét, így fokozza a pumpa működését (Odermatt 1996). A pumpát foszforilálhatja még a cAMP függő kináz, a PKA és a cGMP dependens kináz, a PKG. Mindkét folyamat a foszforiláció révén fokozza a pumpa működését. A gátló folyamatok a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin antagonizmus révén fejtik ki hatásukat (Odermatt 1996).

A legnagyobb mértékben a foszfolambán nevű fehérje befolyásolja a pumpa működését. A foszfolambán a SR-ban található integráns membránfehérje, amely defoszforilált állapotban gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpa működését (Odermatt 1996). A gátlás alól háromféle mechanizmus képes felszabadítani:

1.  $\beta$ -adrenerg stimuláció, amely során cAMP közvetítésével a foszfolambán foszforilálódik a Ser16 pozícióban.
2. Kalmodulin, mely az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedés hatására kalmodulin-dependens kináz közvetítésével foszforilálja a foszfolambánt a Thr17 pozícióban.
3. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint a pumpa molekuláris konfigurációját megváltoztatva növeli a transzport sebességét.

Mindhárom mechanizmus aktiválódik  $\beta$ -adrenerg stimuláció esetén, így fokozva az SR  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét, amely egyrészt elősegíti a gyorsabb relaxációt, másrészt az SR  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmát növelve a megemeli a következő depolarizáció esetén kialakuló  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentrációt (Odermatt 1996).

#### *Szarkolemmális kalcium ATP-áz*

A kontrakcióhoz szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  nagy részben az intracelluláris raktárakból származik, ugyanakkor a CICR-t indukáló  $\text{Ca}^{2+}$  a szarkolemmán keresztül lép be a citoplazmába. A hosszútávú egyensúly fenntartásához szükséges a nettó belépő  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiséget nullán tartani. Ezt két csatorna biztosítja: az egyik, a  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő, amely a folyamat nagy részét végzi, a másik a szarkolemmális  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz, amely nagy  $\text{Ca}^{2+}$  affinitása

révén alacsony koncentráció esetén is képes fenntartani  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítását. A pumpa felépítésében és működésében számos hasonlóságot mutat a SERCA-val:

1. három funkcionális doménnel rendelkezik
2. működése során ugyanazon ciklusokon megy keresztül, és
3.  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását és transzportsebességét a kalmodulin serkenti.

Gátló hatást fejt ki rá a vanadát és számos hormon is (Andersen és Vilsen 1998, Carafoli 1991).

#### *$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ kicserélő (NCX)*

A depolarizáció során az extracelluláris térből bejutó  $\text{Ca}^{2+}$ -t egy nagy kapacitású, alacsony affinitású karrier protein távolítja el. A folyamathoz a  $\text{Na}^+$  koncentrációkülönbsége biztosítja a megfelelő energiát. Egy  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításáért cserébe három  $\text{Na}^+$  juttat az intracelluláris térbe az elektrokémiai grádiensnek megfelelően. Tehát a kicserélő a magas intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció esetén a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítását végzi, ugyanakkor a depolarizációt követően a membrán közelében kialakuló ionkoncentrációk esetén retrográd módon is működhet, ezzel támogatva a DHP receptoron keresztül történő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást. A  $\text{Na}^+$  grádiens fenntartásáért a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa felelős, így közvetve a  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő 1 ATP-t használ fel 1  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításához. Míg a  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz egy ATP hidrolizálásával 2  $\text{Ca}^{2+}$ -t távolít el, addig a NCX csak egyet, így energetikailag gazdaságatlanabb. A magas intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció és a negatív töltésű foszfolipidek jelenléte serkentő, míg a magas intracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentráció és a pozitív töltésű detergens gátló hatást fejtenek ki (Blaustein és Lederer 1999).

#### *Mitokondriális csatornák*

A mitokondrium is képes jelentős mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$ -t tárolni. Ennek nagy szerepe van patofiziológiás körülmények között, amikor az extramitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$ -szint pufferolásával mintegy időt ad a sejtnek arra, hogy rendezze a túlzott mértékű ionbevittelt. Ugyanakkor az intramitokondriális magas  $\text{Ca}^{2+}$  szint apoptotikus folyamatokat indíthat be (Duchen 1999).

A mitokondrium külső membránján a  $\text{Ca}^{2+}$  egy kationszelektív csatornán keresztül lép a két membrán közötti térbe. A belső membránon a mega-csatornán (multiple



conductance channel, MCC), és főképp egy elektroforetikus uniporterrel keresztül jut be a  $\text{Ca}^{2+}$  a mátrixba, melyet a membránpotenciál hajt. A felvételt  $\text{Mg}^{2+}$  fiziológiás koncentrációja gátolja, míg  $\alpha_1$ -adrenerg stimulus serkenti (Duchen 1999).

A  $\text{Ca}^{2+}$ -t egy elektroneutrális  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő távolítja el a mitokondriumból, amihez a  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  kicserélő biztosítja a megfelelő iongrádiénst. A transzport tehát nagymértékben függ a protongrádiénstől és a pH-tól. A transzporter működését a magas extramitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  vagy  $\text{Mg}^{2+}$  szint gátolja,  $\beta$ -adrenerg agonisták és glukagon serkentik (Duchen 1999).

## 2.2. Kardiomiopátia

A kardiomiopátiák gyakran vezetnek kardiovaszkuláris halálhoz vagy fokozatos, szívelégtelenségbe torkolló állapotromláshoz (Maron és mtsai 2006).

A kardiomiopátiák osztályozása nehéz, számos kórfolyamat több kategóriában is szerepelhet, mivel a kórfolyamat progressziójával a szív szerkezeti és funkcionális változásokon mehet keresztül. A diagnosztikai eszközök, a molekuláris biológia, a genetika fejlődésével egyre több folyamat háttérre derül fény, emiatt a korábban idiopátiás csoportba sorolt kardiomiopátiák genetikai vagy metabolikus eredetét ismerjük meg. Ennek ismeretében módosította az Európai Kardiológiai Társaság (The European Society of Cardiology) a korábbi klasszifikációt. A kísérleteinkben vizsgált szívelváltozások a kardiomiopátiák két csoportjába tartoznak, a familiáris és a nem familiáris alcsoportot reprezentálják (Elliot és mtsai 2008).

Az American Heart Association által megalkotott osztályozás szerint a primer kardiomiopátia azokra a betegségekre értendő, amiben a szív egyedül vagy dominánsan vesz részt, míg szekunder kifejezés alatt olyan szívdiszfunkciót értünk, amely egy szisztémás rendellenesség része (Maron és mtsai 2006). Ennek a klasszifikációnak a hátránya az, hogy a primer kardiomiopátiák gyakran járnak együtt extrakardiális manifesztációval, valamint számos, a szekunder kardiomiopátiák közé sorolt elváltozás csak a szívben jelenik meg (Elliot és mtsai 2008).

Ezek alapján a kardiomiopátiát úgy definiálhatjuk, hogy azok a miokardiális eltérések tartoznak ide, amelyben a szívizom strukturálisan és funkcionálisan rendellenes,

ugyanakkor nem tapasztalható az ezt kiváltani képes koronária betegség, hipertenzió, billentyű betegség valamint veleszületett szívbetegség (Elliot és mtsai 2008).

### **2.2.1. Neuroendokrin hatások szívelégtelenségben**

A kardiomiopátiák egyes eseteiben először a szívizomzat hipertrofizál, és ez a strukturális és funkcionális változás még képes a szívelégtelenségben lezajló molekuláris eltérések kompenzációjára. A betegség progressziójával kimerülnek azok a tartalék kapacitások, amik képesek fokozni a kontraktilitást, ezért klinikailag is észlelhető szívelégtelenség alakul ki. Ebben a stádiumban a szívkamrák kitágulnak, ami a patológiás folyamatok circulus vitiosusát indítja el. A nagyobb kamraátmérőnek köszönhetően a szív előterhelése megnő, így a Frank-Starling mechanizmus alapján még képes részben kompenzálni a szisztolés diszfunkciót. Mivel a pumpafunkció elégtelen marad, és így a központi szervek perfúziós nyomása elégtelen, ezért az utóterhelés irányából is kompenzációs mechanizmusok indulnak el. Ennek érdekében vazokonstriktív jelentkezik a rezisztencia ereken, ami a vérnyomás emelkedéséhez járul hozzá. Mind az elő- és utóterhelést fokozó, mind a kontraktilitást növelő folyamatok rövidtávon ugyan elősegítik a szívdiszfunkció kompenzálását, de hosszú távon hozzájárulnak a betegség progressziójához. A nagyobb falfeszülés fokozza a szívizom oxigénigényét, valamint autokrin, parakrin, és endokrin folyamatokat indít be. Bizonyos feszülésszenzitív receptorokon keresztül elindítja a remodeling folyamatát, amely a kardiomiopátiák progressziójának kulcsmomentuma.

#### *Szimpatikus stimuláció*

Régóta ismert, hogy a szimpatikus idegrendszer aktivitása szívelégtelenségben magasabb. A szívelégtelenségben szenvedő betegekben gyakran magas noradrenalin szintet mértek és ennek a szintje korrelál a szívelégtelenség progressziójával. A szív szisztolés diszfunkciója miatt, kompenzációs mechanizmusként aktiválódik a szimpatikus rendszer. Növeli a kontraktilitást és az utóterhelést, aktiválja a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert (RAAS), ami végső soron elindítja a remodeling folyamatát. A szimpatikus stimuláció miatt magasabb utóterhelés a nagyobb kamrai átmérő mellett kóros mértékű falfeszülést eredményez, amely az oxigénigény növekedése miatt relatív oxigénhiányhoz vezet.

A fokozott szimpatikus aktivitás a szívelégtelenség kezdeti stádiumában előnyös hatású: növeli a kontraktilitást és a szívfrekvenciát, és így nagyobb perctérfogatot eredményez,

a perifériás ereket összehúzva centralis redisztribúciót eredményez. A vese ereinek konstriktója víz és só visszatartáshoz vezet, ami növeli az intravaszkuláris folyadék volument (Anand 1999, Jackson és mtsai 2000). Ugyanakkor a tartós szimpatikus aktiváció a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszeren keresztül fokozott só és folyadék retenciót okoz, ami növeli a elő és utóterhelést. Ezek a folyamatok tovább növelik a szív oxigén igényét, ami kimeríti a csökkent arteriovenozus oxigénrezerv kapacitását. Ez, és a perivaszkuláris, valamint az intercelluláris fibrózis okozta megnövekedett diffúzió távolság miatt csökken a szívizomsejtek oxigénellátottsága, ami a kontraktilitás csökkenéséhez vezet. A magas szimpatikus aktivitás megnöveli az aritmia készséget is, ami növeli a hirtelen szívhalál esélyét (Anand 1999, Jackson és mtsai 2000).

A tartós szimpatikus aktivitás hatással van a saját receptoraira is. A különböző típusú adrenoreceptorok denzitása változik a szívelégtelenség progressziójával. A  $\beta_1$  receptor a hosszútávú ingerlés hatására deszenzitizálódik és downregulálódik, így további szimpatikus aktiváció már nem fejt ki hatást a szívre. A  $\beta_2$  receptor viszonylagos denzitása fokozódik a  $\beta_1$  receptorok számának csökkenésével. A  $\beta_2$  receptorok egészséges szívben kiegészítő szerepet töltenek be, hatásuk nem kifejezett, ugyanakkor szívelégtelenségben mikor szerepük megnő, a  $\beta_1$  receptortól eltérően negatív inotróp és antiapoptotikus választ eredményeznek, amit a heterotrimer  $G_i$  proteinen keresztül cAMP csökkenés okoz.  $\beta_1$  receptorok túlzott aktivációja apoptózishoz, nekrozishoz és  $Ca^{2+}$  szabályzó enzimek downregulációjához vezet (Anand 1999, Bristow és mtsai 1989, Schrier és Abraham 1999,), ugyanakkor a  $\beta$ -adrenerg rendszer deszenzitizációját okozó  $\beta$ ARK1 gátlása megelőzi a szívelégtelenség kialakulását a dilatatív kardiomiopátia állatmodelljében (Esposito és mtsai 2000).

A fentiekből következik, hogy milyen előnyös hatással rendelkeznek a  $\beta$  receptor blokkolók szívelégtelenségben. Klinikai vizsgálatok jelentős mortalitáscsökkenésről számolnak be alkalmazásuk során. A  $\beta$  receptor blokkolók antiaritmias hatásúak, csökkentik az renin-angiotenzin rendszer aktivációját, így csökkentik a remodelinget. A szívfrekvencia csökkentésével alacsonyabb lesz a szívizomsejtek oxigénfogyasztása, és a falfeszülés csökkentésével az oxigénigény. A  $\beta$  receptorok gátlásával az apoptotikus folyamatok is csökkennek (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999).

*Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer*

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválódik szívelégtelenségben, de ennek mértéke változik esetenként. Magasabb angiotenzin szintet a szívelégtelenség előrehaladottabb stádiumában lehet mérni. A renin a vese juxtaglomeruláris sejtjeiben termelődik. Ezek a sejtek  $\beta_1$  receptorokkal rendelkeznek, és szimpatikus aktiváció hatására renint termelnek, amely felszabadulva a vérben keringő angiotenzinogént elhasítja. Az angiotenzinogénből angiotenzin I keletkezik, majd az érendotélben elhelyezkedő (főként a tüdő ereiben) angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hatására angiotenzin II keletkezik (ATII). Az angiotenzin II különböző útvonalakon keresztül emeli a szív elő- és utóterhelését. A rezisztencia erek összehúzásával növeli a vérnyomást, az utóterhelést. Indirekt módon is hozzájárul az előterhelés növekedéséhez. Fokozza a mellékvesekéreg aldoszterontermelését, ami víz és só retenciót eredményez. Folyadékretenciót okoz a vazopresszin termelés stimulációja is. Aktiválja az agy szomjúságközpontját is, ami szintén elősegíti az intravaszkuláris folyadék mennyiség növekedését, ami növeli a szív előterhelését. Pozitív visszacsatolásként stimulálja a szimpatikus idegrendszer működését, úgy hogy gátolja a noradrenalin visszavételét az idegvégződéseknél (Dzau 1993, Unger és Li 2004).

Ezek a hatások kezdeti stádiumban jótékony hatásúak, segítenek fenntartani az életfontosságú szervekben a perfúziós nyomást, a glomeruláris filtrációt, az előterhelés növelésével a perctérfogatot. Ugyanakkor ezek a hatások hosszabb távon károsak, ugyanis az elő- és utóterheléssel növelik a szív oxigénigényét, ami relatív oxigénhiányt eredményez. A szívizomban RAAS által indukált remodeling során maladaptív mechanizmusok aktiválódnak. Az így indukálódott folyamatok próbálják csökkenteni a falfeszülést az izomsejtek hipertrófiájával. Apoptotikus programok is aktiválódnak angiotenzin II hatására (TNF $\alpha$  közvetítésével), majd az oxigénhiány okozta nekrozis és az apoptózis során elhalt sejtek helyén, valamint az intercelluláris térben kötőszövet képződik. Ezek a folyamatok a kamradilatáció fokozódásához és a kontrakciós erő csökkenéséhez vezetnek. A falfeszülés növekedése indukálja a pitvari nátriuretikus peptid (atrial natriuretic peptid, ANP), és az agyi eredetű nátriuretikus peptid (brain natriuretic peptid, BNP) szekrécióját, ami gátolja a renin termelését, másrészt funkcionális antagonistaként vasodilatációt, és nátri- és diurézist okoz (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999).

A szisztémás RAAS-en kívül létezik egy hasonlóan nagy jelentőségű autokrin és parakrin hatásmechanizmusú rendszer, a szöveti renin-angiotenzin rendszer. A szöveti rendszer kimutatható számos szerv sejtjeiben (agy, endotél, szívizom és kardiális fibroblasztok). Az ATII képződése más útvonalat is igénybe vehet a klasszikus angiotenzin konvertáló enzimen kívül. Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül az intracelluláris intracardiális renin-angiotenzin rendszer (RAS), de ennek részletei még további kutatásokat igényelnek. Aktivitásuk reaktív oxigén gyökök és NO termeléséhez is egyaránt hozzájárul (Kumar és mtsai 2012). A renin forrása lehet szisztémás és lokális. Angiotenzin I – Angiotenzin II átalakulást helyileg termelődő ACE biztosítja, valamint létezik egy ACE gátlók által nem befolyásolható kimáz mediált útvonal is. Feszülés hatására indukálódik a szöveti RAS rendszer. Hatására a szívizom átépül, hipertrófiát és sejproliferációt okoz. Fokozza a szív kontraktilitását (Paul 2006). A szövet renin-angiotenzin rendszer, hasonlóan a szisztémás rendszerhez kardiális szövetátépülést okoz, ami a kardiomiopátia progressziójához és végeredményként szívelégtelenséghez vezet.

#### *Angiotenzin receptorok*

Az angiotenzin II hatását az agiotenzin receptorokon (AT) keresztül fejti ki. Két altípusa van: az AT1, ami főként az érrendszerben fordul elő, és az AT2, amely a miokardiumban található (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999).

#### *Aldoszteron*

A mellékvesében képződő aldoszteron termelést indukálja a renin-angiotenzin rendszer. Az aldoszteron a vese disztális kanyarulat csatornájában és a gyűjtőcsatornában só és víz reabszorpciót eredményez. Ennek hatása egészséges alanyokban időleges, ugyanakkor szívelégtelenségben a só és vízretenció tartósabb, mivel ebben az esetben nem indul be a kompenzációs mechanizmus. Normál egyedekben a renin-angiotenzin által indukált aldoszteron termelés fokozza a só és vízretenciót, ennek következményeként a vese gyűjtőcsatornáiba több  $\text{Na}^+$  kerül. A több kiürülő  $\text{Na}^+$  egyensúlyi helyzetet eredményez, és így megállítja az antidiuretikust hatást. Ugyanakkor szívelégtelenségben a fokozott szimpatikus aktivációnak és a magasabb angiotenzin II koncentrációnak köszönhetően a proximális tubulusok  $\text{Na}^+$  reabszorpciója megnő, így a gyűjtőcsatornába már kevesebb  $\text{Na}^+$  kerül. Ennek

következtében szívelégtelenségben fennmarad a  $\text{Na}^+$  retenció, ami az extracelluláris folyadék mennyiségét megnöveli (Schrier és Abraham 1999).

#### *Natriuretikus peptidek*

A szív képes nátriuretikus és diuretikus sajátosságokkal rendelkező peptidek szekréciójára. A szívpitvarokban termelődik az ANP, amely kiváltó ingere a falfeszülés fokozódása,  $\beta$ -adrenerg, ATII és endotelin (ET) stimuláció is. A szívben a BNP a kamrákban szekretálódik a töltőnyomás változás hatására. A harmadik típus a C típusú nátriuretikus peptid (C-type natriuretic peptid, CNP), amely főként az érrendszerben és a központi idegrendszerben játszik szerepet (Boomsma és van den Meiracker 2001, Jackson és mtsai 2000, Schrier és Abraham 1999). Az ANP pitvari termelődése szívelégtelenségben fokozódik, és elindul a kamrai szekréciója is. A BNP szekréciója is nő és koncentrációja a plazmában korrelál a szívelégtelenség progressziójával. Az ANP és a BNP nátriuretikus és diuretikus hatását számos mechanizmuson keresztül fejt ki. Indirekt módon renin és aldoszteron antagonizmussal fejt ki ezt a hatást. Direkt mechanizmussal növeli a glomeruláris filtrációt az efferens arteriola konstriktójával és az afferens arteriola dilatációjával, és csökkenti a  $\text{Na}^+$  reabszorpciót a proximális kanyarulatos és a gyűjtő csatornában, ami szintén a diurézis növekedéséhez vezet (Boomsma és van den Meiracker 2001, Schrier és Abraham 1999). A nátriuretikus peptideknek nem csak diuretikus hatásuk van, rendelkeznek vazodilatációs tulajdonságokkal, gátolják a noradrenalin felszabadulást, valamint elősegítik a folyadék átrendeződést az intravaszkuláris térből az interstícium felé. Ezek a hatások egyaránt csökkentik az elő- és utóterhelést. A nátriuretikus peptidek az angiotenzin II hatását antagonizálva csökkentik a miokardiumban a mitogén aktivitást, redukálják a fibroblaszt számot, így gátolják az átépülést, csökkentik a szívelégtelenség progresszióját (Boomsma és van den Meiracker 2001, Ferrara és mtsai 2002, Schrier és Abraham 1999).

#### *Arginin-Vazopresszin*

Szívelégtelenségben alapvetően káros hatásokkal bír, melyek ugyan eredetileg kompenzációs jelleggel jelennek meg. Vízretenciót (V2 receptor, gyűjtőcsatorna) és vazokonstriktiót (V1 receptor, érsimaizom) okoz, de emellett mitogén aktivitással is bír, ezáltal a korábban említett RAAS hatását erősíti (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999). A vazopresszin koncentrációja a szívelégtelenség korai stádiumában nem minden esetben emelkedett. A vazopresszin szekréciója az ozmoreceptorok aktivitásától

függ, amely szívelégtelenségben, az aktiválódó egyéb vízretenciót okozó faktorok, és az így kialakuló hipo-ozmolaritás miatt alacsony szinten van. Ugyanakkor a hormon kiválasztódását más tényezők is befolyásolják. Ilyenek a mechanoreceptorokból érkező ingerület, valamint az angiotenzin II serkentő és az ANP gátló hatása. A szekréciót növelő impulzusok túlsúlya esetén, még hipo-ozmolalitás fennállásakor is a vazopresszin szintje megnő a szívelégtelenség előrehaladott szakaszában (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999).

### *Endotelin*

Az endotelin a renális és szisztémás erek endotéljében termelődik, vazokonstriktor hatású és mitogén aktivitással is bír. A keringő endotelin koncentrációja a szívelégtelenség progressziójával arányosan emelkedik (Pacher és mtsai 1996). Az angiotenzin II, a noradrenalin, az arginin-vazopresszin és az egyes citokinek fokozzák az endotelin szekréciót (Braunwald 2011). Az endotelin autokrin és parakrin módon hat a szívizom és a vese ereire. A szisztémás vazokonstriktió emeli az utóterhelést, a renális érösszehúzódás vízretenciához vezet, ami növeli az előterhelést. A szívben termelődő endotelin autokrin és parakrin útvonalon fokozza a szívizomban lezajló remodelinget és az ET<sub>1</sub> receptoron keresztül apoptózishoz, szívizomhipertrófiához vezet, ami tovább súlyosbítja a szívelégtelenséget (Anand 1999, Boomsma és van den Meiracker 2001).

### *Prosztoglandinok*

A prosztoglandinok szisztémás hatása elhanyagolható, főként parakrin és autokrin módon befolyásolják az érintett sejteket. Szívelégtelenségben jelentőségük a vese afferens arterioláiban van, ahol szimpatikus idegrendszeri aktivitás, és következményesen aktiválódó RAAS hatására termelődnek és tágítják azokat. Ennek következtében nő a glomerulus filtráció. A vese disztális tubulusaiban gátolják a Na<sup>+</sup> transzportot, így elősegítik a Na<sup>+</sup> kiválasztást. Összegezve, a prosztoglandinok segítik megőrizni a glomeruláris filtrációt a szívelégtelenség előrehaladott stádiumaiban is (Anand 1999, Schrier és Abraham 1999).

### *Citokinek*

A citokinek a szervezet számos sejtjében termelődnek, immun és gyulladásos folyamatok mediálásában vesznek részt. Egyes citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) ugyanakkor szerepet játszanak a szívelégtelenség kialakulásában (Sharma és mtsai 2000). Magasabb koncentrációjukat dekompenzált stádiumban figyelték meg. Részt

vesznek a remodeling folyamatában, indukálják a hipertrófiát, az apoptózist, az extracelluláris mátrix megváltozását. (Gullestad és mtsai 2012). A miociták és főként a miokardiumban elhelyezkedő fibroblasztok által termelt TGF- $\beta$  szintézise kardiomiopátiában megnő. Termelését fokozzák a mechanikai ingerek és az ATII. A TGF- $\beta$  kulcsfontosságú a sejt növekedésben és differenciálódásban, valamint a szöveti átépülésben. Fokozza a szívizom kötőszövetes átépülését, a fibroblasztok számát és azok kollagén termelését. A szívelégtelenségben lezajló kompenzációs mechanizmusok közül a főtális génváltást is támogatják. Ennek során a kontraktilis és szabályzó fehérjék embrionális izotípusa jelenik meg, ezzel segítve a romló szívfunkciót (Dobaczewski és mtsai 2010, Lim és Zhu 2006, Teekakirikul és mtsai 2010).

### *IGF-1*

Az elülső hipofízis lebeny által termelt növekedési hormon az IGF-1-en (insulin-like growth hormon-1) keresztül fejt ki hatását, ugyanakkor a szívizomsejtek is képesek IGF-1-et termelni, tehát autokrin és parakrin mechanizmussal is képes befolyásolni a szívizomsejt metabolizmusát. Egyes kutatások alapján feltételezhető, hogy szívelégtelenségben kardioprotektív hatású. Mérések szerint a frakcionális rövidüléssel párhuzamosan csökken lokális koncentrációja (Al-Obaidi és mtsai 2001). IGF-1 szabályozza a miociták növekedését, protein szintézisét, és a génexpressziót. Elősegíti a hipertrófia kifejlődését, növeli a troponin I, a miozin könnyű lánc 2, és az  $\alpha$  aktin termelését (Castellano és mtsai 2009). Az előnyös hatásai mellett növeli a fibroblaszt kollagén termelését, így növeli a szív kötőszövetes átépülését. Az apoptózist ellenben csökkenti. Növeli a szívizom kontraktilitását számos mechanizmussal: növeli a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$  szenzitivitását, növelik a DHP receptorok aktivitását és SERCA2a fehérjék upregulációját. Ezek mind az intracelluláris raktárak  $\text{Ca}^{2+}$  tartalékát növelik, amely a magasabb  $\text{Ca}^{2+}$  csúcskoncentrációt eredményeznek (Calao és mtsai 2001, Lombardi és mtsai 2000, Ren és mtsai 1999).

## **2.2.2. Molekuláris változások kardiomiopátiában**

### *Kalcium-ion homeosztázis eltérések kardiomiopátiában*

Az ide vonatkozó humán adatok csak korlátozottan állnak rendelkezésre, aminek az oka a nehéz hozzáférhetőség. Transzplantáció során eltávolított humán szívekből izolált sejteken végzett vizsgálatok szolgáltatnak adatokat az esetleges molekuláris



elváltozásokról. Az eltávolított szívek a szívelégtelenség végstadiumában vannak, ezért csak következtetni tudunk az azt megelőző folyamatokat illetően. Humán adatok azt mutatják, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens csúcskoncentrációja csökken és a szekvesztráció folyamata lelassul, amely a SERCA2a és az azt szabályzó PLB érintettségére utal (Meyer 1995). A szívelégtelenség állatmodelljeit sokkal részletesebben tudjuk vizsgálni. Nem csak különböző kísérleti protokollokat használhatunk, de több kísérletes körülményt is vizsgálhatunk: izolált szív, sejt, in vivo. Ilyen kísérletek kimutatták a SERCA2a/PLB arány csökkenését (Koss és mtsai 1997). A SERCA2a aktivitását a PLB foszforiláltsága is befolyásolja. Humán és állatkísérletes adatok az mutatják, hogy mértéke csökken a szívelégtelenség progressziójával (Schmidt 1999, Schwinger 1999). A SERCA2a szekvesztrációs sebessége és  $\text{Ca}^{2+}$  affinitása csökken szívelégtelenségben, amit a PLB mennyiségi és foszforiláltsági változása próbál kompenzálni. MLP-KO egereken végzett kísérletek azt mutatják, hogy a PLB hiánya esetén a SERCA2a funkció visszatér a kiindulási szint közelébe (Minamisawa és mtsai 1999, Rockman és mtsai 1998). A PLB foszforilálódhat mind a PKA, mind a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin kináz által, tehát a szimpatikus aktiváció és a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése elősegíti a SERCA2a kapacitásának növekedését. A SERCA2a defektusa miatt csökken a  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció, ami a  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentráció növekedéséhez vezet. Ennek következtében az NCX expressziója nő, amely így lehetővé teszi a szarkolemmalis  $\text{Ca}^{2+}$  körforgás fokozódását és a SERCA2a funkciócsökkenésének kompenzálását (Isenberg 2001).

A szívelégtelenségben fellépő szisztolés diszfunkció aktiválja a szimpatikus rendszert, amely próbálja fenntartani a megfelelő perfúziós nyomást. Pozitív kronotróp és dromotróp hatást fejt ki a szív ingerképzősejtjeire, és inotróp hatást a szív munkizomsejtjeire. Növeli a szívfrekvenciát, ugyanakkor fokozza az aritmia hajlamot is. A perifériás rezisztencia növelésével és kontraktilitás növekedésével fokozza az utóterhelést és így a falfeszülést. Ez fokozott oxigénfelhasználáshoz, relatív oxigénhiányhoz vezet. Tehát a szimpatikus aktiváció kezdeti jótékony hatása későbbiekben a szívelégtelenség progresszióját idézi elő. A szívizomsejtek oly módon védekeznek ez ellen, hogy érzéketlenné válnak a noradrenalin hatására. A  $\beta$  adrenerg receptor aktivációját gátolja a receptor intracellulárisan termelődő  $\beta$  adrenerg receptor kináz 1 ( $\beta$ ARK1) és PKA általi foszforilációja. Az előbbi inkább a  $\beta_2$  receptor gátlásában, az utóbbi a  $\beta_1$  receptor foszforilációjában játszik szerepet. A  $\beta$  receptorok foszfoszforilációjuk során leválnak a  $G_{s,i}$  proteinről, amihez ezután a  $\beta$ -arresztin kapcsolódik. A  $\beta_1$  receptor  $G_s$ , a  $\beta_2$  receptor  $G_s$  és  $G_i$  proteinekhez is kapcsolódhat, emiatt

az utóbbi hatása kettős lehet. A  $G_s$  növeli, a  $G_i$  gátolja a PKA aktivációját a cAMP szintézis szabályzásán keresztül. A magasabb  $\beta$ ARK1 aktivitás elősegíti a  $\beta_2$  receptorok  $G_i$  proteinekhez történő kapcsolódását, és a fokozott PKA működés csökkenti az aktív  $\beta_1$  receptorok számát, emiatt szívelégtelenségben előtérbe kerül a  $G_i$  kapcsolt  $\beta_2$  funkció. A  $\beta_1$  adrenerg rendszer kiesésével az  $\alpha_1$  receptorok szerepe megnő, melyek a  $G_q$  fehérje mediált módon a ryanodin receptorokkal rokon  $IP_3$  receptorokon keresztül szabályozza a  $Ca^{2+}$  koncentrációt, valamint PKC aktiváción keresztül szívizomsejt hipertrófiához, főtális géneváltáshoz vezet (Hwang és mtsai 1996, Martin és mtsai 2003, Perez és Doze 2011).

A szívizomsejtekre számos növekedési hormon hat, melyek egyik mediátora az IGF-1. Az IGF-1-et a kardiomiociták is termelik, így hatását autokrin és parakrin mechanizmussal is kifejti. A növekedési hormonok hatására, valamint a heptahelikális receptorokon (ET-1, AT II,  $\alpha_1$ ), és a sejtmembrán feszülésérzékelő receptorain keresztül protoonkogének (c-fos, c-jun, c-myc) aktiválódnak. Az ET-1, az ATII és az  $\alpha_1$ -adrenerg aktiváció heterotrimer  $G_q$  proteinen keresztül PLC közvetítésével PKC aktivációt okoz, ami a MAP-kinázokat indukál. A feszülésérzékelő receptorok mechanikai inger hatására  $Ca^{2+}$ -okat engednek az intracelluláris térbe, amelyek kalcineurinnal komplexet képezve nukleáris faktor  $\kappa B$  aktivációt eredményeznek. Mindkét folyamat hatására aktiválódnak a szívizomhipertrófiát okozó gének, másrészt olyan gének, melyek az embrionális fenotípusba való visszatérést okozzák. Ennek részeként izoenzim váltások jönnek létre. A gyors típusú miozin nehéz lánc ( $V_1$ ) helyét mindinkább a lassú ( $V_3$ ) veszi át. A  $V_1$  típus két  $\alpha$  láncból áll, míg a  $V_3$  két  $\beta$  láncból. Az utóbbi lassabban bontja az ATP-t, emiatt csökkenti az ATP felhasználást, ennek következményeként a kontrakció is lassabb lesz, amely hozzájárul a szívelégtelenség mechanikai eltéréseihez (Schwartz és mtsai 1981). Ez a folyamat inkább csak rágcsálóknál jelentős, mivel emberben a lassú típus a domináns (90%) az egészséges szívben. Az embrionális fenotípus megjelenése során fokozódik az ANP és az BNP termelése, amely az erősebb falfeszülés miatt termelődik és diurézis és vazodilatáció előidézésével csökkenti az előterhelést és az utóterhelést (Glennon és mtsai 1995, Opie 2004).

A remodeling egyik fontos folyamata a szívizom kötőszövetes átépülése, amely során szisztémás és lokális mechanizmusok növelik a fibrociták számát és kollagén termelésüket. Kiemelkedő szerepe van benne a parakrin és autokrin módon termelődő faktoroknak (ATII, IGF-1 és az endotelin). A fibroblasztok és egyes tanulmányok

szerint a kardiomiociták (Schram és mtsai 2010) I-es és III-as típusú kollagén termelnek már a szívelégtelenség korai fázisában. A kollagénrostok növelik az intersticiális kötőszövet mennyiségét, átveszik a nekrotizált vagy apoptotizált sejtek helyét. A kollagénrostok felszaporodásával a szívizom mervebbé válik, ez diasztolés és szisztolés diszfunkciót eredményez. A kollagénben gazdag területen a inkompletté válnak a sejt-sejt kapcsolatok, ami az excitáció-kontrakció sérüléséhez, csökkent kontraktilitáshoz vezet.

#### *Subsztrát metabolizmus megváltozása*

Egészséges szívben és a szívelégtelenség korai stádiumában az ATP termeléshez szükséges energiát nagy részben a szabad zsírsavak (FFA) metabolizmusa biztosítja. Ez a folyamat sokkal több ATP termel, mint a glükóz bontása, ugyanakkor az oxigén igénye is nagyobb. A kardiomiopátia progressziójával nő a falfeszülés, aminek létrehozásához több oxigén fogyasztás is társul. A oxigén igény növekedését nem követi megfelelő angiogenezis, emiatt relatív oxigénhiány jön létre. Ez az enyhe hipoxia a glükózfelhasználást előnyben részesítő géneket indukálja (Huang és mtsai 2004). Szívelégtelenségben a FFA metabolizmus csökken (Sack és mtsai 1996), emiatt a glikolízis aránya fokozódik, amely csökkenti az oxigénfogyasztást, de kevésbé hatékony ATP produkciót eredményez (Harvey és Leinwand 2011).

### **2.2.3. Kezelési lehetőségek szívelégtelenségben**

Jelenleg a gyógyszeres terápia képezi a fő kezelési stratégiát. A következő gyógyszertípusok vannak használatban:

**Diuretikumok:** diuretikus és natriuretikus hatásuk van, a keringő folyadékmennyiség csökkentésével alacsonyabb lesz a szív előterhelése. Vazodilatációs hatással is rendelkeznek, ami a rezisztencia erek szintjén csökkentik az ellenállást, így csökken az utóterhelés is. A szívelégtelenségben aktíváló RAAS-rel antagonisztikus hatásúak a diuretikumok, és mivel a kiváltó tényezőt növelik, a RAAS aktivitását fokozzák.

**Angiotenzin-konvertáló enzim gátlók (ACE gátlók):** A vesében termelődő renin elhasítja angiotenzinogént, ezáltal angiotenzin I-et képez. Az ACE enzim által angiotenzin I-ből angiotenzin II keletkezik. Az ACE gátlásával csökken az angiotenzin II mennyisége. Előnye, hogy csökkenti RAAS káros hatásait: a folyadék és sóretenciót,

így az előterhelést, a vazokonstriktiót, ezáltal az utóterhelést, és a remodelinget is. A kötőszövetes átépülés gátlásával csökkentik a progressziót, így növelik a szívelégtelenségben szenvedő betegek túlélését. Hátrányuk, hogy csökkentik a bradikinin degradációját, amely gyakran nehezen elviselhető száraz köhögéshez vezet. A panaszok miatt gyógyszerváltás válhat szükségessé, ekkor angiotenzin receptor antagonisták lehet alkalmazni.

$\beta$  receptor gátlók: a tartós szimpatikus aktiváció miatt deszenzitizálódnak a szívizom  $\beta$  adrenerg receptorai. A  $\beta$  receptorok gátlása megállítja és részben visszafordítja ezt a folyamatot, így a deszenzitizáció miatt kialakuló káros folyamatok hatása is csökken. A szimpatikus aktivációt csökkentik, ami a RAAS-en keresztül kialakuló kedvezőtelen hatásokat is redukálja. Bizonyos szelektív  $\beta$  blokkolók javítják az inotrópiát, és csökkentik a kardiovaszkuláris mortalitást.

Pozitív inotróp szerek: ide tartozik a gyakran használt digitális. A digitális alkalmazása visszaszorulóban van, ugyanakkor fontos képviselője a pozitív inotróp szereknek. A digitális gátolja a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpát, ami az intracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentráció felhalmozódásához vezet. Mivel a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítás egy része a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélőn keresztül zajlik, amit a  $\text{Na}^+$  elektrokémiai grádiense hajt, ezért a magasabb intracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentráció a kicserélő működését lassítja ezáltal megemelve az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt. Ez vezet a kontraktilitás fokozódásához. Emellett csökkenti a fokozott szimpatikus tónust, növeli a paraszimpatikus aktivitást, mérsékli a RAS aktivitását, javítja a baroreceptor funkciót, és natriuretikus hatása is van. Digitális az összmortalitást nem változtatja meg, de a szisztolés diszfunkció miatti hospitalizációt csökkenti (Édes István 2000).

Spironolacton:  $\text{K}^+$  spóroló diuretikumok közé tartozik. Az aldosteron kompetitív antagonistája, tehát csökkenti a renin-angiotenzin rendszer miatt túlaktiválódott aldosteron hatását. Diuretikus hatása révén csökkenti az előterhelést, valamint a kardialis fibrózist.

Nem gyógyszeres terápiák:

Beültetett defibrillátor (Implantable cardioverter-defibrillators (ICDs)): a bőr alá beültetett defibrillátor, melyből egy vezeték indul a vénákon keresztül a szívbe. Veszélyes aritmia, vagy szívmegállás közben avatkozik be.

Biventrikuláris pacing: Biventrikuláris pacemaker irányítja mindkét kamra összehúzódását. Szívelégtelenségben, a kitágult, fibrotikus szövetel rendszeresen átázott izomszövetben gyakran nem teljesen megfelelő a depolarizáció terjedése, a kamrák összehúzódásának időzítése. Ezt segíti a biventrikuláris pacemaker, amely pontosan koordinálja a kontrakciókat, ezáltal javul a pumpafunkció hatékonysága.

Intraaortikus pumpa és szívpumpák (left ventricular assist devices, or LVADs): ha a nagymértékben gyenge szív már nem képes elégséges mértékben továbbítani a vért, akkor kiegészítő eszközökre van szükség. Ezek mechanikusan segítik a szívet pumpálni, és a beteg életben tartani.

Szívtranszplantáció: 1967-ben végezték el az első szívtranszplantációt, azóta rutin beavatkozássá vált. Limitáló tényező a megfelelő donor szívek hiánya. A betegek gyakran éveket várnak a megfelelő donor szívre.

Össejt beültetés: még kísérleti stádiumban van, ugyanakkor elképzelhető, hogy a jövőben kiterjedt használatára kerül sor. (Jessup 2009, Opie 2004)

### **2.3. Primer dilatatív kardiomiopátia**

A dilatatív kardiomiopátia (DCM) a szív elsődleges megbetegedése, ami a bal kamrai tágulattal és a bal kamrai szisztolés diszfunkcióval jellemezhető, miközben az elő- és utóterhelés változását előidéző tényezők (hipertenzió, billentyű eltérés), valamint súlyos koronária betegség hiányoznak. A DCM 25%-a öröklött elváltozás, általában autoszómális domináns jellegű. Ide tartoznak azok betegségek, amelyek olyan öröklődő géndefektusokkal rendelkeznek, melyek érintik a Z-lemez fehérjéit (MLP, TCAP), a citoszkeleton proteinjeit (disztrófin, dezmin, metavinculin), a mitokondriumot és

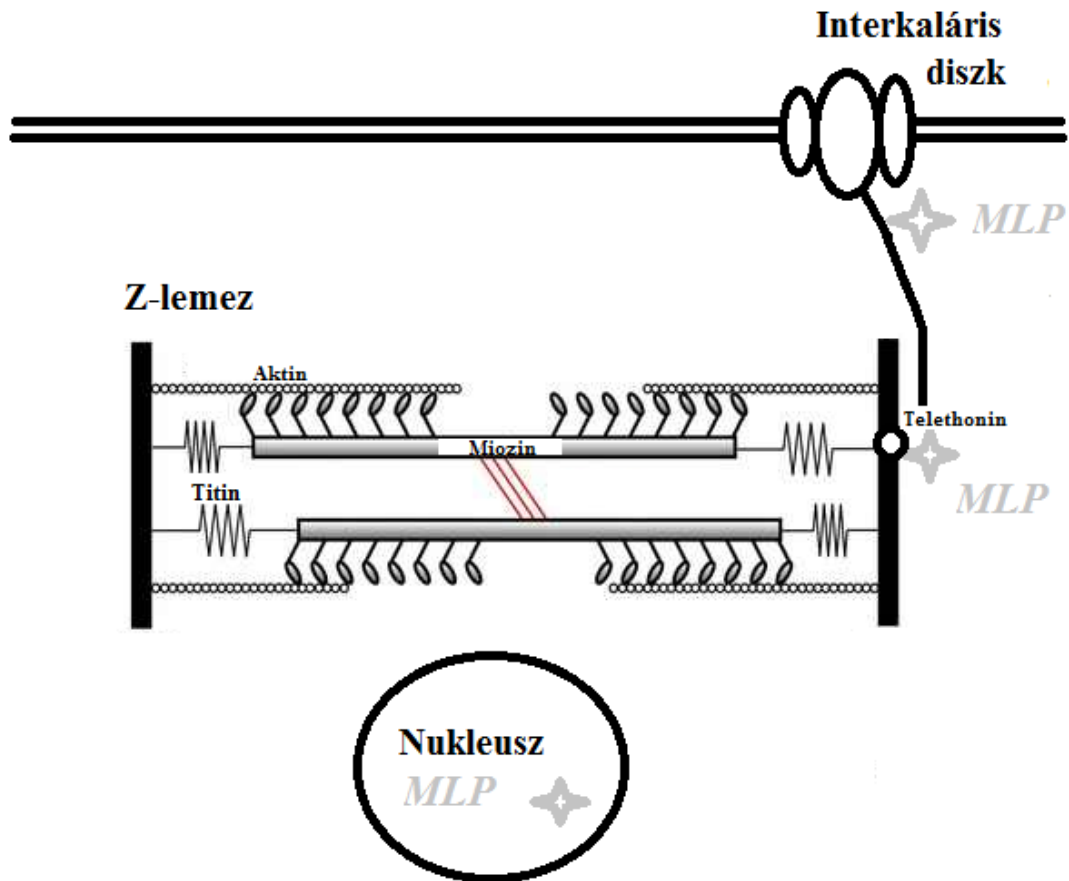
sejtmag membrán alkotóit (lamin A/C, Emerin). X kromoszómához kötött öröklést mutatnak az izomdisztrófiák (Becker, Duchenne).

Kiválthatja szerzett módon metabolikus eltérés, miokarditisz, Kawasaki betegség, Churg-Strauss szindróma, citotoxikus gyógyszerek, endokrin eltérések, táplálkozási hiánybetegségek (thiamine), etanol és terhesség (Elliot és mtsai 2008). A dilatatív kardiomiopátia állapotát kitágult bal kamra és szisztolés elégtelenség jellemzi. Klinikai kritériumok szerint az ejekciós frakció kisebb, mint 45% és a végdiasztolés bal kamrai térfogat 112%-kal nagyobb, mint az elvárható. Ebben az állapotban a Laplace törvény alapján a falfeszülés megnő, amit a következő képlet alapján számíthatunk: a falfeszülés  $\sigma = PR/(2T)$ , ahol a P a bal kamrai nyomás, R a kamra belső sugara, és a T a falvastagság. A szívizom citoarchitekturájában kialakuló elváltozások csökkentik a kontraktilitást, ami egy laposabb P-V (nyomás-térfogat) görbét eredményez.

### **2.3.1. MLP elhelyezkedése és funkciója**

A muscle LIM protein (MLP) egy, LIM motívumot tartalmazó fehérje. A LIM fehérjékre jellemző, hogy tartalmaz legalább egy dupla cink ujjas részt, amely az RNS és a DNS specifikus részeihez kapcsolódva befolyásolja a sejt differenciálódását, valamint szerepet játszik a fehérje-fehérje kapcsolatokban (Arber és mtsai 1994, Feuerstein és mtsai 1994, Louis és mtsai 1997).

Az MLP a LIM fehérjék három altípusa közül LIM-only protein csoportba tartozik, azon belül a cisztein-gazdag fehérjecsaládba. Részt vesz a miogenezisben, valamint biztosítja az izomrostok összehúzódásának átvitelét a sejtmembránra, a szarkomereknek a szarkolemmához történő lehorgonyzásával. A MLP titin-MLP-telethonin komplexként helyezkedik el a Z-csíkban, úgy hogy a cink-ujjas rész az aktinhoz kapcsolódik, valamint megtalálható a nukleuszban, a citoplazmában és az interkaláris diszkban is. (Arber és mtsai 1997, Buyandelger és mtsai 2011) (2. Ábra). Ugyanakkor a humán kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a szívelégtelenség manifeszt stádiumában a MLP-ek a sejt perifériájára koncentrálnak, és harántcsíkolt mintázatot mutatnak, de a sejtmagban nem mutathatók ki (Zolk és mtsai 2000).



**2. Ábra** Az MLP a szarkomér Z-csíkjában helyezkedik el titin-telethonin-MLP komplexként és összekapcsolja a citoszkeletont a kontraktilis apparátussal. Megtalálható az interkalárisdiszkben és nukleuszban is.

A MLP a Z-lemezben elhelyezkedve hiszton deacetilázzal (HDAC4) és acetilázzal (PCAF) történő interakciója során módosíthatja a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységét (Gupta és mtsai 2008). Azt, hogy ez a LIM protein részt vesz a mechanikai feszülés érzékelésében, az is bizonyítja, hogy MLP-KO egérszívből izolált sejtek mechanikai stimulációra nem reagálnak ANP termeléssel, ami a sejt feszülés fontos jelzője, miközben endothelin 1 vagy fenilefrin hatására ANP szabadult fel. Ennek alapján feltételezhető, hogy a MLP része egy kardiális mechanikai feszülésszenzornak (Knöll és mtsai 2002, Raskin és mtsai 2009), és az előbb leírt folyamat nem génindukciós szinten kialakuló eltérés következménye. A szenzorfunkción kívül részt vesz a szarkomerek mechanikai rögzítésében, ezzel segíti a mechanikai erőátvitelt a szarkolemmára (Arber mtsai 1997). A citoszkeletonnal történő kapcsolódás során a MLP aminoterminális LIM1 doménje a  $\beta 1$  spektrinhez csatlakozik, míg a karboxiterminális LIM2 doménje az  $\alpha$  aktinhoz (Flick és Konieczny 2000). Zheng és

mtsai munkájában rávilágítottak az MLP protein f-aktin stabilizáló és szervező funkciójára, valamint bizonyították az aktin és az MLP molekula direkt kapcsolatát (Zheng és mtsai 2008).

### **2.3.2. MLP szerepe emberben**

Humán adatok szerint a MLP fehérje expressziója manifeszt szívelégtelenség esetén csökken, míg mRNS szintje változatlan az egészséges szívekhez viszonyítva (Zolk és mtsai 2000). Másrészt a MLP-t kódoló CSRP3 génben történő mutációk dilatatív kardiomiopátiához vezethetnek emberben. Továbbá az előbbihez hasonlóan a komplexet alkotó egyéb proteineket (telethonin, titin, aktin) kódoló szakaszok mutációja is hasonló eredményre vezethet. (Knöll és mtsai 2002, Mohapatra és mtsai 2003).

### **2.3.3. A MLP hiánya által okozott molekuláris elváltozások**

Előzőek alapján a humán szívelégtelenség lehetséges állatmodellje lehet az Arber és mtsai által kifejlesztett MLP knock out egérmódel (Arber és mtsai 1997). Két tényező is alátámasztja, hogy ez a modell használható, és az ebből nyert eredmények kiterjeszthetők a kardiomiopátiák több formájára is. Egyrészt hasonlóan a humán végstádiumú szívelégtelenségből nyert adatokhoz, ebben a kísérleti modellben is csökken a  $Ca^{2+}$  csúcskoncentrációja, valamint a kontraktilitás, a  $\beta$ -adrenerg reakció és az SR  $Ca^{2+}$  felvétel (Esposito és mtsai 2000, Minamisawa és mtsai 1999). Ugyanúgy megfigyelhető emberi szívből származó sejtekben a csökkent kontraktilitás és relaxáció, valamint a SERCA2a és a PLB eltérések közötti összefüggés (Meyer és mtsai 1995, Hasenfuss 1998), mint a DCM állatmodelljében. Humán vizsgálatokban is látható, hogy a szívelégtelenség progressziójával a SERCA2a/PLB arány csökken (Koss és mtsai 1997). A  $Ca^{2+}$  szekvesztráció szabályozásának kiemelt jelentőségét bizonyítja az is, hogy az MLP-KO állatokban létrejövő  $Ca^{2+}$  tranziens és hemodinamikai eltéréseket a SERCA2a gátló PLB „kiütése” normalizálta (Minamisawa és mtsai 1999). Ezt bizonyíthatja Unsöld és mtsai közleménye, amelyben 12 hetes MLP-KO állatokban alacsonyabb SERCA2a expressziót mutattak ki (hasonlóan saját közleményünkhöz). Egyes közlemények a  $\beta$  adrenerg rendszer deszenzitizáció (Esposito és mtsai 2000, Rockman és mtsai 1998), mások az angiotenzin receptor aktiváció kitüntetett szerepét bizonyították a DCM progressziójában MLP-KO állatokban (Yamamoto és mtsai 2007). A működő AT1 receptor hiányában csökken az MLP-KO egér modellben kialakuló kardialis remodeling, és helyreáll a kontraktilitás és telődés, ugyanakkor a relaxáció változatlan marad, amit magyarázhat a SERCA2a expressziójának változatlanul



alacsony szintje. Ez bizonyíthatja az MLP elsődleges szerepét a SERCA2a alacsony protein szintjének kiváltásában (Yamamoto és mtsai 2007). A  $\beta$ -adrenerg stimuláció csökkent hatékonyságát találták 3 hónapos MLP-KO állatokban, ami a szívek szimpatikus deszenzitizációjára utal (Unsöld és mtsai 2012), amit bizonyít az is, hogy a  $\beta$ ARK1 funkció gátlás hatására nem alakult ki a kardiális funkciózavar (Esposito és mtsai 2000).

A kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységére utaló adatok ellentétesek az irodalomban: egyesek változatlan (Unsöld és mtsai 2012), mások fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységről számoltak be (Esposito 2000).

## **2.4. Szerzett kardiomiopátia**

Ide tartoznak azok a kardiomiopátiák, melyek háttérében nem öröklött genetikai defektus áll, hanem valamilyen egész szervrendszert érintő betegség, anyagcsereelváltozás. Ezt a csoportot képviseli a diabétesz és a metabolikus szindróma is. A metabolikus szindrómára jellemző elváltozások közé tartozik az elhízás, a magas vérnyomás, a diszlipidémia és az inzulin rezisztencia (Eckel és mtsai 2005). A II. típusú diabéteszben és a metabolikus szindrómában kialakuló kardiomiopátiában az inzulin rezisztencia az, ami a közös nevezőt képezi a két anyagcsereelváltozásban. Kísérleteinkben a diabéteszes kardiomiopátia modellezésére fruktóz táplált patkányokat használtunk. A magas fruktózbevitel metabolikus szindrómát indukál a kísérleti állatokban, ami sok jellemvonásában megegyezik a II. típusú diabéteszszel, ezért az eredményekből következtethetünk a humán diabéteszben lezajló folyamatokra. A metabolikus szindrómában kialakuló folyamatok megváltoztatják a szívizom metabolizmusát, amely kontraktilis diszfunkcióhoz, majd szívelégtelenséghez vezet. Ezek közé tartoznak a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis eltérései, és az ezt szabályozó mechanizmusok sérülése.

### **2.4.1. Molekuláris változások metabolikus szindrómában**

Adatok főként II. típusú diabéteszes állatkísérletekből állnak rendelkezésre, amik nagyban megegyezhetnek a metabolikus szindrómában feltételezettekkel. Mindkét esetben hasonló szisztémás folyamatok alakulnak ki, a közös tényező mégis az inzulin rezisztencia. A szív funkcióját nagy mértékben a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis állapota és a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$ -ra adott válasza határozza meg. Állatkísérletek során azt

tapasztalták, hogy a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz aktivitása csökkent. Ez lehet az egyik kulcsmomentuma a diabetikus szívdiszfunkció kifejlődésének. Ennek hátterében miozin izoenzim váltás, valamint a szabályzó fehérjék foszforilációja állhat. A  $V_1$  izoenzimben lévő  $\alpha$  MHC gyorsabb enzimatis reakcióra képes, mint a  $\beta$  MHC, ezért magasabb arányú előfordulása esetén gyorsabb az izomkontrakció lehetséges. Az egérszívekben létrejövő  $V_1$ - $V_3$  izoenzim váltás okozhatja az aktomiozin ATP-áz aktivitás csökkenését. A diabétesz kezelése, a metabolikus zavar rendezése, edzés visszafordítja ezt a folyamatot (Dhalla és mtsai 1998, Glennon és mtsai 1995, Falcão-Pires és Leite-Moreira 2011).

A miozin könnyűlánc foszforilálódhat miozin könnyűlánc kináz által. A MLC foszforilációja balra tolja az erő-p $\text{Ca}^{2+}$  függvényt. Az erő-pCa függvény (ahol a pCa a kalcium ion koncentráció tízes alapú negatív logaritmus) a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységét mutatja. Diabéteszben csökken a MLC foszforilációja, ami gyakorlatban azt jelenti, hogy ugyanaz a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció kisebb erőt generál. Inszulin hatására a foszforiláció csökkenésével a görbe jobbra tolódik. Foszforiláció hatására változhat a troponin filamentumok tulajdonsága is. A PKC foszforilálhatja Tn-I-t és a Tn-T-t, aminek hatására csökken az aktomiozin ATP-áz aktivitása. A PKA hatására a  $\text{Ca}^{2+}$  szenzitivitása lesz kisebb. Nem csak a foszforiláció, de a Tn-T izoforma váltás is szerepet játszhat a kontraktilis filamentumok megváltozott ATP-áz aktivitásában.

A  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztrációban kiemelkedő szerepe van a SERCA2a-nak. Funkciójának sérülése nagymértékben befolyásolja az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázist, közvetlenül csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztrációt, és közvetve a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást. Diabéteszben feltételezhető a SERCA2a funkció károsodása, de ennek hátterében nagy valószínűséggel nem a fehérjekoncentráció csökkenése állhat, mivel az mRNS koncentráció változása nem egyértelmű. A SERCA2a kapacitása csökkenhet azért is, hogy a membrán tulajdonsága, melyben a pumpa elhelyezkedik, megváltozik. A diabéteszben megváltozott szubsztrátmetabolizmus a szabad zsírsavak felhalmozódásához vezet, amelyek a membránban akkumulálódva megváltoztatja annak tulajdonságait.

A diabéteszes kardiomiopátiában szenvedő szív érzékenyebben reagál az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változására. Ennek hátterében a DHP receptor változása állhat, mivel ez a csatorna felelős az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  sejtbe való bejutásáért. Mérések szerint nem

változik a DHP receptoron átfolyó áram, ugyanakkor a csatornaszám csökken. Ennek háttérében a csatorna  $\text{Ca}^{2+}$  affinitásának növekedése állhat, ami magyarázatot adhat a beteg szívműködés fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységére.

A szarkolemmalis iontranszportok is változhatnak diabéteszben, csökkenhet a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  kicserélő és ennek következtében az NCX aktivitása. A folyamatok eredőjeként a szívműködés  $\text{Ca}^{2+}$  tartalma növekedhet. A mitokondriumok  $\text{Ca}^{2+}$  felvétele és pufferkapacitása csökken, ami a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltését eredményezheti. A magasabb  $\text{Ca}^{2+}$  tartalom apoptotikus folyamatokat is indukálhat (Dhalla és mtsai 1998, Falcão-Pires és Leite-Moreira 2011).

#### **2.4.2. Renin- angiotenzin rendszer eltérései metabolikus szindrómában**

A szöveti renin-angiotenzin rendszer aktivitása fokozott diabéteszes szívben, ellenben a szisztémás rendszerrel, melynek aktivitása akár csökkenhet is. Megnövekszik a ATII receptor mRNS szintje, amely jelzi a rendszer lokális aktiválódását. A RAAS elindítja a remodeling folyamatát a szívben, fokozza a sejtek nekrozisát, apoptózisát és az intercelluláris tér fibrózisát. A RAAS aktiválódása növeli az oxidatív stresszt. Kimutatták, hogy ACE gátlók alkalmazása növelte az antioxidáns mechanizmusokat szívben és egyéb szervekben (de-Cavanagh és mtsai 1997).

#### **2.4.3. Oxidatív stressz**

Az antioxidánsok és az antioxidáns enzimek (szuperoxid diszmutáz, glutathion peroxidáz, kataláz) fontos szerepet játszanak a sejtek szabad gyökök és a egyéb oxidánsok elleni küzdelmében. Diabéteszben megemelkedik az oxigén gyökök szintje, melynek háttérében a magas vércukorszint indukált glükóz autoxidáció, fehérje glikolizáció és a glikált proteinek oxidatív degradációja áll (Gillery és mtsai 1988, Wolff és mtsai 1987, Hunt és mtsai 1990). Ugyanakkor az antioxidáns enzimek koncentrációjának növekedését figyelték meg diabéteszes patkányszívben (Kakkar és mtsai 1995). Az emelkedés feltételezhetően kompenzatórikus jellegű válaszreakció a megemelkedett oxidatív stresszre. A diabétesz progressziója során a nagyobb mértékben termelődő oxigén gyökök mennyisége felülmúlja az antioxidáns rendszer kapacitását, ezáltal kedvezőtlen egyensúly alakul ki (Tsutsui és Kinugawa 2011). A hiperglikémia okozta oxidatív stressz számos szignáltranszdukciós útvonalat aktivál, ami apoptózishoz, hipertrófiához és fibrózishoz vezetnek (Giacco és Brownlee 2010, Watanabe és mtsai 2010).

#### 2.4.4. O-GlcNAciláció

A fehérjék posttranszlációs modifikációja módosítja a fehérjék funkcióját, elhelyezkedését és turnoverét. Ezek egyik mechanizmusa a fehérjék glikozilációja, ami a endoplazmatikus retikulumban vagy a Golgi készülékben zajlik. A klasszikus glikozilációs mechanizmusokon kívül létezik egy gyors, O-kapcsolt N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) mediált mechanizmus, amit az O-GlcNAc transzferáz (OGT) enzim végez. Az OGT segítségével kapcsolódik az O-GlcNAc a fehérjék Ser vagy Thr aminosavához. Az O-GlcNAc-ilt proteinek szintjét mind a szintézisért felelős OGT, mind a degradációjáért felelős  $\beta$ -N-acetilglükózaminidáz (O-GlcNAcase) aktivitása szabályozza. II. típusú diabéteszben a kardiális diszfunkció kialakulásában szerepet játszik a kardiomiociták funkcionális és strukturális fehérjéinek a hiperglikémia és a következményesen fokozott protein glikozidáció miatti módosulása (Laczy és mtsai 2009). Ezek a folyamatok a fruktóz indukált metabolikus szindrómában hangsúlyosabbak, mint a II. típusú diabéteszben. Yokoe és mtsainak közleményükben igazolták, hogy diabéteszben igen gyakori proteinglikozidáció, melynek központi szereplője az O-GlcNAc. A foszfolambán Ser16-on történő O-GlcNAc-ációja gátolja a protein foszforilációját, így a PLB nem válik le a SERCA2a-ról, ami megakadályozza a SERCA2a rezervkapacitásának felhasználását (Yokoe és mtsai 2010). Hasonló eredményre jutottak Fricovsky és mtsai, akik II. típusú diabétesz korai fázisában szisztolés és diasztolés diszfunkciót észleltek, melynek hátterében a kalcium szabályzó fehérjék O-GlcNAc-ációját találták. Emelett csökkent SERCA2a expressziót mutattak ki (Fricovsky és mtsai 2012).

#### 2.4.5. Kardiális szubsztrát metabolizmus

Az egészséges szív fő energiaforrása a zsírsavak metabolizmusa során keletkező ATP. A szabad zsírsavak kb. 70%-ban biztosítják az energiát a szív működéséhez, a fennmaradó energiát glükóz, laktát és ketonok felhasználásából nyeri a szívizom. Számos kísérlet alátámasztja a szív szubsztrát felhasználásának megváltozását inzulin rezisztens állapotban. (Dhalla és mtsai 1998) Az inzulin hatás hiányában csökken a glükóz transzporter mRNS és fehérje szintje, ami csökkenti az intracellulárisan rendelkezésre álló glükóz mennyiségét, annak ellenére, hogy a vércukorszint magasabb az egészségesekben mérténél. Szőlőcukor hiányában, a szív még inkább a szabad zsírsavak (FFA) felhasználását helyezi előtérbe. A növekvő szabad zsírsavkoncentrációval párhuzamosan csökken a glükóz felhasználás, ezt nevezik

„Randle-jelenség”-nek. Ennek hátterében a glükózetabolizmus gátlása állhat, amelyet az emelkedő FFA szint okozhat (Boudina és Abel 2007, Belke és mtsai 2000).

A magasabb FFA szint miatt a szív munka hatékonysága csökken, mivel a FFA irányába tolódott metabolizmus több oxigént (10%-kal) igényel ugyanannyi ATP előállításához. A fokozott oxigén igény és az előrehaladott szívelégtelenségben fellépő csökkent oxigén ellátottság együtt a lipid termékek nem megfelelő oxidációjához vezetnek, amelyek a reaktív oxigén gyökök és a lipidmetabolizmus közttermékeinek felhalmozódását eredményezik. A kevésbé hatékony energiatermelés hozzájárul a kardiomiopátia progressziójához (An és Rodrigues 2006).

A FFA koncentrációjának növekedése eltéréseket okoz a  $Ca^{2+}$  homeosztázis fenntartásáért felelős enzimek funkciójában is. A fokozott lipidmetabolizmus miatt az SR és a szarkolemma kettős lipidrétegében felhalmozódnak a közttermékek, ennek következtében megváltoznak a membrántulajdonságok, amelyek az itt elhelyezkedő transzporterek funkcióját módosíthatják. Ezzel magyarázható akár a SERCA2a funkció csökkenése is (Lopaschuk és mtsai 1984).

#### **2.4.6. Fruktóz hatása kísérleti állatokban**

A fruktóz egy monoszacharid, ami gyümölcsökben és zöldségekben fordul leginkább elő. Képlete megegyezik a szőlőcukor képletével ( $C_6H_{12}O_6$ ), ugyanakkor a szerkezete más: gyűrűje öt tagú. Glükózzal együtt alkotja a szukróz elnevezésű diszacharidot.

A fruktóz a bélrendszeren keresztül a GLUT5 transzporterén keresztül szívódik fel. Metabolizmusa a májban folytatódik, ahol a lebontási folyamat kikerüli a glikolízis szabályzó enzimét (foszfofruktókináz). A végtermékek felszaporodása kontrollálatlan zsírsavprodukciónak eredményez. A jelenlegi étkezési kultúrában a finomított szénhidrátok előkelő pozíciót foglalnak. Számos ételben megtalálható a fruktóz vagy a szacharóz mint édesítő. A nagymennyiségű fruktóz bevitel elhízást, diszlipémiát, inzulin rezisztenciát és szívelváltozásokat okozhat. A fruktózbevitel során nem alakul ki inzulinválasz, mivel a pancreas nem tartalmaz GLUT5 receptort, valamint a felszívódás során nem szabadul fel GIP (gastric inhibitory peptide), ami a inzulinfelszabadulás egyik indukálója. A tartós fruktóz bevitel leptin rezisztenciát is okoz, ami további eltéréseket eredményez a lipid metabolizmusban. A plazma adiponektin szintjét is növeli, ami inkább az adiponektin rezisztenciájára utal, mivel a hormon jótékony hatása,

a vérnyomáscsökkentés és az inzulin érzékenyítés nem volt megfigyelhető patkányokban (Tran és mtsai 2009).

A fokozott fruktóz etetéssel a metabolikus szindróma modellje hozható létre. Ugyanúgy megjelenik az obezitás, inzulin rezisztencia, a magas vérnyomás, a diszlipémia és a felgyorsult ateroszklerózis, ami mind a metabolikus szindróma jellemzői. Ezek az eltérések egyenként is kardiovaszkuláris rizikótényezők. Az érintettekben gyakran kialakul a II. típusú diabétesz, valamint szívérrendszeri megbetegedés. A metabolikus szindróma kialakulása még nem teljesen ismert, szerepet játszhatnak örökletes és környezeti faktorok is. A szindróma és a kardiovaszkuláris eltérések közötti kapcsolat feltételezhetően az inzulin rezisztencia (Ginsberg 2000).

### 3. Célkitűzések

Kísérleteinkhez a kardiomiopátia két, etiológiailag különböző típusát használtuk fel. A familiáris DCM mintájául szolgáló állatmodellnek olyan genetikailag módosított egerek szívét használtuk fel, melynek genetikai defektusa előfordul humán esetekben is.

Az MLP-KO szívekben vizsgálataink fő céljai a következők voltak:

1. Az MLP-KO szívek  $Ca^{2+}_i$  homeosztázisának változása milyen mértékű eltérést eredményez a hemodinamikai funkcióban.
2. Az állatok öregedésével aktiválódnak-e a szív adaptív mechanizmusai és azok mekkora mértékben tudják ellensúlyozni a kardiomiopátia tüneteit.

A szerzett kardiomiopátia csoportba a metabolikus szindróma által kiváltott kardiomiopátiát választottuk. A magas fruktóz tartalmú diéta indukált metabolikus szindrómában a következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

1. A metabolikus szindróma korai stádiumában megjelenik-e a kardiális diszfunkció?
2. Miként változik a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis és annak milyen szerepe van a hemodinamikai eltérések kialakulásában?
3. Ennek háttérében milyen eltérések lehetnek a főbb  $Ca^{2+}$  háztartást szabályozó fehérjékben?

## **4. Módszerek**

### **4.1. Kísérleti állatok**

#### **4.1.1. MLP-KO kísérletek**

Az MLP-KO egereket 3 és 9 hónapos korban vizsgáltuk. Az eredeti egértörzs, melyből kialakították az MLP hiányos törzset, a 129/Sv és C57BL/6 törzsek keresztezéséből származó hibrid. A tenyészpárt L. J. De Windt (CARIM, Maastricht University, Maastricht, Hollandia) ajándékozta csoportunknak. Kontrollként a vad típusú korazonos egereket használtunk. Az SPF (specific pathogen free) előírásainak megfelelő körülmények között tenyésztettük a kísérleti példányokat. 12 órás fény-sötétség ciklust tartottunk fenn, a táplálékhoz és vízhez szabad hozzáférést biztosítottunk. Minden MLP hiányos alomból véletlenszerűen választott egyedek farkából vett mintán PCR segítségével DNS tesztet végeztünk a módosult MLP allél meglétének bizonyítására. A vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem, Egyetemi Állatkísérleti Bizottság jóváhagyásával végeztük.

#### **4.1.2. A metabolikus szindróma állatmodellje**

5 hetes Sprague-Dawley patkányokat fruktóz gazdag diétára fogtuk 6 héten keresztül. Ennek során a bevitt összes kalória 66,8%-a fruktózból származott (kísérleti táp No. TD.06451, Harlan Teklad, USA). A kontroll egyedeket a gyártó által ajánlott kontroll táppal etettük, amiben a fehérje, szénhidrát és zsíradék arányát a kísérleti táphoz állították be (No. TD.06452, Harlan Teklad, USA). Az állatokat 12 órás fény-sötétség mellett tartottuk, és szabad hozzáférést biztosítottunk az ételhez és a folyadékhoz. Az állatkísérleteink során betartottuk az NIH állatkísérletekre vonatkozó útmutatóját (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, NIH, Publication No. 85-23, revised 1996). A kísérleti protokollt jóváhagyta a Semmelweis Egyetem, Egyetemi Állatkísérleti Bizottság.

6 hetet követően az állatokat peritoneálisan adagolt 40 mg/kg pentobarbitállal elaltattuk és echokardiográfiával megmértük a szív méreteit és az in vivo bal kamrai funkciót. Az echokardiográfiát követően vérnyomásmérést végeztünk a carotisba vezetett katéterhez csatlakoztatott nyomás transzdúzer segítségével. (Experimetria Kft, Budapest, Magyarország). Vérmintát vettünk a vér triglicerid szint meghatározásához.



A patkányok diabetikus állapotának meghatározásához az állatok egy részét (kontroll: n=4, fruktóz táplált: n=4) egy éjszakán át éhezettük, majd orális glükóztolerancia tesztnek (oGTT) vetettük alá. Ennek során vért vettünk a juguláris vénából, majd 2 mg/kg glükóz 40%-os oldatát adagoltuk gyomorszáján keresztül. A vércukorszintet vércukormérővel mértük (Dcont Start, 77 Elektronika Ltd, Budapest, Magyarország).

#### **4.2. Langendorff szív preparátum, Indo-1 AM fluoreszcens technika**

Az állatokat 40 mg/ttkg intraperitonealisan adott pentobarbitállal altattuk el. A szíveket eltávolítottuk és Langendorff féle perfúziós szerkezetre rögzítettük. A perfúziót módosított Krebs-Henseleit oldattal végeztük ((mM), NaCl (118), KCl (4,3), NaHCO<sub>3</sub> (25), MgSO<sub>4</sub> (1,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), Na-EDTA (0,5), CaCl<sub>2</sub> (2,0), glükóz (11), és piruvát (5) (Sigma, Budapest, Magyarország)). Az oldatot 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> elegyével buborékoltattuk. A hőmérsékletet 37°C-ra, a pH-t 7,4-re állítottuk be. A perfúziós nyomást 70 Hgmm-en tartottuk. A bal kamrai nyomást a kamrába vezetett ballonkatéter, a koronária áramlást ultrahangos áramlásmérő (T-106, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) segítségével mértük.

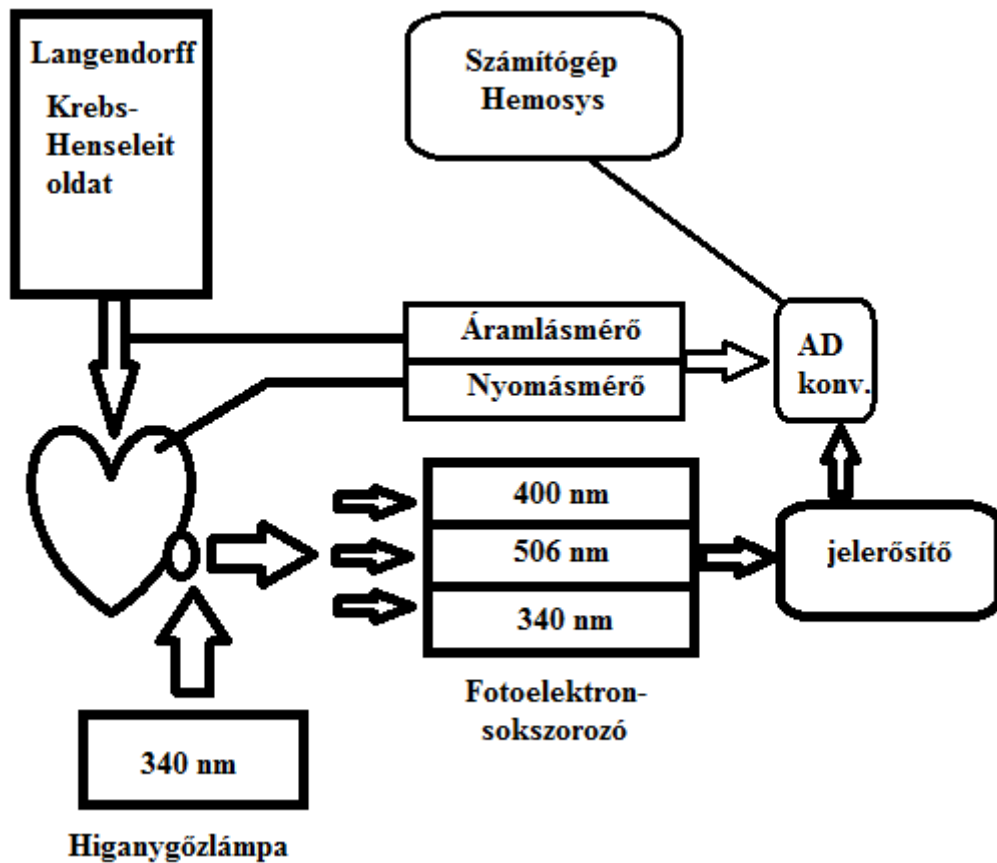
A citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> koncentráció mérésére Indo-1 AM festéket használtunk. Ez a festék szabadon átjut a sejtmembránon, majd a citoplazmában lévő észterázok lehasítják róla az AM csoportokat, így az 5 negatív vegyértékkel fog rendelkezni. A negatív töltések megakadályozzák, hogy átdiffundáljon a sejtmembránon, így a festék felhalmozódik a sejtben. A membránban elhelyezkedő nem specifikus anion transzporterek folyamatosan csökkentik a festék koncentrációját, ezt elkerülendő az anion transzporterek működését gátló anyagot (probenecid) kevertünk a Langendorff rendszer perfúziós oldatához. Az anion transzporter gátlásának mellékhatását korábbi független kísérletekben vizsgáltuk. Kimutattuk a kontraktilis funkció enyhe csökkenését, amit a pulzusnyomás 5-8 %-os csökkenése tükrözött. Ezt a nyilvánvalóan előnytelen tulajdonságot elfogadtuk annak érdekében, hogy a kísérleti protokoll teljes időtartamában stabil fényjeleket kapjunk. Mivel minden esetben hasonló eltéréssel számolhatunk, ezért a kísérleti csoportok összehasonlítása esetén jelentősége elhanyagolható.

Az Indo-1 a sejtben belül Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>-hoz kötődik (disszociációs konstans: 844 nM). Mindkét állapotban (Ca<sup>2+</sup> kötött és szabad) fényt nyel el az UV tartományban (331 nm és 349 nm), és ennek hatására a festékmolekulák fluoreszkálnak. A Ca<sup>2+</sup> kötött Indo-1

emissziós maximuma 380 nm, a szabad Indo-1 emissziós maximuma 480 nm (Bassani és mtsai 1995, Grynkiewicz és mtsai 1985).

A szíveket 6,25  $\mu\text{M}$  Indo-1 AM-mel (Invitrogen, USA) töltöttük fel perisztaltikus pumpa segítségével (Cole-Palmer, Chicago, IL, USA), amit az aortakanülhöz csatlakoztattunk. A festékkal 20 percen keresztül perfundáltuk a szíveket a kiindulási áramlás 70%-ával és 30°C-on. Majd a szíveket higanygőz lámpából származó 355 nm-es fényvel világítottuk meg. A fluoreszcens fényjeleket randomizált szálalrendezésű kvarc üvegszálal kábellel vezettük a fotoelektron sokszorozóhoz, ami előtt a fényjeleket prizma segítségével megosztottuk, majd szűrők segítségével szelektáltuk. A kardiomiocitákból származó emittált fényt 400 nm-en ( $\text{Ca}^{2+}$  kötött forma) és 506 nm-en (szabad forma) mértük, mivel így mindkét jel kellően távol kerül a NADPH fluoreszcens jelének maximumától, ugyanakkor nem csökken jelentősen egyik jel inzenzitása sem. A jelerősség külső optikai eredetű változását (optikai artefakt) a reflektált fényjelek mérésével becsültük meg (340 nm). Az intracelluláris festék „photobleaching”-jének elkerülése céljából, illetve a szöveti UV expozíció minimalizálása érdekében a szív felszínét minden 5 percben csak 1 percig világítottuk meg folyamatosan. A megvilágítást egy a gerjesztő fény útjába iktatott blende segítségével szakítottuk meg. A mért hemodinamikai paramétereket, és a detektált optikai jeleket egy többcsatornás AD átalakító (Dataq Instruments Inc., Akron, OH, USA) közbeiktatásával a kísérleti protokoll szerint meghatározott időpontokban Hemosys (Experimetria Kft, Budapest, Magyarország) szoftver segítségével IBM alapú számítógépen rögzítettük és tároltuk későbbi adatfeldolgozás céljára (3.Ábra).

A fényjeleket és a hemodinamikai paramétereket rögzítettük, majd off-line kiértékeljük (Hemosys, Experimetria, Budapest, Hungary). Az Indo-1 töltés után a perfúziós oldathoz probenecidet adtunk (Sigma) megelőzendő a festék kimosódását a szívizomsejtekből. 15 perces festék kimosási időtartamot követően a jeleket alap állapotban rögzítettük. Ezt követően izoproterenolt (5 nM) adagoltuk a perfúziós áramlatba, majd 5 perces equilibrációs periódust követően rögzítettük a mért paramétereket. Az izoproterenol infúzió leállítása után 20 perces nyugalmi időszakot követően SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS, 5  $\mu\text{M}$ ) adagolását kezdtük el, majd a hatás kialakulása után ismét rögzítettük a paramétereket. Izoproterenol adagolását csak az MLP-KO kísérletekben hajtottuk végre.



**3. Ábra** A Langendorff szerint perfundált izolált szív kísérletekhez használt optikai és hemodinamikai mérőrendszer felépítése. Koronária áramlás, bal kamrai nyomás, számítógép, analóg-digitális átalakító (AD konverter).

#### 4.3. Echokardiográfia

A metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia kísérletekben végeztünk echokardiográfiát. A transtorakális echokardiográfiát egy magas frekvenciájú lineáris transzdúszerral (5-15 MHz) felszerelt SONOS 5500 ultrahang készülékkel (Hewlett Packard) végeztük a 6 hetes táplálási periódus végén, 40 mg/kg i.p. pentobarbitállal kivitelezett altatásban. B módban a bal kamra hosszmetseti felvételei alapján számítottuk a végdiasztolés térfogatot (EDV) és a végszisztolés térfogatot (ESV). Mértük a bal kamrai területet (LVA) és a bal kamrai hosszt (LVL) és a következő képlet alapján számítottuk az EDV-t és ESV-t:  $EDV = \frac{8(LVAd)^2}{3\pi LVLd}$  és  $ESV = \frac{8(LVAs)^2}{3\pi LVLs}$ , ahol a d, a diasztolét, az s, a szisztolét jelöli. Meghatároztuk az ejekciós frakciót:  $100(EDV-ESV)/EDV$ . A diasztolés bal kamrai falvastagságot a papilláris izomzat magasságában rögzített keresztmetseti kép alapján határoztuk meg.

Ezeket a felvételeket vettük alapul a bal kamra diasztolés és szisztolés belső átmérőjének (LVIDd és LVIDs) méréséhez és a frakcionális rövidülés (FS) számításához a következő képlet alapján:  $100(LVIDd-LVIDs)/LVIDd$  (Baumann és mtsai 2007).

#### 4.4. Adatfeldolgozás és kiértékelés

A  $Ca^{2+}_i$  tranzienszt a 400 és az 506 nm-es jelek hányadosa alapján számítottuk ki. A jeleket korrigáltuk a sötétárammal és a szöveti autofluoreszcenciával, ami a  $NAD(P)^+/NAD(P)H$  arány mértékétől függ. Az autofluoreszcencia vizsgálatát három, festék nélküli teljes kísérleti protokoll során végeztük. A kísérletek eredménye azt mutatta, hogy az autofluoreszcencia mértéke jelentősen nem változott az alapértékhez képest. A  $Ca^{2+}_i$  koncentráció meghatározása Grynkiewicz és mtsai (Grynkiewicz és mtsai 1985) által meghatározott módon történt. Az Indo-1 disszociációs állandóját kalciumra nézve ( $K_d$ ) 844 nM-nek vettük korábbi mérések alapján. Külön kísérletekben határoztuk meg a hányados értékét minimális  $Ca^{2+}_i$  ( $R_{min}$ ) és maximális, telített  $Ca^{2+}_i$  ( $R_{max}$ ) koncentrációnál. Az  $R_{min}$  meghatározásához három szívet Indo-1 feltöltés után 20  $\mu M$  BAPTA AM-mel kezeltünk, az  $R_{max}$  esetében 1  $\mu M$  4-bromo-calcium-ionophore-t (A23187) használtunk. Meghatároztuk a tranziensek alapján a szisztolés  $Ca^{2+}_i$ , a diasztolés  $Ca^{2+}_i$  szinteket és az  $Ca^{2+}_i$  amplitúdót, valamint kiszámítottuk az  $Ca^{2+}_i$  emelkedés ( $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ) és csökkenés ( $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ) maximális mértékét, amiből következtethetünk az  $Ca^{2+}_i$  felszabadulás, illetve a szekvesztráció mértékére. Az  $Ca^{2+}_i$  tranziens és a bal kamrai nyomás párhuzamos változását mutatja az 1. Ábra (Bassani és mtsai 1995, Grynkiewicz és mtsai 1985).

#### 4.5. Az SR $Ca^{2+}_i$ transzporterek kinetikus paramétereinek számítása

Egy korábban publikált matematikai modellt (Ligeti 2007, op den Buijs 2004, 2005) használtunk a metabolikus szindróma kardiális eltéréseinek vizsgálatában, hogy meghatározzuk a  $Ca^{2+}_i$  szabályzó fehérjék kinetikus paramétereit. A modell számításba veszi a szív ciklus során kialakuló  $Ca^{2+}$  beáramlást a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szint kialakulásáig, és tartalmazza a RyR2-n keresztüli  $Ca^{2+}$  beáramlást, a SERCA2a általi eltávolítást és a  $Ca^{2+}_i$  puffereket. RyR2 általi  $Ca^{2+}$  kiáramlás kinetikáját ( $V_{RyR2}$ , [ $nMs^{-1}$ ]) negyedik rendű szigmoid függvény írja le:

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

ahol a  $k_{ch}$  [ $nMs^{-1}$ ] jelenti a RyR2 konduktanciáját. A  $t_{0,5}$  [ms] jelenti azt az időpontot, amikor a RyR2-n keresztül a beáramlás elérte a maximális felét. Ez a paraméter a RyR2 kapuzásának jellemzésére használható.

A SERCA2a  $Ca^{2+}$  szekvesztrációját ( $V_{SERCA2a}$ , [ $nMs^{-1}$ ]) az alábbi képlet írja le (Michaelis-Menten képlet alapján):

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

ahol a  $V_{max}$  ( $[nMs^{-1}]$ ) a maximális pumpaaktivitás és a  $k_m$  ([nM]) a Michaelis-Menten állandó. Az egyenlet, amely leírja az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  kontrenzáció változását a szív ciklus során, a következő:

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \frac{V_{RyR2} - V_{SERCA2a}}{B}, \quad (3)$$

Ahol a frakcionális pufferhatás (B) azonnali kialakulását feltételeztük a modellben. (Wagner és Keizer 1994). A B meghatározásához a puffer koncentráció és a disszociációs konstans értékeket Balke tanulmányából vettük (Balke és mtsai. 1994).

Minden adatsorból reprezentatív, körülbelül azonos végdiasztolés  $Ca^{2+}$  szinttel rendelkező tranzienseket választottunk. Modell egyenletet illesztettünk a mért  $Ca^{2+}$  tranziensekre. A legjobb illeszkedést a modellfüggvény és a kísérletes adatok négyzetes hibájának numerikus minimalizálásával közelítettük. Az illesztett modellegyenlet alapján becsültük az ismeretlen paramétereket ( $k_{ch}$ ,  $t_{0,5}$ ,  $V_{max}$  és  $k_m$ ).

#### 4.6. RNS izoláció, reverz transzkripció, kvantitatív valós idejű PCR (qPCR)

A bal kamrákból vett szövetmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd mozsár és zúzó segítségével porrá őröltük. A teljes RNS mennyiséget TRIzol (Invitrogen, Paisley, UK) segítségével izoláltuk és mennyiségét NanoDrop ND-1000-rel (Peqlab, Erlangen, Germany) meghatároztuk. Három mikrogramm RNS-t 15 egység AMV reverz transzkriptázzal (Promega, Madison, WI, USA) cDNS-sé alakítottunk. 0,025  $\mu g/\mu l$  random primereket (Promega) használtunk. A qPCR-t ABI Prism 7000 szekvencia meghatározó készülékkel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végeztük. Ehhez TaqMan primereket, probes (mintákat) és TaqMan általános PCR master mix protokollt (Applied Biosystems) használtunk: egér NCX-hez (Slc8a1) ID Mm00441524\_m1, egér RyR2-hoz Mm00465877\_m1, egér SERCa2a-hoz (Atp2a2) Mm00437634\_m1 és egér PLB-hez Mm00452263\_m1 próbát. A belső kontrollhoz

meghatároztuk a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) transzkriptjét (egér GAPDH-assay ID Mm99999915\_g1). A relatív mRNS expresszió változásokat az Applied Biosystems által javasolt  $\Delta\Delta\text{CT}$  módszerrel végeztük.

#### **4.7. Western blot analízis**

A bal kamrai szövetmintákat porrá törtük folyékony nitrogénben és jég hideg Tris-EDTA pufferben oldottuk fel (Tris 20mM, EDTA 1mM, 1:100 proteáz inhibitor). A proteáz inhibitor oldat a következőket tartalmazta: ( $\mu\text{M}$ -ban) 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (1000), aprotinin (0.8), leupeptin (20), bestatin (40), pepstatin A (15), and E-64 (14) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A mintákat ultrahanggal tovább homogenizáltuk és SDS-PAGE eljárásnak vetettük alá, a korábbi leírásnak megfelelően (Fülöp 2006). A géleket (8%) soronként egyenlően 40  $\mu\text{g}$  fehérjével töltöttük meg és nitrocellulóz membránra vittük át (BioRad, Hercules, CA, USA). A membránokat NCX és RyR2 (Chemicon, Billerica, MA, USA), SERCA (Novus, Littleton, CO, USA), PLB (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) és Ser16 foszforilált PLB (Upstate, Lake Placid, NY, USA) ellenes primer nyúl antitestek 1:50 - 1:100 oldatával inkubáltuk.

Kontrollnak a GAPDH expresszióját vettük, amit 1:1000 egér anti-GAPDH antitesttel (Novus Biologicals, Littleton, USA) vizsgáltunk. Az immunreaktív sávokat ECL-lel láthatóvá tettük (Pierce, Rockford, IL, USA) és a kemilumineszcenciát Kodak Gel Logic 1500 Imaging System (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, USA) segítségével vizsgáltuk. A sávok denzitását Image Pro Plus 4.5 szoftverrel mértük (Media Cybernetics, Bethesda, USA). Az kontroll szívek átlagát vettük 100%-nak. A denzitometriás értékeket 3-5 egyedi kísérletből vettük és átlagoltuk. A GAPDH expresszióját használtuk belső kontrollként.

#### **4.8. Statisztika**

Az MLP-KO egér kísérletekben eredményeket átlag  $\pm$  SEM formában fejeztük ki. A három és kilenc hónapos MLP-KO és kontroll csoportokat ANOVA teszttel hasonlítottuk össze. Ismételt ANOVA tesztet használtunk ugyanazon szíveken végzett beavatkozások (isoproterenol, CPA) egymással és az alap értékkel történő összehasonlításához. Student-Neumann-Keuls post hoc tesztet alkalmaztunk az alsó csoport összehasonlításához. A szignifikancia szintet  $P < 0,05$ -nek vettük.

A metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia kísérletekben az eredményeket átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. Egy utas variancia analízist használtunk, Fisher féle post hoc teszttel. A szignifikancia szintet  $P < 0,05$ -nek vettük.

## 5. Eredmények

### 5.1. MLP-KO egér kísérletek

#### 5.1.1. Túlélési arány, szív- és testtömeg

Az MLP-KO egerek kb. 60%-a elpusztult a születést követő 7 napon belül (korai fenotípus), ugyanakkor a kontroll csoport halálozási aránya 15%-os volt. Az életben maradt egyedek a felnőtt fenotípushoz tartoztak, és csak 10% pusztult el 7 napos koruk és 9 hónapos koruk között. Viselkedésük és fejlődésük hasonló volt a kontroll egyedekéhez. A kísérletekhez 3 és 9 hónapos hím állatokat használtunk. A véletlenszerűen választott egyedek DNS vizsgálata alapján az MLP-KO egerek homozigótának bizonyultak az abnormális MLP génre nézve. A szív- és testtömeg értékek nem mutattak eltérést a kontroll és MLP-KO egerek között sem 3, sem 9 hónapos korukban. A szívhipertrófiát jelző szív-testtömeg arány nem különbözött a kontroll és az MLP-KO csoport között (3 hónapos MLP-KO vs. kontroll:  $6,2 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3}$  vs.  $5,8 \times 10^{-3} \pm 0,6 \times 10^{-3}$ , 9 hónapos MLP-KO vs. kontroll:  $6,2 \times 10^{-3} \pm 0,9 \times 10^{-3}$  vs.  $6,8 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-3}$ , g/g).

#### 5.1.2. Hemodinamikai jellemzők a perfundált szívekben

Nyugalmi állapotban a szívfrekvencia, a bal kamrai pulzusnyomás (PP), a végdiasztolés nyomás, és a kontraktilitás ( $+dP/dt_{max}$ ) a vizsgált csoportokban nem különbözött (1. Táblázat, 4a., 4c. Ábra). Ugyanakkor a 3 hónapos MLP-KO egér szívek luzitrop funkciója ( $-dP/dt_{max}$ ) elmaradt az azonos korú kontroll szívekhez képest. (4b. Ábra). Ez a különbség nem volt megfigyelhető 9 hónapos korban. A koronária áramlás szignifikánsan magasabb volt az MLP-KO egyedekben az azonos korú kontrollhoz viszonyítva mindkét korban (1. Táblázat).



	3 hónapos		9 hónapos	
	kontroll (n=6)	MLP-KO (n=7)	kontroll (n=6)	MLP-KO (n=9)
<b>(a) Nyugalmi állapot</b>				
PP (Hgmm)	80,1 ± 4,6	86,3 ± 5,6	78,8 ± 5,6	87,1 ± 4,8
Szívfrekvencia (1/min)	372 ± 15	347 ± 14	360 ± 16	364 ± 19
Koronária áramlás (ml min <sup>-1</sup> )	2,6 ± 0,1	4,2 ± 0,4 <sup>*</sup>	2,8 ± 0,1	3,6 ± 0,3 <sup>*</sup>
<b>(b) 5,0 nM isoproterenol</b>				
PP (Hgmm)	94,5 ± 6,6	96,8 ± 6,6	86,2 ± 10,2	94,7 ± 5,2
Szívfrekvencia (1/min)	443 ± 11 <sup>#</sup>	458 ± 18 <sup>#</sup>	439 ± 18 <sup>#</sup>	419 ± 16 <sup>#</sup>
Koronária áramlás (ml min <sup>-1</sup> )	2,7 ± 0,1	4,4 ± 0,3 <sup>*,#</sup>	2,7 ± 0,1	3,5 ± 0,2 <sup>*</sup>
<b>(c) 5,0 μM CPA</b>				
PP (Hgmm)	55,7 ± 6,7 <sup>#</sup>	41,0 ± 3,2 <sup>#</sup>	54,6 ± 3,1 <sup>#</sup>	50,3 ± 4,2 <sup>#</sup>
Szívfrekvencia (1/min)	371 ± 20	351 ± 15	341 ± 20	315 ± 19
Koronária áramlás (ml min <sup>-1</sup> )	2,1 ± 0,1 <sup>#</sup>	3,7 ± 0,4 <sup>*,#</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>#</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>*,#</sup>

**1. Táblázat** Az izolált szívek hemodinamikai funkciója nyugalmi állapotban (a), 5,0 nM izoproterenol adagolását követően (b), és 5 μM ciklopiazonsav (CPS) kezelést követően (c). PP: bal kamrai pulzusnyomás. \* jelzi a szignifikáns különbséget a MLP-KO szívek és korazonos kontroll szívek között; # jelzi a szignifikáns különbséget nyugalmi és kezelt állapot között a MLP-KO vagy a kontroll csoportban (p<0,05)

A β-adrenerg stimuláció (5 nM izoproterenol) hatására megemelkedett a szívfrekvencia, és  $+dP/dt_{max}$  és  $-dP/dt_{max}$  (1b. Táblázat, 4a., 4b. Ábrák), ugyanakkor ezek az értékek nem különböztek a két csoport között. A koronária áramlás szintén emelkedett a nyugalmi állapothoz képest és további kismértékű emelkedést mutatott a 3 hónapos MLP-KO szívekben. (1b. Táblázat).

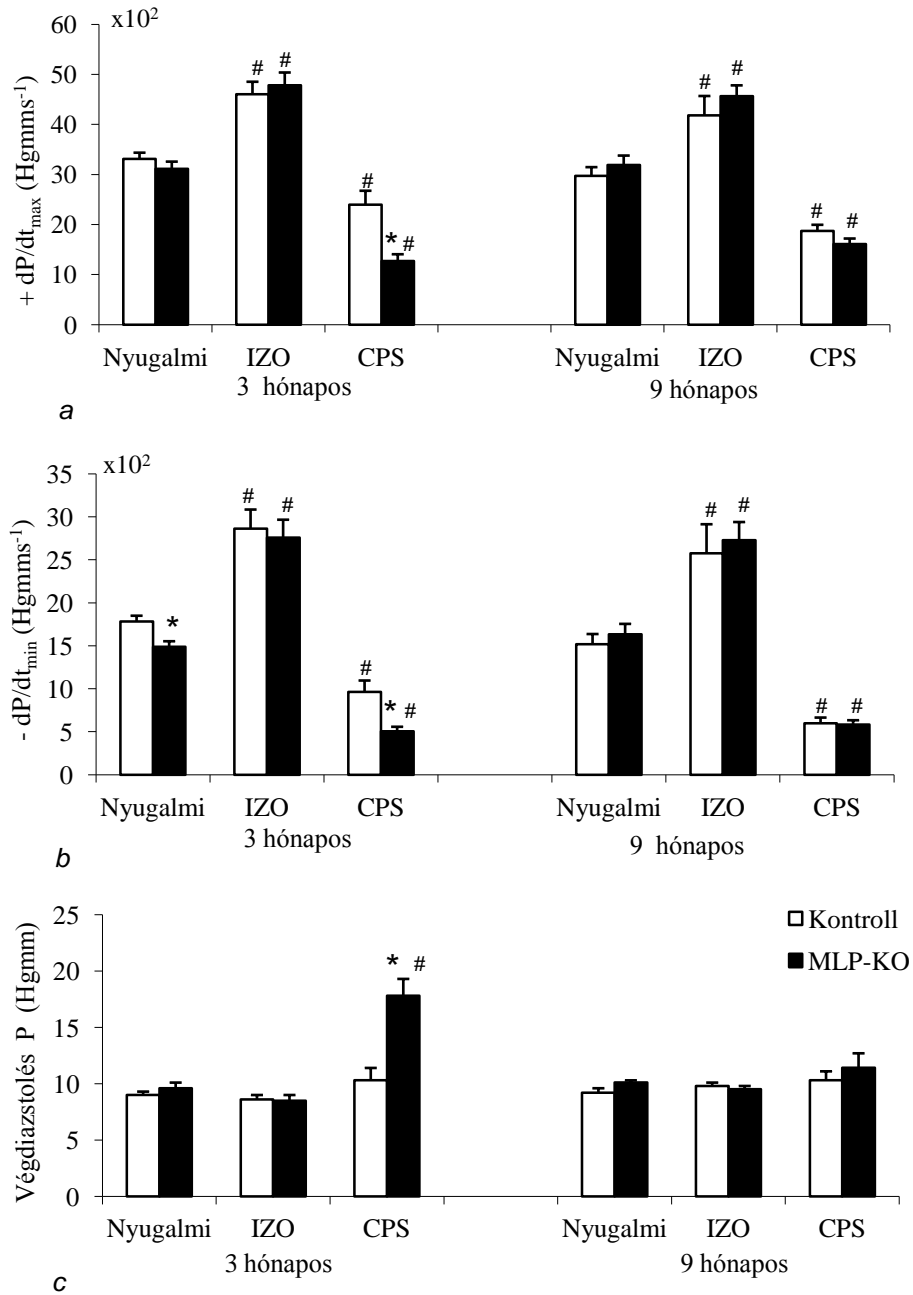
SERCA2a gátló CPS adagolása után a bal kamrai végdiasztolés nyomás nagyobb mértékben emelkedett meg a 3 hónapos MLP-KO szívekben, mint az azonos korú kontrollokban (85 és 14%, 2c. ábra). Ez a különbség a két csoport között teljesen eltűnt a 9 hónapos állatokban. A bal kamrai nyomásamplitúdó és  $+dP/dt_{max}$ ,  $-dP/dt_{max}$  jobban csökkent a 3 hónapos MLP-KO egerekben, mint az azonos korú kontroll egerekben (1c. Táblázat, 4a., 4b. Ábrák).

A CPS adás minden csoportban csökkentette a koronária áramlást, de nem változtatta meg a nyugalmi állapotban fennálló különbségeket.

### 5.1.3. Intracelluláris $Ca^{2+}$ háztartás

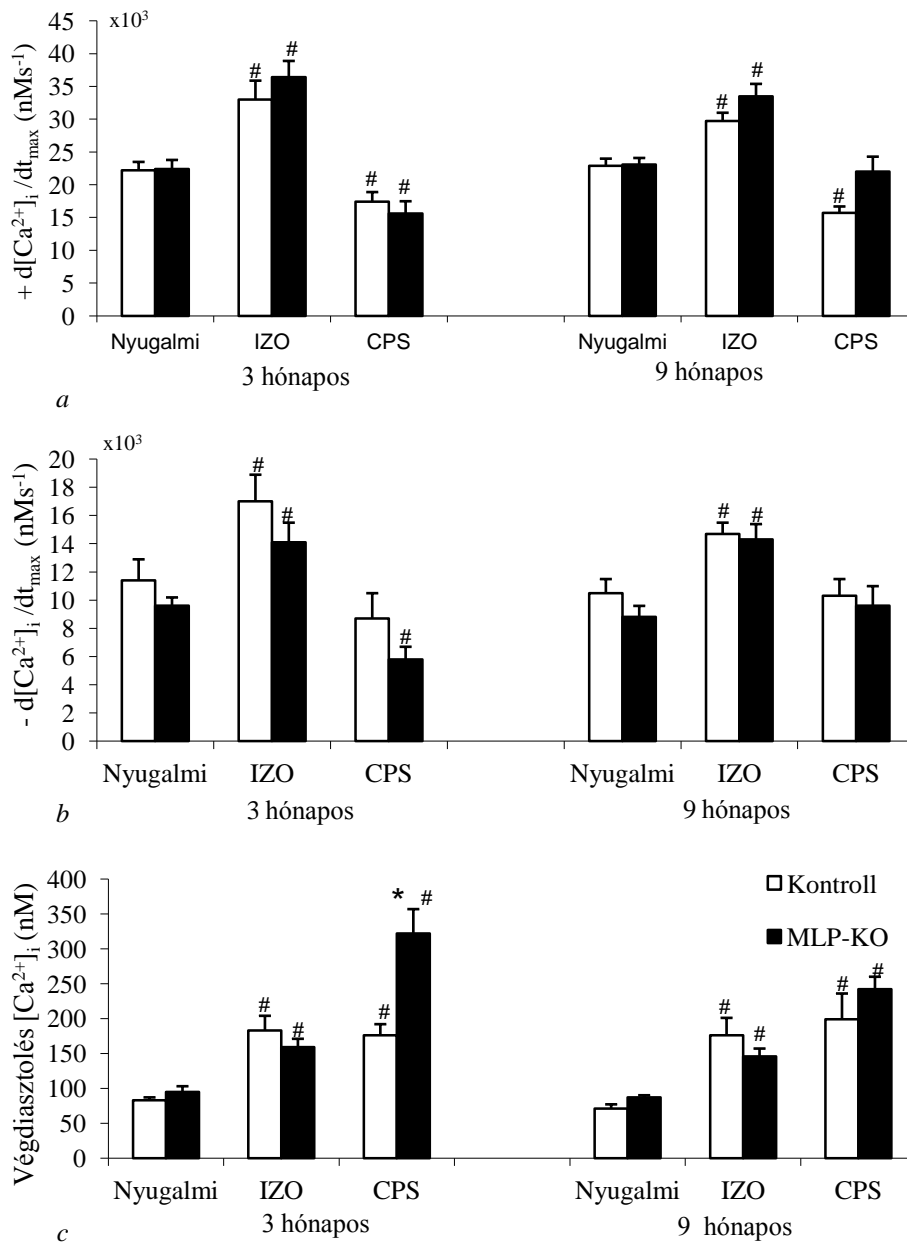
Nyugalmi helyzetben a  $Ca^{2+}_i$  tranziens minden jellemzője hasonló volt mind az MLP-KO, mind a kontroll egyedekben mindkét korcsoportban (5a.-5c. Ábrák). Izoproterenol hatására minden csoportban emelkedett a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$ , a  $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$ , és a  $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ , ugyanakkor a csoportok között nem volt szignifikáns különbség (5a.-5c. Ábrák).

A CPS adagolás minden csoportban megemelte a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szintet (5c. Ábra), különösen a 3 hónapos MLP-KO egerekben, amelyekben szignifikánsan magasabb volt a korazonos kontrollhoz képest (MLP-KO 238%, kontroll 112%). Ez a különbség 9 hónapos korra eltűnt. A CPS csökkentette a  $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$  mértékét minden csoportban kivéve a 9 hónapos MLP-KO szívekben (5a. Ábra). A  $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$  szignifikánsan csökkent CPS hatására 3 hónapos MLP-KO szívekben, ugyanakkor ez a különbség 9 hónapos korban már nem volt észlelhető (5b. Ábra).



**4. Ábra** A bal kamrai nyomás emelkedés (a) és csökkenés (b) legnagyobb sebessége és a végdiasztolés nyomás értékek (c) kontroll (□ n=6 és 6) és azonos korú 3 és 9 hónapos MLP-KO (■ n=7 és 9) szívekben nyugalmi állapotban (a), 5,0 nM izoproterenol adagolását követően (b), és 5 μM ciklopiazonsav (CPS) kezelést követően (c).

\* jelzi a szignifikáns különbséget a MLP-KO szívek és korazonos kontroll szívek között; # jelzi a szignifikáns különbséget nyugalmi és kezelt állapot között a MLP-KO vagy a kontroll csoportban (p<0,05).



**5. Ábra** A  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés (a) és csökkenés (b) legnagyobb sebessége és a végdiasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  (c) kontroll ( $\square$   $n=6$  és  $6$ ) és azonos korú 3 és 9 hónapos MLP-KO ( $\blacksquare$   $n=7$  és  $9$ ) állatokban nyugalmi állapotban (a),  $5,0$  nM izoproterenol adagolását követően (b), és  $5 \mu\text{M}$  ciklopiazonsav (CPS) kezelést követően (c).

\* jelzi a szignifikáns különbséget a MLP-KO szívek és korazonos kontroll szívek között; # jelzi a szignifikáns különbséget nyugalmi és kezelt állapot között a MLP-KO vagy a kontroll csoportban ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.4. A $\text{Ca}^{2+}$ szabályozásban résztvevő fehérjék mRNS és protein szintje

A főszerepet játszó  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadító csatorna, a ryanodin (RyR2) GAPDH normalizált mRNS szintje 3 hónapos egerekben nem különbözött, míg a 9 hónapos MLP-KO egerekben a szintje kis mértékben ugyan, de csökkent. Ezzel ellentétben a fehérje protein szintje egyik korcsoportban sem mutatott eltérést (2. Táblázat).

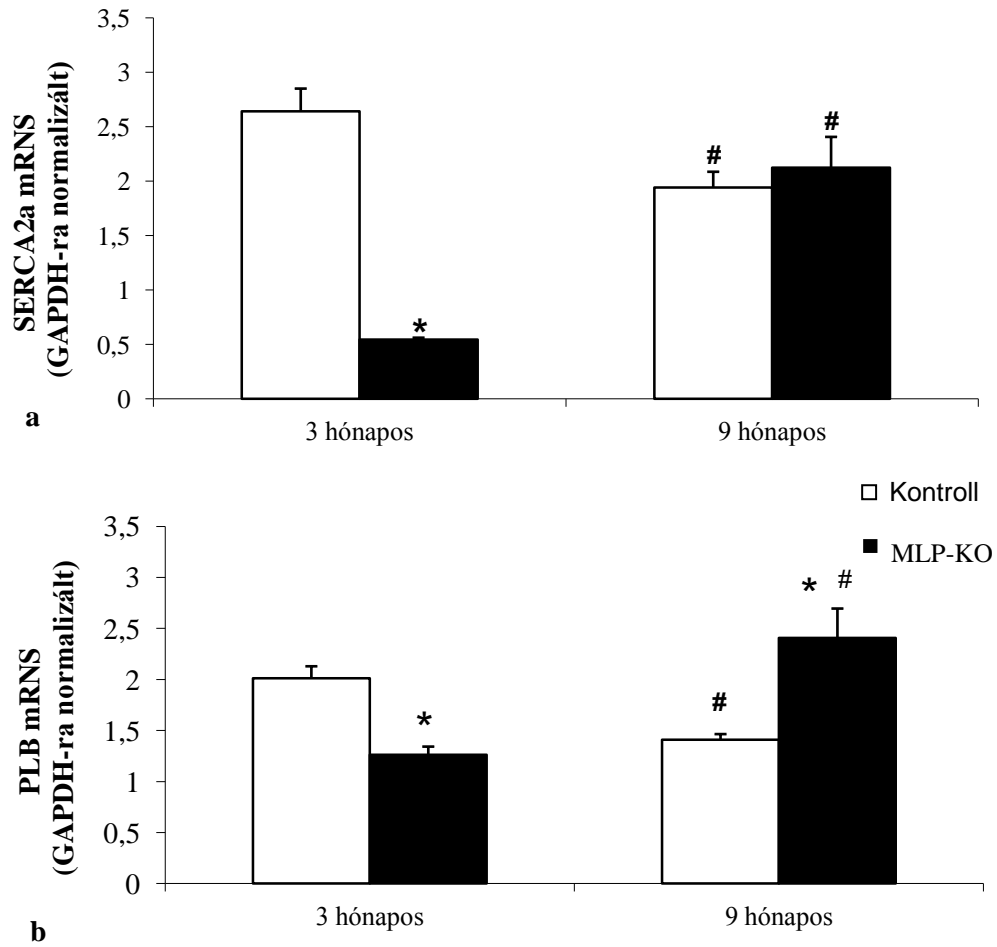
Az  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráló mechanizmusok közül az NCX transzporter mRNS expressziója, valamint protein szintje minden csoportban hasonló volt (2. Táblázat).

	3 hónapos		9 hónapos	
	kontroll (n=6)	MLP-KO (n=7)	kontroll (n=6)	MLP-KO (n=9)
<b>(a) mRNS expresszió (GAPDH-ra normalizált)</b>				
RyR2	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,30 ± 0,02 <sup>*</sup>
NCX	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
<b>(b) Protein expresszió (GAPDH-ra normalizált)</b>				
RyR2	0,45 ± 0,04	0,49 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,05
NCX	0,86 ± 0,13	1,02 ± 0,21	0,92 ± 0,08	0,99 ± 0,11

### 2. Táblázat RyR2 és NCX GAPDH-ra normalizált mRNS (a) és protein (b).

\* jelzi a szignifikáns különbséget a MLP-KO szívek és korazonos kontroll szívek között ( $p < 0,05$ ).

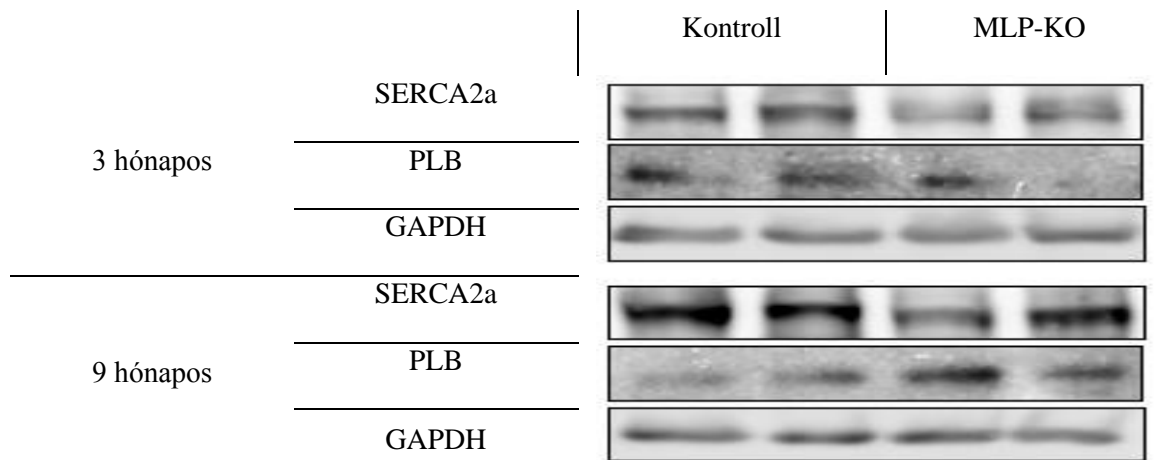
A SERCA2a mRNS szintje 3 hónapos MLP-KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az azonos korú kontrollokban (6a. Ábra). 9 hónapos korra ez a különbség eltűnt, mivel az MLP-KO csoporton belül az mRNS szint emelkedett a kor előrehaladtával. A protein szintben hasonló változások voltak megfigyelhetők (7. Ábra). A 3 hónapos MLP-KO szívekben alacsonyabb volt a SERCA2a protein szintje, mint az azonos korú kontroll szívekben (8a. Ábra). Ez 9 hónapos korra szintén kiegyenlítődt, és bár a 3 és 9 hónapos MLP-KO csoporton belül emelkedő tendencia volt megfigyelhető, ugyanakkor a különbség nem volt szignifikáns (60%,  $p = 0,07$ ). A SERCA2a protein szintje a 9 hónapos állatokban nem különbözött, ami jelzi, hogy mind a SERCA2a mRNS, mind a protein szintje 9 hónapos korra normalizálódott (6a., 7., 8a. Ábrák).



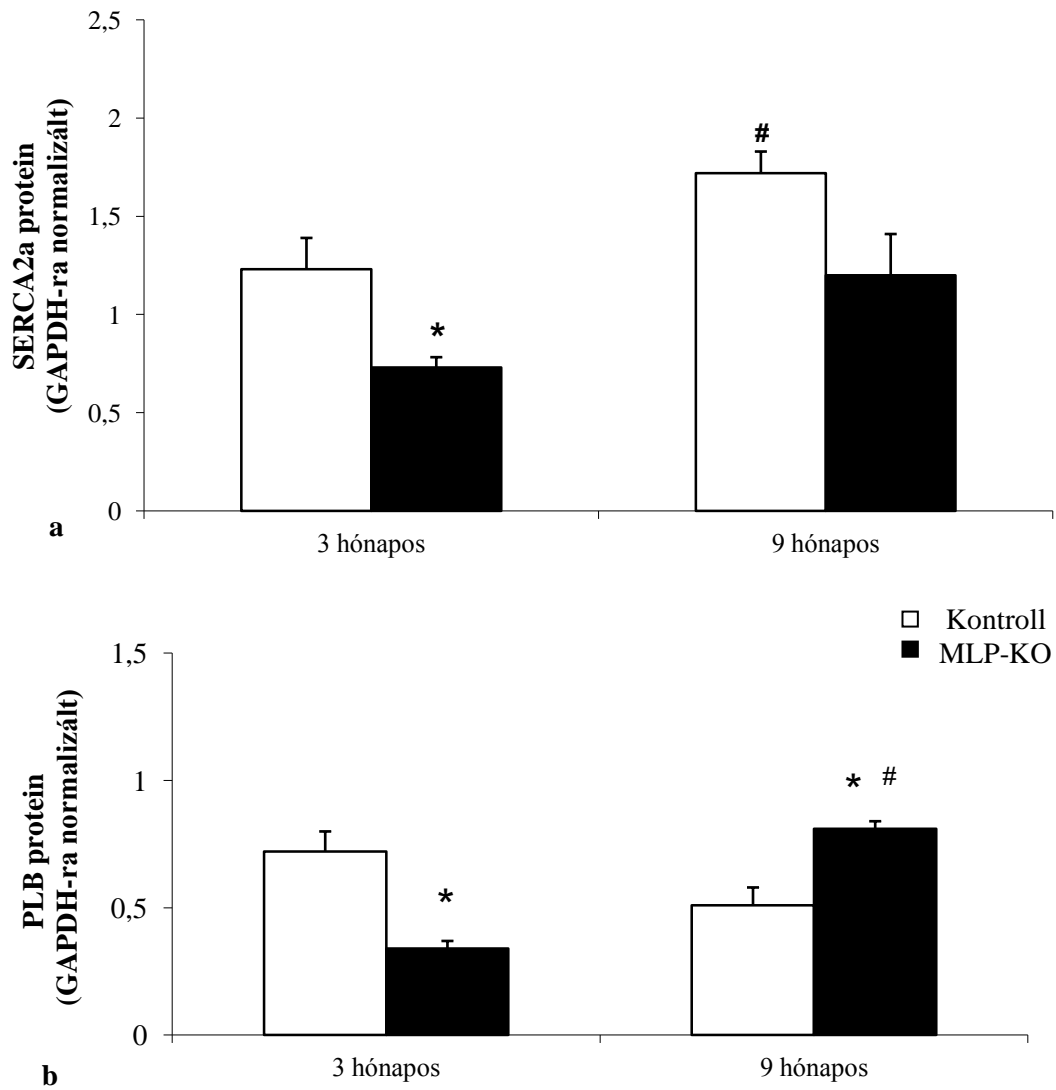
**6. Ábra** SERCA2a (a) és PLB (b) mRNS expresszió GAPDH-ra normalizált szintje 3 és 9 hónapos kontroll (□ n=6 és 6) és korazonos MLP-KO (■ n=7 és 9) szívekben.

\* jelzi a szignifikáns különbséget a MLP-KO szívek és korazonos kontroll szívek között; # jelzi a szignifikáns különbséget 3 és 9 hónapos állatok között a MLP-KO vagy a kontroll csoportban ( $p < 0,05$ ).

Hasonlóan a SERCA2a mRNS és protein szintjéhez a szívek PLB mRNS és protein szintje alacsonyabb volt a 3 hónapos MLP-KO egerekben, mint a kontrollokban. A 9 hónapos MLP-KO egerekben emelkedett PLB expresszió volt megfigyelhető a 3 hónapos egerekhez viszonyítva. Ez a változás mindkét paraméterben (mRNS, protein szint) mérhető volt. A 9 hónapos MLP-KO szívek mRNS és protein szintje meghaladta az azonos korú kontrollokét (6b., 7., 8b. Ábrák).



**7. Ábra** Ez a két reprezentatív kép a bal kamrai szövetmintákon végzett Western blot eredményét mutatja. A SERCA2a, PLB és GAPDH protein szintek a kontroll és MLP-KO, 3 és 9 hónapos egerekből származnak.



**8. Ábra** SERCA2a (a) és PLB (b) fehérjék GAPDH-ra normalizált szintjeit mutatja kontroll (□ n=6 és 6) és MLP-KO (■ n=7 és 9) 3 és 9 hónapos egerekben.

\* jelzi a szignifikáns különbséget az MLP-KO és az azonos korú kontroll csoport között ( $p < 0,05$ ). # jelzi a szignifikáns különbséget a 9 és 3 hónapos identikus csoportok között ( $p < 0,05$ ).



## 5.2. Metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia

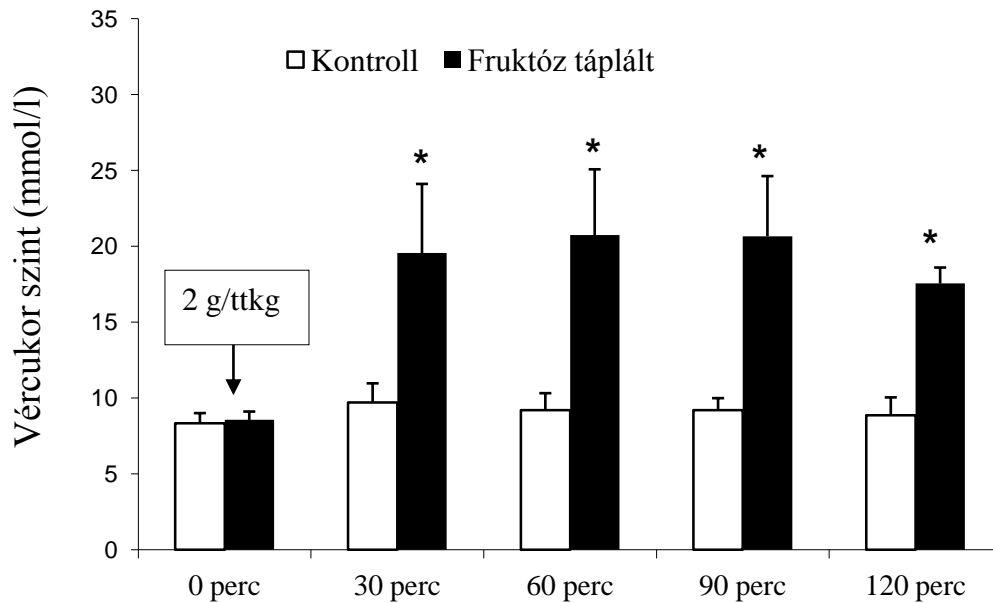
### 5.2.1. Általános adatok

A harmadik táblázatban foglaltuk össze a fruktóz táplálás kísérleti állatokra kifejtett hatásait. A fruktóz táplált patkányok testtömege nem tért el a kontroll állatokétól, ugyanakkor a szívtömeg meghaladta a normál tápon tartott állatok szívtömegét. Ezért a szívhipertrófiát jelző szívtömeg/testtömeg arány magasabb volt metabolikus szindrómában. Az artériás közép nyomás és a szérum triglicerid szintje szintén magasabb volt 6 hetes fruktóz táplálás után.

	Kontroll n=7	Fruktóz táplált n=8
Testtömeg (g)	399 ± 19	382 ± 34
Szívűtömeg (g)	1,37 ± 0,07	1,53 ± 0,23*
Szívűtömeg/Testtömeg 10 <sup>-3</sup> g/g	3,4 ± 0,1	4,0 ± 0,5*
Artériás közép nyomás (Hgmm)	86,5 ± 7,5	122 ± 7,1*
Éhomi vércukorszint (mmol/l)	7,8 ± 1,2	8,2 ± 1,4
Szérum triglicerid (mmol/l)	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,5*

**3. Táblázat** A kontroll és fruktóz táplált patkány szivek általános adatai \* jelzi a szignifikáns különbséget a kontroll és a fruktóz táplált csoport között (p<0,05).

Ugyanakkor az éhomi vércukor szint nem különbözött a csoportok között. Az orális glükóztolerancia teszt (oGTT) felfedte az inzulinrezisztencia meglétét: a vércukor emelkedés nagyobb volt a fruktóz táplált csoportban és két óra elteltével nem tért vissza az éhomi szintre, ellentétben a kontroll csoporttal (9. Ábra).



**9. Ábra** Kontroll (□ n=4) és fruktóz táplált patkányok (■ n=4) vércukor szintje glükóz tolerancia teszt előtt (0 perc) és az azt követő orális glükóz tolerancia teszt során, 2 g/ttkg glükóz alkalmazásával. \* jelzi a szignifikáns különbséget a fruktóz táplált és az azonos korú kontroll állatok között ( $p < 0,01$ ).

### 5.2.2. Echokardiográfiai eredmények

A bal kamra morfológiai analízise az interventrikuláris szeptum (IVSd) megvastagodását és a végdiasztolés térfogat megnövekedését mutatta a fruktóz táplált állatokban. A bal kamra kontraktilis képességét leíró dinamikus paraméterek közül a verőtérfogat megemelkedett metabolikus szindrómában szenvedő patkányokban, ezzel ellentétben a ejekciós frakció és fracionális rövidülés értékével, ami mindkét csoportban normális volt (4. Táblázat).

	Kontroll n=7	Fruktóz táplált n=8
IVSd (cm)	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,01*
EDV (cm <sup>3</sup> )	0,33 ± 0,05	0,44 ± 0,12*
PV (cm <sup>3</sup> )	0,25 ± 0,04	0,34 ± 0,1*
EF – (PV/EDV) (%)	76,8 ± 12,4	73,6 ± 8,3
FS (LVIDd-LVIDs)/LVIDd (%)	48,5 ± 11,2	49,9 ± 3,5

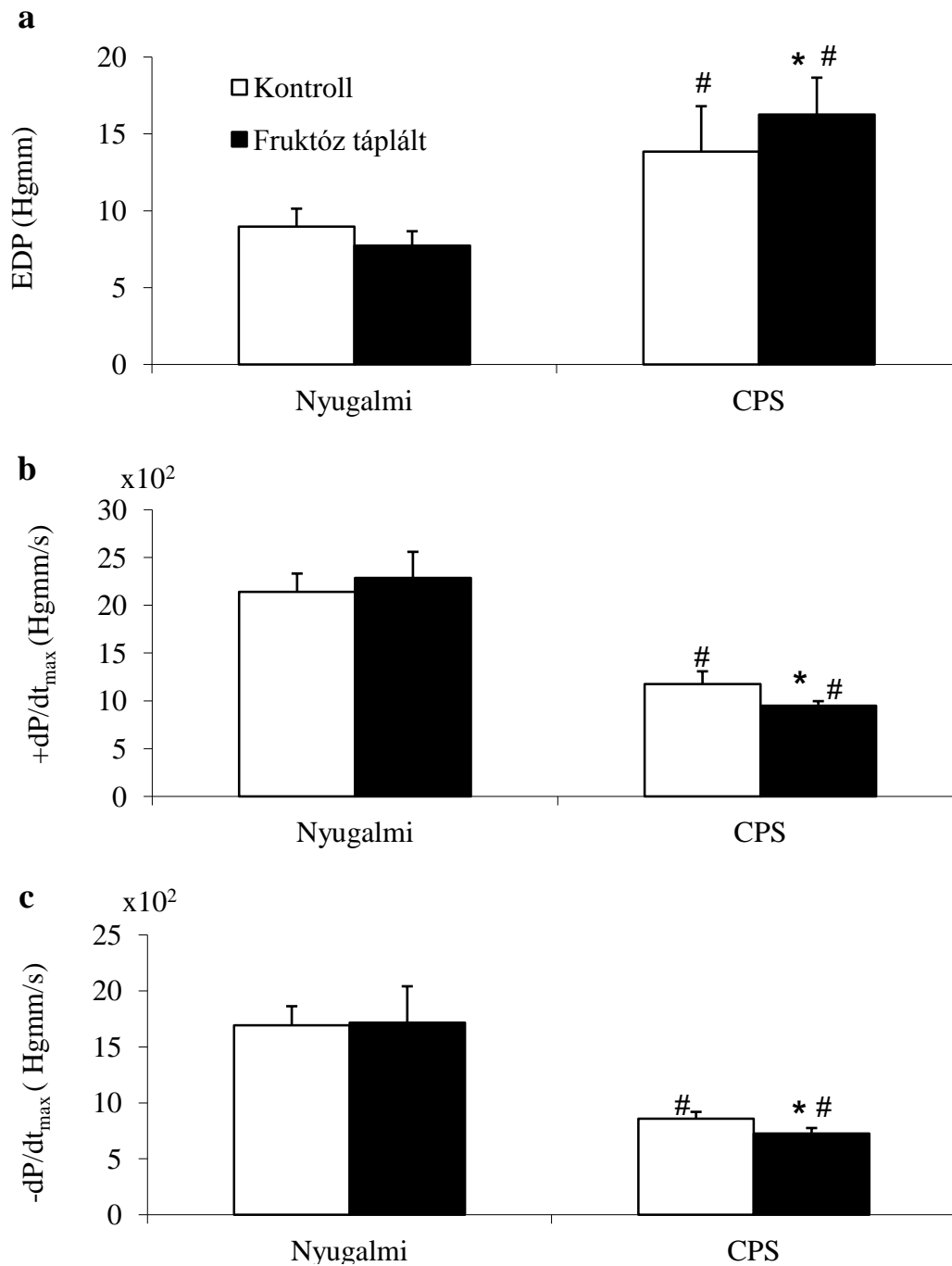
**4. Táblázat** Echokardiográfiával mért bal kamrai átmérő és in vivo pumpafunkció kontroll és fruktóz táplált patkányokban. IVSD(d): interventrikuláris szeptum vastagsága diasztolében, keresztmetszeti képen és a papilláris izomok szintjén mérve; EDV: bal kamrai végdiasztolés térfogat, PV: pulzus térfogat; EF: ejekciós frakció; FS: frakcionális rövidülés; LVID(d): bal kamrai diasztolés belső átmérő a keresztmetszeti képen és a papilláris izmok szintjén mérve; LVID(s): bal kamrai szisztolés belső átmérő a keresztmetszeti képen és a papilláris izmok szintjén mérve; \* jelzi a szignifikáns különbséget a kontroll és a fruktóz táplált csoport között ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.3. Hemodinamikai funkció

Nyugalmi körülmények között a pulzusnyomás (PP), a szívfrekvencia (5. Táblázat), a végdiasztolés nyomás, a szív inotróp és luzitrop funkciójára jellemző  $+dP/dt_{max}$  és  $-dP/dt_{max}$  nem mutat különbséget a kontroll és a fruktóz táplált csoport között. Ugyanakkor a szívizom vérellátása csökkent nyugalomban (5. Táblázat).  $5\mu M$  CPS adagolása jelzett mértékben csökkentette a nyomás amplitúdót, a szívfrekvenciát és a koronária áramlást mindkét csoportban, de a fruktóz táplált csoportban a válasz kifejezettebb volt (5. Táblázat). A beteg szívek nagyobb érzékenységét CPS-ra a magasabb végdiasztolés nyomás, a csökkent  $+dP/dt_{max}$  és  $-dP/dt_{max}$  értékek is alátámasztják (10. Ábra).

	Kontrol n=7	Fruktóz táplált n=8
<b>(a) Nyugalmi állapot</b>		
Pulzus nyomás (Hgmm)	102 ± 12	101 ± 16
Koronária áramlás (ml/min× g)	15,2 ± 1,9	12,2 ± 1,4 <sup>*</sup>
Szívfrekvencia (1/min)	283 ± 18	278 ± 30
<b>(b) 5μM CPS</b>		
Pulzus nyomás (Hgmm)	68 ± 11 <sup>#</sup>	54 ± 12 <sup>*#</sup>
Koronária áramlás (ml/min× g)	12,4 ± 1,5 <sup>#</sup>	9,3 ± 1,2 <sup>*#</sup>
Szívfrekvencia (1/min)	241 ± 26 <sup>#</sup>	252 ± 24 <sup>#</sup>

**5. Táblázat** A kontroll és a fruktóz táplált patkányok szíveinek hemodinamikai paramétereit nyugalmi helyzetben, valamint 5μM CPS adagolását követően. \* jelzi a statisztikai különbséget a kontroll és a fruktóz táplált csoport között ( $p < 0,05$ ); # jelzi a szignifikáns különbséget a nyugalmi és a CPS kezelés követő állapot között ( $p < 0,05$ ).

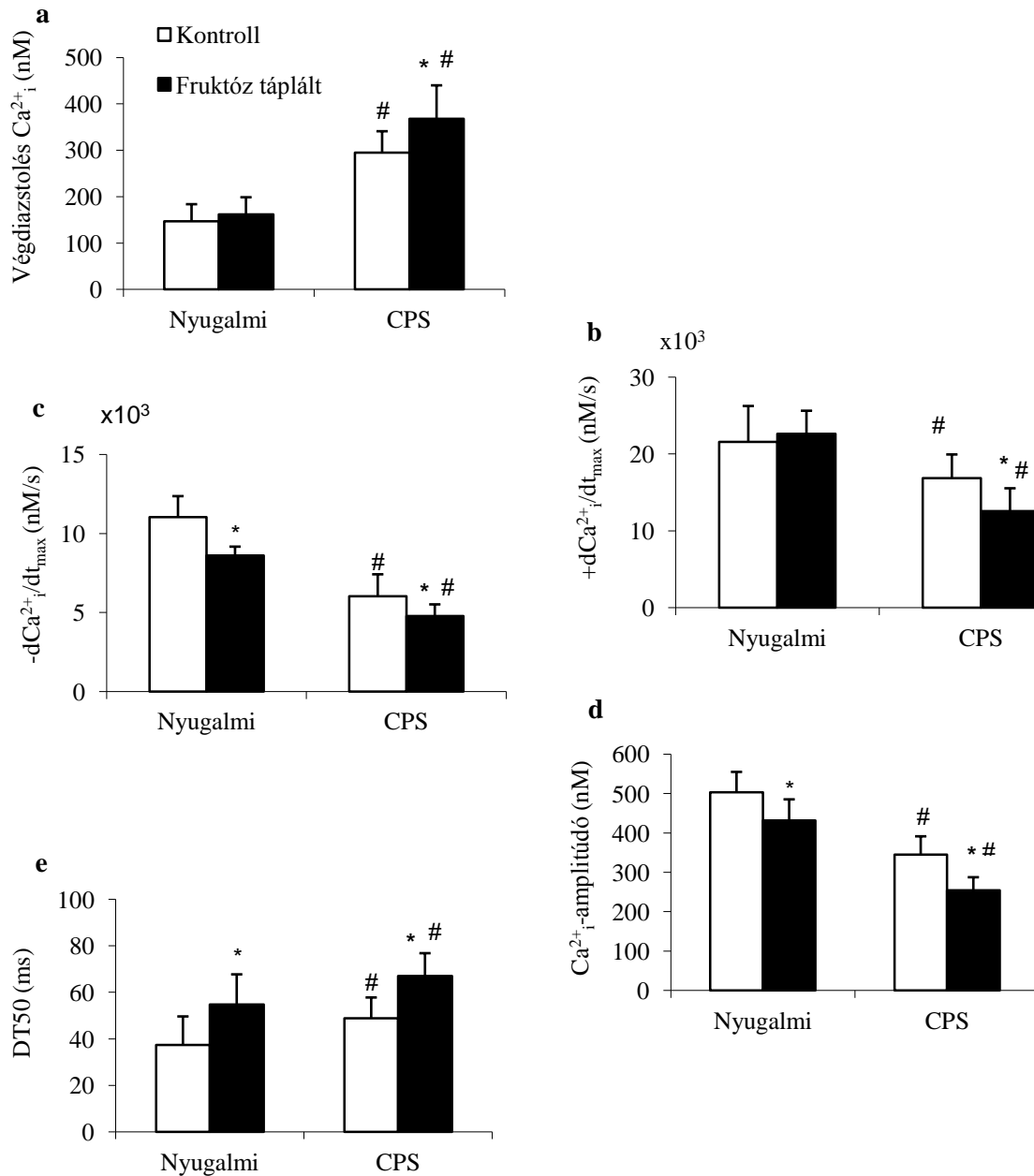


**10. Ábra** Végdiasztolés nyomás értékek (EDP) (a) és a bal kamrai nyomásemelkedés ( $+dP/dt_{max}$ ) (b) és csökkenés ( $-dP/dt_{max}$ ) (c) maximuma kontroll (□ n=7) és fruktóz táplált (■ n=8) patányokban nyugalmi körülmények között, és 5  $\mu$ M ciklopiazonsav (CPS) kezelés hatására. \* jelzi a szignifikáns különbséget a fruktóz táplált és az azonos korú kontroll szívek között ( $p < 0,05$ ); # jelzi a statisztikai különbséget a CPS hatás és a nyugalmi állapot között kontroll és fruktóz táplált csoportokban ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.4. Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ háztartás

Nyugalmi körülmények között nem volt eltérés a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  szint és a  $\text{Ca}^{2+}_i$  emelkedés maximális sebessége ( $+d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$ ) tekintetében a két csoport között. Ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}_i$  csökkenés maximális sebességének ( $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$ ) és a  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranzien lecsengés félidejének ( $DT_{50}$ ) változása az SR  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztrációjának csökkenésére utal a metabolikus szindrómában szenvedő állatoknál (11c., 11e. Ábra). A csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció a  $\text{Ca}^{2+}$  tranzien amplitúdó csökkenéséhez vezetett (11d. Ábra). CPS adagolás hatására emelkedett a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  szint, ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}$  tranzien amplitúdó,  $DT_{50}$ ,  $+d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$ ,  $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  csökkent a bazális szinthez képest mindkét csoportban. Az  $\text{Ca}^{2+}_i$  ciklus sokkal érzékenyebb volt a SERCA2a gátlásra a fruktóz táplált patkányokban. A  $\text{Ca}^{2+}_i$  ciklus sokkal érzékenyebb volt a SERCA2a gátlásra a fruktóz táplált patkányokban, mivel ezek a változások szignifikánsan kifejezettebbek voltak a metabolikus szindrómában szenvedő patkányokban a kontroll állatokhoz képest (11. Ábra). A CPS indukált változások megjelennek mind a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályzásban, mind a hemodinamikai paraméterek változásában az érintett szívekben (10. Ábra).

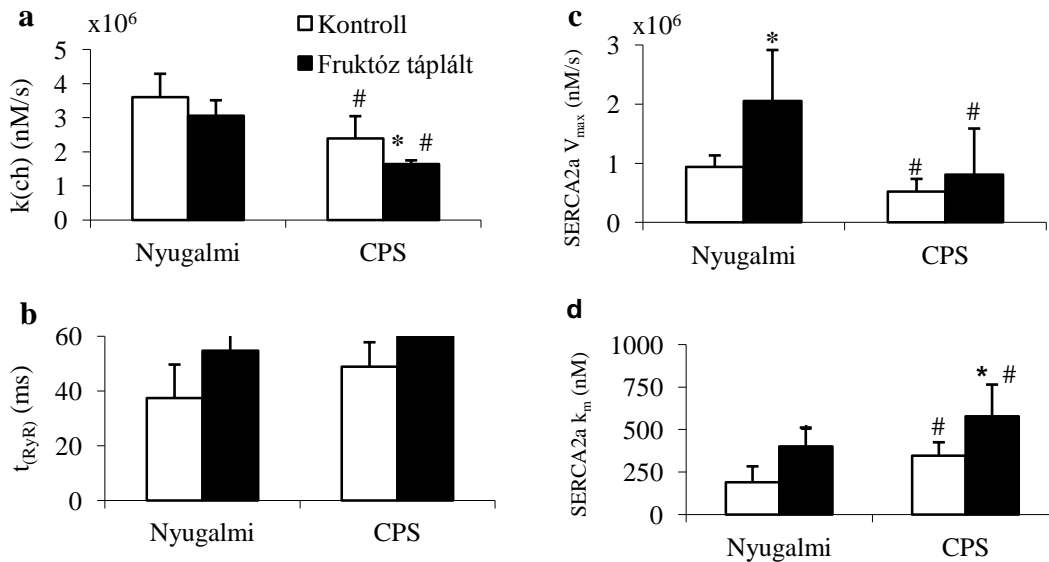
A  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziensekre illesztett modell egyenlet alapján becsültük meg az SR  $\text{Ca}^{2+}$  transzportereinek kinetikus paramétereit (RyR2:  $k_{ch}$  és  $t_{0.5}$ , SERCA2a:  $V_{\max}$  és  $k_m$ ) (12. Ábra). A modellelemzés azt mutatta, hogy a RyR2 csatornán keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás sebessége nem különbözött a beteg és az egészséges szívekben. A RyR2 konduktanciája CPS adagolása után mindkét csoportban csökkent, ugyanakkor a fruktóz táplált csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva (12a. Ábra). A RYR2  $t_{0.5}$ -je mindkét csoportban hasonló volt és CPS hatására sem változott (12b. Ábra). A modellelemzés szerint a metabolikus szindrómában szenvedő patkányok szíveiben a SERCA2a  $V_{\max}$  magasabb volt nyugalmi állapotban, és SERCA2a gátlóra is érzékenyebben reagált. A SERCA2a CPS-re adott fokozott válaszkészségét az is mutatja, hogy a CPS hatására a nyugalmi állapotban a  $V_{\max}$  értékében észlelt különbség eltűnt (12c. Ábra). A SERCA2a  $k_m$  magasabb volt a beteg szívekben. CPS hatására a SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$  affinitása mindkét csoportban csökkent, de a kiindulási különbség megmaradt a két csoport között. (12d. Ábra).



**11. Ábra** Végdiazstolás  $Ca^{2+}_i$  koncentráció (a) és  $Ca^{2+}_i$  koncentráció emelkedés ( $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ) (b), és csökkenés ( $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ) (c) maximális mértéke, amplitúdó (d) és a  $Ca^{2+}$  tranzien 50%-ra csökkenéséhez szükséges idő (e) kontroll (□ n=7) és fruktóz táplált (■ n=8) állatokban nyugalmi állapotban és 5  $\mu$ M ciklopiazonsav hatására (CPS). \* jelzi a szignifikáns különbséget a fruktóz táplált és az azonos korú kontroll szívek között ( $p < 0,05$ ); # jelzi statisztikai különbséget a CPS hatás és a nyugalmi állapot között kontroll és fruktóz táplált csoportokban ( $p < 0,05$ ).

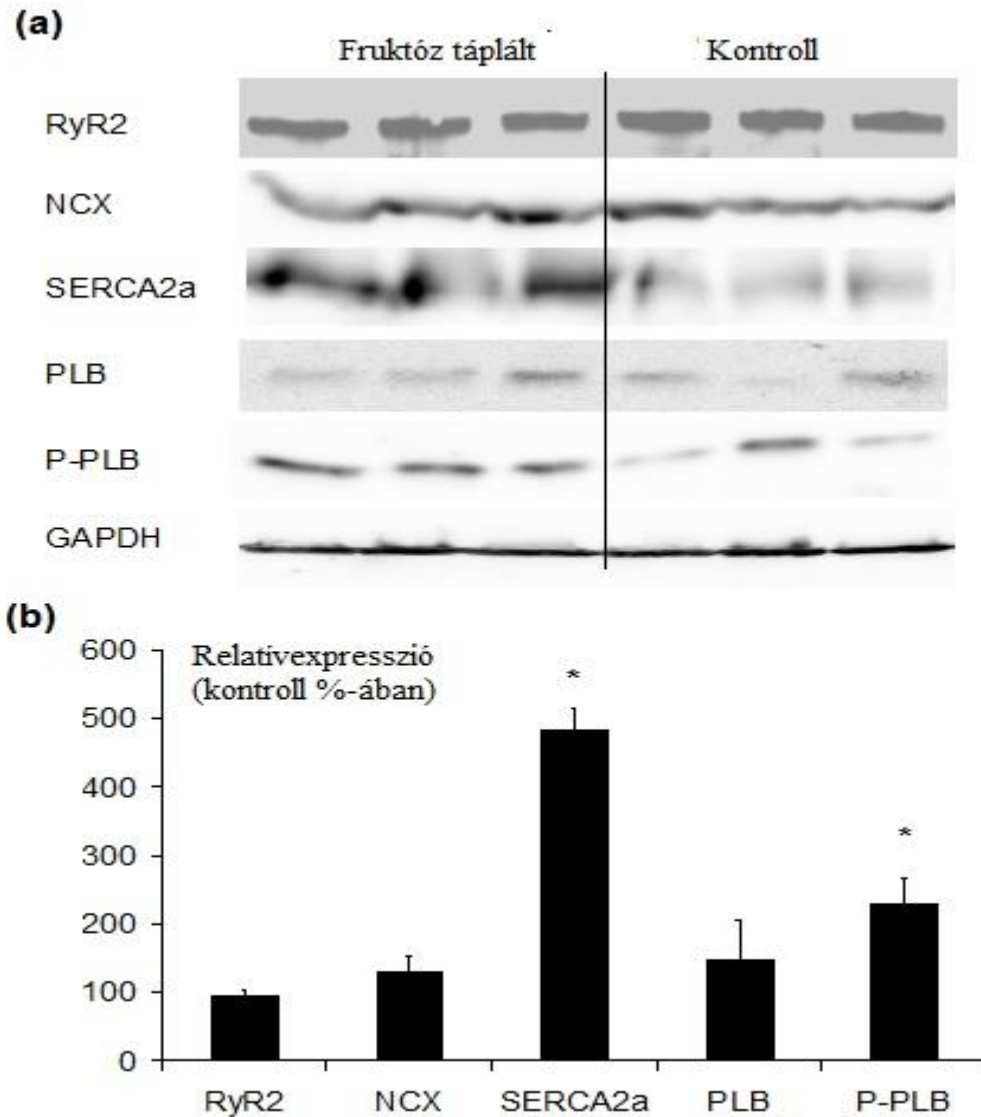
### 5.2.5. A $\text{Ca}^{2+}_i$ szabályozásban résztvevő enzimek protein expressziója

A  $\text{Ca}^{2+}_i$  körforgásban résztvevő fő proteinek expresszióját a kontroll érték százalékában fejeztük ki és ábrázoltuk a 13. Ábrán. Az  $\text{Ca}^{2+}_i$  felszabadító RyR2 csatorna expressziója hasonló volt a kontroll értékhez (relatív expresszió:  $92,3 \pm 25,2\%$ ). A  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolító enzimek közül az NCX expressziójára szintén nem gyakorolt hatást a fruktóz gazdag diéta. Ellenben a SERCA2a protein szintje többszörösen megemelkedett az érintett szívekben. A SERCA2a fő szabályzó proteinje a PLB szintje nem különbözött a két csoportban, míg a foszforilált forma (P-PLB) szintje jelentősen meghaladta a kontroll értéket.



**12. Ábra** A SR transzporterek kinetikai paramétereit a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens matematika modell alapján becsült értékei: a RyR2  $k_{ch}$  (a) és  $t_{RyR2}$  (b) paramétereit és a SERCA2a  $V_{max}$  (c) és  $k_m$  (d) értéke a kontroll (□ n=5) és fruktóz táplált (■ n=6) állatokban nyugalmi állapotban és 5  $\mu\text{M}$  ciklopiazonsav (CPS) hatást követően. \* jelzi a szignifikáns különbséget a fruktóz táplált és az azonos korú kontroll egyedek között; # jelzi a szignifikáns különbséget a CPA hatás és nyugalmi állapot között a kontroll és a fruktóz táplált csoportban ( $p < 0,05$ ).





**13. Ábra** A fruktóz táplált és a kontroll állatok szívéből vett mintán készített Western blot analízis során készül reprezentatív képet láthatjuk, amelyeken a RyR2, NCX, SERCA2a, PLB, P-PLB és GAPDH fehérjeszintjei ábrázolódnak. A GAPDH denzitometriás értékei hasonlóak mindkét csoportban, amiből látható, hogy egyenlő mennyiségű fehérje került a SDS lapra. A további kísérletek is hasonló eredményre vezettek (a). A fruktóz táplált állatok  $\text{Ca}^{2+}$  szabályzó fehérjéinek relatív expressziója a kontroll állatokban mért értékek százalékában kifejezve (n=3-5) (b). \* jelzi a szignifikáns különbséget a fruktóz táplált és a korazonos kontroll egyedek között ( $p < 0,05$ ).

## 6. Megbeszélés

### 6.1. MLP-KO

Arber és mtsai MLP-KO egereken végzett vizsgálatait során két fenotípust azonosítottak: a korai fenotípust letális kardiális sejtstruktúraváltozás jellemzi, ami miatt a születést követő két héten belül elpusztul, és a késői fenotípust, ami annak ellenére, hogy nem rendelkezik MLP génnel, megéli a felnőtt kort. Arber és mtsai genetikai különbséget feltételeztek a két fenotípus között. Másrészt a születés után a beteg szívekben hirtelen fellépő tényezők (szisztémás és lokális szignálok, falfeszülés fokozódás) kedvezőtlen együtthatása válthatja ki azt a gyors patológias reakciót, amely rövid időn belül szívelégtelenséghez vezet (Arber és mtsai 1997).

Az MLP hiányos humán kardiomiopátiás esetek viszonylag későn kerülnek felismerésre, átlagosan 48 éves életkorban. Az a megfigyelés, hogy mind a humán esetekben későn történik a diagnózis, mind az egérkísérletekben későn manifesztálódik a szívelégtelenség, kompenzációs mechanizmusok jelenlétét támasztja alá. A folyamat pontos részletei nem ismertek. Mivel a kalcium ionok fontos szerepet játszanak a szív kontraktilis folyamatában, feltételezhető egy adaptív, kalcium szabályozáshoz kapcsolódó mechanizmus a betegség korai szakaszában, amely kompenzálja az MLP gén hiánya által okozott hátrányos hatásokat a beteg szívekben.

Ezidáig számos tanulmány foglalkozott az inotróp és luzitrop diszfunkciók hátterében lezajló  $Ca^{2+}_i$  változások feltérképezésével (Antoons és mtsai 2006, Esposito és mtsai 2000, Lorenzen-Schmidt és mtsai 2005, Su és mtsai 2001). Ezek a tanulmányok izolált szívizomsejteken végzett kísérleteken alapultak, és eredményeik ellentmondásosak voltak. Egy részük a  $Ca^{2+}_i$  tranziens növekedését (Antoons és mtsai 2006, Su és mtsai 2001), más része a tranziens csökkenését mutatta (Esposito és mtsai 2000). Feltételezhetjük, hogy a különbségeket a kísérleti körülmények eltérései eredményezhették. Az izolált szívizomsejtek sok szempontból különböznek az intakt szívben fellelhetőkétől, például az eltérő mechanikus terhelés, intersticiális mátrix és folyadék hiánya. Kísérleteinket ex vivo perfundált intakt szíveken végeztük, amelyek közelebb állnak az in vivo szituációhoz, mint az izolált sejtes vizsgálatok.

A jelen tanulmány egyértelműen igazolja, hogy a MLP-KO egerek alacsonyabb SERCA2a mRNS szinttel és protein szinttel rendelkeznek, valamint ennek következményeként csökkent luzitróp funkciót mutatnak 3 hónapos korban összehasonlítva az azonos korú kontrollokkal. 9 hónapos korban sem a SERCA2a mRNS szintje, sem a relaxáció dinamizmusa nem különbözött az egészséges egyedekétől. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a MLP-KO szívek képesek adaptív mechanizmusokat mozgósítani a kor előrehaladtával. A legvalószínűbb folyamat a SERCA2a expressziójának növekedése. Ennek az adaptív folyamatnak a létezését Constandi és mtsai (Constandi és mtsai 2006) korábbi tanulmányai is alátámasztják, melyben leírták az MLP-KO szívek luzitróp és inotróp funkció javulását 15 és 31 hetes kor között. Az itt közölt adatok hasonlóak a 6 hónapos MLP-KO izolált szívműködéseken végzett vizsgálatok eredményeihez, ahol normális vagy fokozott SR aktivitást találtak (Su és mtsai 2001). Korábbi életkorban végzett vizsgálatok nem állnak rendelkezésre az irodalomban.

A nyugalmi állapotban rögzített  $Ca^{2+}_i$  tranziens 3 hónapos korban nem különbözött a két csoport között. A normális  $Ca^{2+}_i$  tranziens alacsonyabb SERCA2a expresszióval arra utal, hogy a SERCA2a mennyiségének csökkenése ellenére a szívműködés megfelelő sebességgel képes visszapumpálni az  $Ca^{2+}$  a SR-ba, más szóval a SERCA2a tartalék kapacitása nem merül ki az adott körülmények között. Ez a jelenség, ha csak részben is, de magyarázható a PLB csökkent szintjével.

A luzitróp funkció (csökkent) és a  $Ca^{2+}_i$  eltávolítás foka (változatlan) közötti aránytalanságot a 3 hónapos MLP-KO állatokban a kontraktilis apparátus fokozott  $Ca^{2+}_i$  érzékenysége okozhatja. Ezt támasztja alá Van der Velden és mtsai (Van der Velden és mtsai 2003) tanulmánya is, melyben rámutat a kontraktilis egységek fokozott  $Ca^{2+}_i$  szenzitivitására a beteg szívekben, ami magyarázhatja a diasztolés relaxáció csökkenését normális  $Ca^{2+}_i$  körforgás és koncentráció mellett.

A SERCA2a, a  $Ca^{2+}_i$  és a kontrakciós teljesítmény közötti kapcsolat alaposabb megismerése érdekében az izolált szíveket CPS (SERCA2a blokkoló) hatásának tettük ki. Ennek eredményei világosan mutatják, hogy a 3 hónapos MLP-KO szívek érzékenyebbek a CPS-ra, mint a 9 hónapos MLP-KO szívek összevetve az azonos korú kontroll szívekkel. CPS hatására mind az inotróp, mind a luzitróp funkció szignifikánsan változott (4. Ábra), valamint a végdiasztolés nyomás majdnem

kétszeresére emelkedett a 3 hónapos szívekben. A CPS adagolás a 9 hónapos szívekben nem fedett fel különbséget a funkcionális paraméterekben a két csoport között, ami utal a  $\text{Ca}^{2+}_i$  kapcsolt kompenzációs mechanizmus jelenlétére a felnőtt MLP-KO fenotípusban. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, miszerint a CPS  $\text{Ca}^{2+}_i$  visszapumpálására ( $-\text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}_{max}$ , 5b. Ábra) kifejtett csökkentő hatása elég kifejezett a 3 hónapos MLP-KO egerekben, ugyanakkor 9 hónapos korban gyakorlatilag hiányzik. Ugyanez érvényes a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  koncentrációra. A 3 hónapos MLP-KO szívekre kifejtett CPS hatás a csökkent SERCA2a mRNS és fehérje szinttel magyarázható (6a., 8a. Ábrák).

A SERCA2a aktivitás nem ítéhető meg a PLB expresszió és a PLB foszforiláltsági szintjének ismerete nélkül. A PLB mRNS és protein szint hasonló lefutást mutat mint a SERCA2a mRNS és protein szint változása (6., 7., 8. Ábra). 3 hónapos korban a PLB (mRNS) szint alacsonyabb volt az MLP-KO szívekben, és hasonló mértékben emelkedett 9 hónapos korig, mint a SERCA2a expresszió. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a tanulmányokkal, amelyek szintén a SERCA2a és a PLB párhuzamos változását mutatták ki különböző szívelégtelenség modellekben (Kiss és mtsai 1995, Qi és mtsai 2010). A 9 hónapos MLP-KO egerekben a PLB expresszió magasabb volt, mint a korazonos kontroll csoportban. Ugyanakkor ez nem tükröződött a SERCA2a fokozott gátlásában, mivel megfigyelhető volt a luzitrop diszfunkció normalizálódása, valamint eltűnt a CPS-ra adott fokozott, diasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$ -t emelő válasz. Ezt a jelenséget a PLB megváltozott foszforiláltsági szintje magyarázhatja, de ezt a jelen tanulmányban nem vizsgáltuk.

Davidson és Koch tartós csökkenést észlelt a  $\beta$ -adrenerg receptor aktivitásban az MLP-KO szívekben. Tanulmányukban sikerült visszaállítaniuk a  $\beta$ -adrenerg választ egy a  $\beta$ -adrenerg receptor kinázt 1 gátló szívcélpontú transzgénnel (Davidson és Koch 2001). Mivel a fokozott  $\beta$ ARK1 aktivitás gátolja a  $\beta$ -adrenerg receptor aktivitást, ezért a  $\beta$ ARK1 hiánya feltételezhetően növeli a  $\beta$ -adrenerg receptor funkcióját (Rockman és mtsai 1998). Annak ellenére, hogy kísérleteinkben az izolált szíveket izoproterenol hatásának tettük ki, nem figyeltünk meg különbséget izoproterenolra adott válaszok tekintetében (a hemodinamikai, és a  $\text{Ca}^{2+}_i$  paraméterek esetén sem) a kontroll és MLP-KO csoport között egyik életkorban sem (1. Táblázat, 4., 5. Ábrák). Emiatt az eredményeink nem összeegyeztethetőek a korábbi tanulmányban megfigyelt  $\beta$ -adrenerg receptor aktivitás csökkenéssel (Davidson és Koch 2001). A két tanulmány közötti

eltérés nem egyértelmű, más, a jelátviteli útvonalban máshol elhelyezkedő változás feltételezhető.

Az  $\text{Ca}_i^{2+}$  homeosztázisban fellépő változás eméletesleg magyarázható lenne más, a  $\text{Ca}_i^{2+}$  szabályozásban résztvevő fehérjék (NCX, RyR2) funkcionális vagy expressziós változásával. Bár vizsgálatainkban nem volt kimutatható különbség az említett fehérjék szintjében az MLP-KO és a kontroll csoport között, a funkcionális eltérés nem kizárható. Ezek az eredmények összhangban vannak Antoon és mtsai (Antoon és mtsai 2006) vizsgálataival, amik szintén nem mutattak változást az NCX szintben a 3 hónapos MLP-KO szívekben.

Fontos szerepe lehet annak a megfigyelésnek, hogy a 3 hónapos MLP-KO szívek koronária áramlása bazális állapotban szignifikánsan magasabb volt az azonos korúakénál. Átlagosan a 3 hónapos egerekben 61%-kal emelkedett a koronária áramlás a vazodilatáció miatt, ugyanakkor a szív energiaszükséglete feltételezhetően változatlan. Ez a megfigyelés felfedheti a kémiai energia mechanikai energiává alakításának csökkent hatékonyságát, bár a pontos mechanizmus nem teljesen tisztázott. Van den Bosch és kollégái mitokondriális diszfunkciót mutattak ki MLP-KO egerekben, ami energia deficithez vezet (Van den Bosch 2005). Ez indokolhatja a magasabb koronária áramlást a 3 hónapos MLP-KO egerekben a kontrollhoz viszonyítva. A koronária áramlás százalékos emelkedése 9 hónapos korú MLP-KO szívekben 29%-ra esik vissza az azonos korú kontrollhoz képest, ami a szív energiahatékonyságának javulására utal a kor előrehaladtával.

## **6.2. Metabolikus szindróma indukálta kardiomiopátia**

A fejlett társadalmakban a metabolikus szindróma gyorsan növekvő prevalenciát mutat és a szívérrendszeri halálozás fő rizikófaktorai között szerepel (Day 2007, Eckel és mtsai 2011). Az erekre kifejtett hatások mellett, aminek során fokozott ateroszklerózis és endoteliális diszfunkció alakul ki, a metabolikus változások akadályozzák a kardiomiociták normális anyagcseréjét. Felhalmozódnak a lipidmetabolizmus köztitermékei a fokozott szabad zsírsav felhasználás miatt (lipid shift), megváltozik a kardiomiociták fehérjeösszetétele a csökkent inzulin hatás miatt, valamint aktiválódik a renin-angiotenzin rendszer (Adeghate 2004, Asghar és mtsai 2009, Coort és mtsai 2007, Dhalla és mtsai 1998, Falcão-Pires és Leite-Moreira 2011, Fang és mtsai 2004). Ezekhez a változásokhoz hozzáadódik a magas vérnyomás közvetlen hemodinamikai

hatása a miokardiumra. Ezek a faktorok nagy része közvetetten (oxidatív stress) vagy közvetlenül megzavarja a membrántranszport folyamatokat, és ezáltal csökkenti a kardiomiociták ion homeosztázis fenntartó képességét, így köztük a kalcium ionét. Mivel a  $Ca^{2+}_i$  közvetlenül hat a kontraktilis teljesítményre, ezért a kalcium szabályzásnak közvetelen hatása van a kardiális funkcióra. Számos humán és állatkísérletes tanulmány bizonyítja, hogy a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis megváltozása fő szerepet játszik a kardiális teljesítmény romlásában különböző szívbetegségben. Gyakran a SERCA2a funkció változása tehető felelőssé, amit vagy a transzporter fehérje vagy a regulátor fehérje expressziójának változása hoz létre (Arai és mtsai 1994, Bers 2000, Choi és mtsai 2002, Netticadan és mtsai 2001, Pieske és mtsai 1999, Takizawa és mtsai 1999). Annak ellenére, hogy nyilvánvaló kapcsolat van a  $Ca^{2+}_i$  szabályzás zavara és a csökkent szívteljesítmény között, kettőjük viszonya sokkal összetettebb. Ez különösen igaz a metabolikus szindrómára, ahol a szív több károsító tényező hatásának van kitéve (inzulin rezisztencia, hipertenzió, diszlipidémia) (Tran és mtsai 2009). Saját eredményeink alapvető információkkal szolgálnak az  $Ca^{2+}_i$  szabályzó folyamatok sajátosságairól a szív pumpafunkció viszonyában a metabolikus szindróma állatkísérletes modelljében.

Kísérleteinket a betegség olyan stádiumában hajtottuk végre, amikor a metabolikus szindróma tünetei (magas vérnyomás, inzulin rezisztencia, szérum lipid eltérések) megjelentek, ugyanakkor a szívfunkció még kompenzált. Tanulmányunk egyedi abban az értelemben, hogy az izolált szív  $Ca^{2+}_i$  tranziens mérését az alap hemodinamikai paraméterek rögzítésével együtt végeztük. Ez lehetőséget teremtett arra, hogy megbízhatóbban viszonyítsuk ezeket az értékeket a kardiális funkcióhoz, mint az izolált sejtes kísérletekben. Továbbá kísérletünket kiegészítettük in vivo echokardiografiával és a  $Ca^{2+}_i$  szabályzó fehérjék expressziójának meghatározásával. A laborunkban kifejlesztett matematikai modell segítségével meghatároztuk a SERCA2a működési sajátosságait. Kísérleteink eredményei összefoglalva a következők: 1. metabolikus szindrómában a SERCA2a funkció csökkenése megelőzi a manifeszt szívdiszfunkciót, 2. a betegség ezen stádiumában a SERCA2a aktivitás csökkenésének hátterében nem a pumpa expressziójának csökkenése, hanem funkcionális defektus áll, ugyanakkor az aktiválódó kompenzációs mechanizmusok fenn tudják tartani a fiziológias transzporterkapacitást és így a kontraktilis teljesítményt.

A szívfunkció teljes vizsgálata nem mutatott eltérést a bal kamrai szívfunkcióban nyugalmi körülmények között. Az emelkedett szívtömeg – testtömeg arány és a vastagabb interventrikuláris szeptum arra utal, hogy az adaptáció a bal kamrai hipertrófia segítségével jött létre. A bal kamrai hipertrófia jellemezhető a génexpresszió változásával és a kontraktilis proteinek izotípus váltásával (Glennon 1995), ami a mechanikai stressz enyhítése miatt jön létre. Ugyanakkor a hipertrofizált szív tulajdonságai nagymértékben különböznek a normálistól, és előrevetítik a kardiális diszfunkció lehetőségét (Ter Horst 2011). Ilyenkor a rágcsálók szívében miozin nehéz lánc (MHC) izotípus váltás jön létre, mely során az  $\alpha$  MHC-t  $\beta$  MHC helyettesíti. Ez a kontraktilis fehérjék lassabb rövidüléséhez vezet. Számos tanulmányban megtalálható, hogy a cukorbeteg és nyomás túlterhelt szívekben a fruktóz táplálás  $\alpha$  MHC átírását fokozza (Dillmann 1984, Pillai és mtsai 2008). Ezek alapján feltételezhető, hogy a mi modellünkben a szívhipertrófia ellenére izotípus váltás elmaradhat, hogy megelőzze a kontraktilis funkció csökkenését.

A falvastagság növekedése mellett a bal kamra tágulata is észlelhető. A megemelkedett szív méret, ugyanakkor nem jár együtt a vérellátás növekedésével (5. Táblázat). A nem megfelelő vérellátás újabb káros mechanizmusok aktiválódását vonhatja maga után. A szív szisztolés és diasztolés hemodinamikai funkciója nem tért el a két csoportban (10. Ábra, 5. Táblázat).

Ugyanakkor a  $Ca^{2+}_i$  tranziens elemzése alapvető eltéréseket mutatott a  $Ca^{2+}_i$  szabályozásban már nyugalmi állapotban is. A  $Ca^{2+}_i$  eltávolítás sebessége csökkent a diasztolé során és a  $Ca^{2+}_i$  tranziens amplitúdó is kisebb a fruktóz táplált patkányok szívében ( $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ,  $DT_{50}$  11c., 11d., 11e. Ábrák). A kontrakciót kiváltó  $Ca^{2+}$  90%-a a SR és a citoszól között cirkulál (Bers 2000), emiatt a  $Ca^{2+}$  szekvesztráció csökkenése a SERCA2a funkciójának csökkenésére utal. A szisztole során kialakuló  $Ca^{2+}_i$  szint csökkent, valószínűleg a SR alacsonyabb  $Ca^{2+}$  töltöttsége miatt, amit a SERCA2a alacsonyabb transzport kapacitása okozhatott.

A  $Ca^{2+}_i$  szabályozás eltérését a SERCA2a mellett az akciós potenciál meghosszabbodása is okozhatja, mivel egyes tanulmányokban kimutatták, hogy különböző szívbetegségekben csökkenti a  $Ca^{2+}_i$  tranzienszt (Aiba és Tomaselli 2010, Howarth és mtsai 2009). Technikai okok miatt kísérleti elrendezésünk nem volt alkalmas az akciós potenciál időtartamának mérésére. Ugyanakkor Shimoni és

munkatársai kimutatták azonos állatkísérletes modellben, hogy a fruktóz gazdag diéta nem változtatta meg az akciós potenciál időtartamát, ezért az akciós potenciál esetleges változása nincs jelentős hatással a  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozásra modellünkben (Shimoni és mtsai 1998).

A megfelelő SERCA2a funkciót számos faktor befolyásolja. Ezek között vannak a transzporter funkcionális sajátosságai, expressziójának abszolút mértéke, valamint viszonylagos szintje, összehasonlítva a szabályzó fehérjéjének (PLB) expressziójával és a PLB foszforilációs szintjével (Periasamy és mtsai 2008). A SERCA2a diszfunkció eredhet a transzporter megemelkedett  $k_m$ -jéből vagy a csökkent  $V_{\max}$ -jából. A modell becslése alapján a SERCA2a kinetikus paraméterei közül a  $k_m$  érték emelkedett, vagyis csökkent a  $\text{Ca}^{2+}$  iránti affinitása, ellentétben a szignifikánsan magasabb transzport aktivitással ( $V_{\max}$ ) (12c., 12d. Ábrák). A SERCA2a expressziója jelentősen megemelkedett az érintett patkányok miokardiumában (13. Ábra). A PLB fehérje szintje ugyanakkor változatlan maradt, ami a SERCA2a/PLB arány emelkedéséhez, a SERCA2a funkció növekedéséhez vezetett. Ezt a hatást még tovább erősítette a beteg szívek PLB-jának fokozott foszforilációs szintje (8. Ábra). A  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció ( $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$ ) mértéke a transzporter affinitásának és transzport kapacitásának együttes hatásaként alakul ki. A metabolikus szindrómában megfigyelt változások, a csökkent SERCA2a funkció, feltételezhetően a csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  affinitással magyarázható. A betegség ezen stádiumában kompenzációs mechanizmusok indulnak be. Ezek között van a SERCA2a expresszió fokozódása, valamint a PLB-t foszforiláló mechanizmusok aktiválódása, ami közvetetten hat a SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$  affinitására. A kompenzációs folyamatok eredményeképpen, a SERCA2a transzport aktivitása fokozódik (12c. Ábra). A PLB magasabb foszforilációjának ellenére a transzporter  $\text{Ca}^{2+}$  affinitása alacsonyabb marad a fruktóz táplált patkányokban (12d. Ábra), emiatt a SR-ba visszapumpált  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége nem éri el a kontroll értéket.

Jól ismert, hogy szívelégtelenségben csökken a SERCA2a funkció és expresszió (Bers 2000, Periasamy és mtsai 2008). Kísérleteinkben a szívek SERCA2a fehérje szintje emelkedett a metabolikus szindrómában szenvedő patkányokban (13. Ábra). Ez az ellentmondás abból eredhet, hogy vizsgálatainkat a szívelégtelenség korai fázisában végeztük, amikor a szív még képes volt adaptálódni. Elképzelhető, hogy a SERCA2a upregulációja kompenzálja a metabolikus szindróma miatt csökkent SERCA2a funkciót. Ugyanakkor a magasabb számú SERCA2a miatt kialakult fokozott energiaigény káros



is lehet a csökkent koronária ellátás és a sérült anyagcsere miatt. Ilyen körülmények között a SERCA2a expressziójának csökkenése egy ésszerűbb adaptív folyamat lenne a szív számára.

A cAMP függő PKA a Ser16-nál, a membrán kapcsolt  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin kináz a Thr17-nél foszforilálhatja a PLB-t, ami növeli a SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását (Koss & Kranias 1996, MacLennan és Kranias 2003). Kísérleteinkben a PLB Ser16-nál történt foszforiláltságot vizsgáltuk, amely főként a  $\beta$ -adrenerg stimuláció következménye (Li és mtsai 2000). Mivel a Western blot tesztet a kísérleti protokoll után végeztük, 90 perccel a szív izolációja után, ezért a magasabb foszforilált PLB szint a fruktóz táplált patkányokban nem tulajdonítható a fennálló  $\beta$ -adrenerg aktivációnak. Feltételezhetően a postreceptorikus enzimikus mechanizmusok upregulációja lehet felelős a magas P-PLB szintért, még  $\beta$ -adrenerg stimuláció hiányában is.

Meg kell említeni, hogy a beteg patkányok szíveiben a szívelégtelenség ezen fázisában, nyugalmi körülmények között a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítás sebességében bekövetkező csökkenés nem jár együtt a luzitrop funkció romlásával. Ez magyarázható azzal a folyamattal, hogy a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenysége csökken a Tn-I foszforiláció hatására (Li és mtsai 2000). Elképzelhető, hogy ez a kompenzációs folyamatok részeként aktiválódó foszforilációs folyamatokhoz tartozik.

Az érintett szívek SERCA2a diszfunkciója még hangsúlyosabbá válik ciklopiazonsav alkalmazása során. A CPS emeli a SERCA2a  $k_m$ -jét mindkét csoportban. Így ez a paraméter magasabb a fruktóz táplált patkányokban mind bazális állapotban, mind CPS adagolás során. CPS hatására a SERCA2a  $V_{max}$ -a csökkent, és a kiindulási különbség a kontroll és fruktóz táplált patkányok között eltűnt, ami a beteg szívek fokozott sérülékenységét mutatja. A megfigyelt CPS hatás egyezik a korábbi tanulmányokkal, amiben ugyanúgy kimutatták a CPS hatására bekövetkező SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$  affinitás és transzporter aktivitás csökkenését (Martínez-Azorín 2004). A CPA hatására bekövetkező SERCA2a funkció csökkenés jelentős változásokat eredményez mind a bal kamra  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisában, mind a bal kamra hemodinamikai funkciójában (5. Táblázat, 10., 11. Ábrák). Csökken a  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció ( $-\text{dCa}^{2+}_i/\text{dt}$ ,  $\text{DT}_{50}$ , 11c., 11e. Ábrák), ami a végdiasztolés  $[\text{Ca}^{2+}_i]$  (11a. Ábra) emelkedéséhez vezet és a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdó csökkenését eredményezi (11d. Ábra). Ezek a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisbeli eltérések megjelennek a hemodinamikai paraméterek változásában is, így változik a luzitrop

funkció ( $-dP/dt_{\max}$ ), a végdiasztolés nyomás (10a., 10c. Ábrák) és a pulzusnyomás (5. Táblázat). A CPS adagolás alatt fellépő RyR2 csatorna konduktancia csökkenés ( $k_{ch}$ , 12a. Ábra) és a következményes  $Ca^{2+}$  felszabadulás-sebesség ( $+dCa^{2+}_i/dt$ , 6b. Ábra) és inotróp funkció csökkenés az SR alacsony  $Ca^{2+}$  telítettsége miatt következik be, ami a SERCA2a csökkent funkciójának indirekt következménye. A CPS által kiváltott változások mind a  $Ca^{2+}$  homeosztázisban, mind a hemodinamikai funkcióban fokozottabbak a metabolikus szindrómában szenvedő patkányok szíveiben, ami azt jelzi, hogy a CPS gátlás nagyobb károkat okoz a szívfunkcióban, azokban a szívekben, amelyek már alkalmazkodtak a csökkent SERCA2a funkcióhoz és kimerítették rezervkapacitásukat. Az adaptációs mechanizmus eredményeképp nyugalmi körülmények között nincs diszfunkció, hasonlóan az egészséges szívekhez. Ugyanakkor a megnövekedett CPS érzékenység mutatja, hogy a kompenzációs mechanizmusok kapacitása véges és a  $Ca^{2+}$  szabályozás az összeomlás határán van.

A CPS indukált hemodinamikai eltérések egyértelmű következményei a  $Ca^{2+}_i$  szabályozásban bekövetkező változásoknak, ugyanakkor nem zárható ki, hogy ebben szintén szerepet játszik a csökkent koronária áramlás, amit az ér simaizomra kifejtett CPS hatás okoz (5b. Táblázat). A koronária perfúzió mindkét csoportban hasonló mértékben csökkent (a nyugalmi érték  $80\pm 5\%$ -ra a kontroll csoportban, és  $77\pm 5\%$ -ra a fruktóz táplált csoportban). Feltételezhetően ez a közel ugyanakkora csökkenés az áramlásban ugyanakkora esést eredményezne a szívfunkcióban, tehát a megfigyelt különbség a csoportok között csupán a CPS kardiomiocitákra kifejtett hatásán alapul. Feltételezzük, hogy a metabolikus szindrómában kialakuló szívelégtelenségben az első jelentős eltérés a SERCA2a funkció csökkenése. A SERCA2a diszfunkciója számos, a szívre ható metabolikus eltérés következménye lehet. Az inzulin rezisztencia kialakulásával a szabad zsírsavak felvétele és felhasználása meghaladja a glükózt (lipid shift), (Coort és mtsai 2007, Dhalla és mtsai 1998). Emellé társul a magas triglicerid és FFA plazma szint. A lipid shift eredményeként a hosszú szénláncú zsírsavak és a lipid metabolizmus potenciálisan káros köztitermékei felhalmozódnak a szívizomsejtekben, zavart okozva a sejt szignálmechanizmusában és destabilizálva a membránt, ami gátolja az ion transzporterek normális működését a sejtmembránban (Coort és mtsai. 2007, Daniels és mtsai 2010, Falcão-Pires és Leite-Moreira 2011). A metabolikus szindrómában az inzulin rezisztencia miatt kialakult lipid shift, a nagy mennyiségű oxidált glikált fehérjék, valamint az endoteliális diszfunkció és a helyileg aktiválódó renin-angiotenzin rendszer miatt az oxidatív stressz nagy mennyiségű reaktív gyök

kialakulásához vezet (Adeghate 2004, Asghar és mtsai 2009, Dhalla és mtsai 1998, Falcão-Pires és Leite-Moreira 2011). A metabolikus szindróma diabéteszes eltérései csökkent antioxidáns kapacitással járnak (Babujanarthanam és mtsai 2011). Az oxidatív stressz felgyorsítva a membrán remodelinget megváltoztatja a transzporterek fizikai/fiziológiai környezetét megzavarva az ion transzportot.

## 7. Következtetések

Kísérleteink azt mutatják, hogy a 3 hónapos MLP-KO szívekben, a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályozásban megfigyelt változások ideiglenes jellegűek. A 9 hónapos állatok hemodinamikai funkciója és  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázisa nem tér el a kontroll értékektől, ami alapján feltételezhetjük bizonyos kompenzációs folyamatok jelenlétét. Ebben szerepet játszhat a SERCA2a expressziójának normalizálódása a kardiomiopátiás szívekben. A szívizom kontraktilis hatékonysága szintén átmeneti jelleggel csökken a betegség korai stádiumában. Ezek a megfigyelések alapján a MLP-KO szívekben működik egy adaptív mechanizmus, amely képes a szívizom hemodinamikai és  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis eltéréseit kompenzálni a kor előrehaladtával.

A metabolikus szindróma állatmodelljében kimutattuk, hogy a kardiális diszfunkció korai szakaszában az  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztráció csökken, ami a SERCA2a diszfunkciójának következménye. A SERCA2a funkció csökkenése a metabolikus szindróma anyagcsere-elváltozásainak és az oxidatív stressz következményeként jöhet létre. Az  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztráció zavara kompenzációs mechanizmusokat indít el, amelyek a SERCA2a upregulációjához és a PLB foszforilációjához vezetnek. Ezek a folyamatok a betegség korai stádiumában, amikor még a nyugalmi hemodinamikai funkció megtartott, helyreállítják  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályozást. Ennek az állapotnak a fenntartása a rezervkapacitás felhasználásával jár, ami igen sérülékennyé teszi a szívet a további terhelésre.

## 8. Összefoglalás

Az egészségtelen életmóddal párhuzamosan nő a metabolikus szindróma (MetS) és a 2-es típusú diabétesz, így az anyagcsere eltérések során kialakuló kardiomiopátiák prevalenciája is. A familiáris alapon jelentkező kardiomiopátiákban, hasonlóan a szerzett formákhoz a korai diagnózis és adekvát terápia elengedhetetlen a betegség progressziójának lassításához. A MetS-t kísérő kardiális anyagcsereváltozások az intracelluláris kalcium ( $Ca^{2+}_i$ ) szabályozás módosulásával járnak, ami a szívelégtelenség kialakulásának egyik kiemelt szereplője. Egyik kérdéskörünk tisztázásához a primer dilatatív kardiomiopátia elterjedt MLP-KO (muscle lim protein knock out) egér modelljét használtuk. Ennek felnőtt fenotípusa hosszú ideig túlél, annak ellenére, hogy genetikai hibája korai szívelégtelenségre predesztinálja. Célunk a jelenség hátterében álló adaptív mechanizmusok megismerése mellett annak tisztázása, hogy ebben mi a szerepük a  $Ca^{2+}_i$ -t szabályozó folyamatok változásainak. Másik célunk az volt, hogy a  $Ca^{2+}_i$  homeosztázis változását leírjuk a MetS-t kísérő kardiomiopátia korai stádiumában. Kísérleteinkben izolált szíveken a hemodinamikai teljesítménnyel párhuzamosan Indo-1 sejtfelszíni fluorometriával mértük a  $Ca^{2+}_i$ -t. Az MLP-KO egereket 3 és 9 hónapos korban vizsgáltuk. A MetS vizsgálata 6 hétig fruktóz-diétán tartott patkányokon történt. Az izolált szíveket  $\beta$ -adrenerg aktivációnak és SERCA2a gátló CPS hatásnak vetettük alá. Továbbá, a MetS modellben a kísérletek előtt echokardiográfiát, illetve a  $Ca^{2+}_i$  tranzienst elemzésére matematikai modellt használtunk, ami alapján becsültük az SR  $Ca^{2+}_i$  transzportereinek kinetikus jellemzőit. Megmértük a  $Ca^{2+}_i$  szabályozásért felelős kulcsenzimek expresszióját is. Az MLP-KO szívek hemodinamikai funkciójában csak a 3 hónapos szívekben találtunk eltérést: az izolált szívek luzitropiája csökkent.  $\beta$ -adrenerg agonista hatására mindegyik csoport hasonlóan reagált, ugyanakkor a CPS a 3 hónapos MLP-KO szívekben nagyobb mértékben megemelte a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$ -t, és csökkentette a  $Ca^{2+}_i$  szekvesztrációt a hasonló korú kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez a különbség nem volt megfigyelhető az idősebb állatokban. A SERCA2a expressziója csökkent a 3 hónapos MLP-KO állatokban mind az azonos korú kontrollhoz, mind a 9 hónapos MLP-KO állatokhoz képest. A MetS kardiomiopátiában az echokardiográfia szívizom-hipertófia jeleit mutatta. Sem in vivo, sem izolált szív méréseink során nem észleltünk hemodinamikai eltéréseket, ugyanakkor a  $Ca^{2+}_i$  szekvesztráció csökkenését tapasztaltuk. A modell analízis a SERCA2a  $Ca^{2+}$  affinitás csökkenését és a  $V_{max}$  növekedését mutatta. A kardiomiopátiában szenvedő szívek CPS adagolására kifejezettebben reagáltak. Western blot vizsgálat a SERCA2a és a foszforilált foszfolambán protein szint emelkedését mutatta, de a PLB teljes mennyisége nem változott. A MLP-KO szívek vizsgálata során szerzett adatok egy adaptációs mechanizmus meglétét igazolták, ami a SERCA2a upregulációjával 9 hónapos korra normalizálja a 3 hónapos MLP-KO szívekben sérült hemodinamikai funkciót. A MetS patkányok szíveiben korai stádiumban létrejövő SERCA2a zavar nem jelenik meg a hemodinamikai funkció változásában, ami a SERCA2a upregulációjának és a fokozott PLB foszforilációnak köszönhető. Az egyensúlyi állapotot fenntartó kompenzációs folyamatok kimerítik a szív rezervkapacitását, ami sebezhetővé teszi a szíveket a további SERCA2a gátlással szemben.

## 9. Summary

Due to sedentary lifestyle and high calorie intake the prevalence of metabolic disorders, metabolic syndrome (MetS), diabetes mellitus and the subsequently developing non familial cardiomyopathies is increasing. The early diagnosis and adequate therapy of familial and non familial cardiomyopathies are necessary to abort their progression. Cardiac metabolic disorder caused by MetS leads to changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) homeostasis which plays an important role in the pathology of heart failure. A widely used murine model of familial dilated cardiomyopathy, the MLP-KO (muscle lim protein knock out) mouse was investigated in our experiments. Its adult phenotype survives despite of its genetic defect which predestines it to develop heart failure. Our aim was to verify adaptive mechanisms and to define the role of alteration of  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeostasis in this process. Our second aim was to describe the disturbance of  $\text{Ca}^{2+}_i$  regulation in the early stage of MetS induced cardiomyopathy. In isolated heart experiments Indo-1 surface fluorometry was used to measure intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration parallel to the registration of hemodynamic parameters. 3 and 9 months old MLP-KO animals were examined, whereas in the MetS experiments rats were fed with fructose rich diet for 6 weeks. Isolated hearts were exposed to  $\beta$ -adrenergic activation and the SERCA2a inhibitor cyclopiazonic acid (CPA). In addition to these, in the MetS experiments echocardiography was performed and a computational model was used to analyze the  $\text{Ca}^{2+}_i$  transients to estimate the kinetic parameters of SR  $\text{Ca}^{2+}$  transporters. The protein concentration and mRNA levels of key enzymes of  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeostasis were also measured. Alterations in the hemodynamic function could only be observed in the 3-month old MLP-KO hearts, indicating decreased lusitropic function.  $\beta$ -adrenergic activation showed similar changes in all groups, however, the effect of CPA was exaggerated in the 3-month old MLP-KO animals: the end-diastolic  $\text{Ca}^{2+}_i$  concentration significantly increased and the  $\text{Ca}^{2+}_i$  sequestration significantly decreased compared to control hearts. This difference could not be observed in the older animals. The SERCA2a expression was lower in 3-month old MLP-KO animals compared to both control and 9-month old MLP-KO animals. In the MetS hearts echocardiography showed signs of cardiac hypertrophy. No alterations in the hemodynamic parameters could be observed in the fructose fed animals neither in vivo nor in isolated heart experiments, however,  $\text{Ca}^{2+}_i$  sequestration was decreased in the MetS hearts. The model analysis showed a decrease in  $\text{Ca}^{2+}_i$  affinity and an increase in  $V_{\max}$  of SERCA2a. Hearts of fructose fed animals were more sensitive to CPA administration. The Western blot analysis revealed higher SERCA2a and phosphorylated phospholamban (PLB) expression, however, total PLB level remained unchanged. The present findings in MLP-KO experiments suggest that a compensatory mechanism exists, which could normalize initial disturbances in the hemodynamic function of 3-month old MLP-KO mice later in life with the upregulation of SERCA2a. SERCA2a dysfunction in the early stage of MetS cardiomyopathy was not reflected in the hemodynamic function. This could be explained by SERCA2a upregulation and increased phosphorylation of phospholamban. However, the reserve capacity of  $\text{Ca}^{2+}_i$  sequestration is exhausted in this delicate equilibrium, which makes it clearly vulnerable to a further inhibition of SERCA2a function.

## 10. Irodalom jegyzék

- Adeghate E. (2004) Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem*, 261(1-2):187-91.
- Aiba T, Tomaselli GF. (2010) Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol*, 25(1):29-36.
- Al-Obaidi KM, Hon JKF, Stubbs PJ, Barnes J, Amersey RA, Dahdal M, Laycock JF, Noble MIM, Alaghband-Zadeh J. (2001) Plasma insulin-like growth factor-1 elevated in mild-to-moderate but not severe heart failure. *American Heart Journal*, 142(6):10.
- An D, Rodrigues B. (2006) Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *AJP – Heart*, 291(4):H1489-H1506.
- Anand IS. (1999) Neurohormonal modulation in chronic heart failure. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*, 4:63-73.
- Andersen JP, Vilsen B. (1998) Structure-function relationships of the calcium binding sites of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Acta Physiol Scand*, 163(643):45-54.
- Antoons G, Vangheluwe P, Volders PGA, Bito V, Holemans P, Ceci M, Wuytack F, Caroni P, Mubagwa K, Sipido KR. (2006) Increased phospholamban phosphorylation limits the force-frequency response in the MLP<sup>-/-</sup> mouse with heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 40:350-360.
- Arai M, Matsui H, Periasamy M. (1994) Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 74:555-64.
- Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88:393-403.
- Arber S, Halder G, Caroni P. (1994) Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, 79 (2):221-231.
- Asghar O, Al-Sunni A, Khavandi K, Khavandi A, Withers S, Greenstein A, Heagerty AM, Malik RA. (2009) Diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, 116:741-60.
- Babujanarthanam R, Kavitha P, Mahadeva Rao US, Pandian MR. (2011) Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*, 358(1-2):121-9.
- Balke CW, Egan TM, Wier WG. (1994) Processes that remove calcium from the cytoplasm during excitation-contraction coupling in intact rat heart cells. *J Physiol*, 474 (3):447-62.
- Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. (1995) Calibration of indo-1 and resting intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  in intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys J*, 68(4):1453-1460.

- Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, Peutz-Kootstra C, Witzke O, Smits JF, Struijker Boudier HA. (2007) Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age. *J Hypertens*, 25:207-15.
- Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. (2000) Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(5):E1104-13.
- Bers DM, Perez-Reyes E. (1999) Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*, 42:339-360.
- Bers DM. (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*, 87(4):275-81.
- Bezprozvanny I, Bezprozvannaya E, Ehrlich BE. (1994) Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-triphosphate-gated calcium channels from cerebellum. *Mol Biol Cell*, 5:97-103.
- Blaustein MP, Lederer WJ. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79: 854-963.
- Boomsma F, van den Meiracker AH. (2001) Plasma A- and B- type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. *Cardiovasc Res*, 15;51(3):442-9.
- Bootman MD, Berridge MJ. (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83(5):675-8.
- Boudina S, Abel ED. (2007) Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115(25):3213-23.
- Braunwald E. (2001) The Denolin Lecture: Congestive heart failure: a half century perspective. *Eur Heart J*, 22:825-836.
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S. (1986) Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*, 59(3):297-309.
- Buyandelger B, Ng KE, Miodic S, Piotrowska I, Gunkel S, Ku CH, Knöll R. (2011) MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart. *Pflugers Arch*, 462(1):135–142.
- Cai L, Kang YJ. (2001) Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol*, 1(3):181-93.
- Carafoli E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev*, 71:129-153.
- Carafoli E. (2002) Calcium signalling: A tale for all seasons. *Proc Nat Acad Sci USA*, 99:1115-1122.
- Castellano G, Affuso F, Di Conza P, and Fazio S. (2009) The GH/IGF-1 Axis and Heart Failure. *Curr Cardiol Rev*, 5(3):203–215.
- Cheng H, Lederer WJ. (2008) Calcium sparks. *Physiol Rev*, 88(4):1491-545.
- Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA. (2002) Defective intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling



contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283:H1398-408.

- Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G. (2001) Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 54(2):137-54.
- Coort SL, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF, Luiken JJ. (2007) Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol Cell Biochem*, 299(1-2):5-18.
- Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol*, 266:C1485-1504.
- Costandi PN, Frank LR, McCulloch AD, Omens JH (2006) Role of diastolic properties in the transition to failure in a mouse model of the cardiac dilatation. *Am J Physiol-Heart C*, 291:H2971-H2979.
- Cribbs L (2010) T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. 4(6):447-452.
- Daniels A, van Bilsen M, Janssen BJ, Brouns AE, Cleutjens JP, Roemen TH, Schaart G, van der Velden J, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. (2010) Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta Physiol (Oxf)*, 200(1):11-22.
- Davidson MJ, Koch WJ. (2001) Genetic manipulation of  $\beta$ -adrenergic signalling in heart failure. *Acta Physiol Scand*, 173:145-150.
- Day C (2007) Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res*, 4(1):32-8.
- de Cavanagh EM, Fraga CG, Ferder L, Inserra F. (1997) Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 2):R514-8.
- Dhalla NS, Liu X, Panagia V, Takeda N. (1998) Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res*, 40(2):239-47.
- Dibb KM, Graham HK, Venetucci LA, Eisner DA, Trafford AW. (2007) Analysis of cellular calcium fluxes in cardiac muscle to understand calcium homeostasis in the heart. *Cell Calcium*, 42(4-5):503-12.
- Dillmann WH. (1984) Fructose feeding increases  $Ca^{++}$ -activated myosin ATPase activity and changes myosin isoenzyme distribution in the diabetic rat heart. *Endocrinology*, 114(5):1678-85.
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. (2011) Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 51(4): 600–606.
- Duchon MR. (1999) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol*, 516(1): 1-17
- Dzau VJ (1993) Tissue rennin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Int Med*, 153:937.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*, 365:1415-28.
- Édes István: A szív- és simaizom  $Ca^{2+}$ -anyagcseréje: elmélet, klinikum, 64-89, 104-105.

- Eisner D, Bode E, Venetucci L, Trafford A. (2012) Calcium flux balance in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 58:110-117.
- Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. (2008) Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, 29(2):270-6.
- Esposito G, Santana LF, Dilly K, Crus JD, Mao L, Lederer WJ, Rockman HA. (2000) Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure. *Am J Physiol-Heart C*, 279(6):H3101-H3111.
- Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. (2012) Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev*, 17(3):325-44.
- Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. (2004) Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*, 25(4):543-67.
- Ferrara R, Mastrolilli F, Pasanisi G, Censi S, Aiello ND, Fucili A, et al (2002) Neurohormonal modulation in chronic heart failure. *Eur Heart J*, 4: D3-D11.
- Feuerstein R, Wang X, Song D, Cooke NE, Liebhaber SA. (1994) The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:10655–10659.
- Flick MJ, Konieczny SF. (2000) The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of betaI-spectrin. *J Cell Sci*, 113:1553–1564.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F. (1997) Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, 77: 699-729.
- Fricovsky ES, Suarez J, Ihm SH, Scott BT, Suarez-Ramirez JA, Banerjee I, Torres-Gonzalez M, Wang H, Ellrott I, Maya-Ramos L, Villarreal F, Dillmann WH. (2012) Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 303(7):R689-99.
- Fülöp L, Bányász T, Szabó G, Tóth IB, Bíró T, Lőrincz I, Balogh Á, Pető K, Mikó I, Nánási PP. (2006) Effect of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Oxf.)*, 188(3-4):163-171.
- Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML. (1997) cAMP-Dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca<sup>2+</sup>Channels Requires Membrane Targeting of PKA. *Neuron*, 19(1):185-96.
- Giacco F, Brownlee M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 107(9): 1058–1070.
- Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. (1988) Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes Metab*, 14:25–30.
- Ginsberg HN (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 106(4):453-8.
- Glennon PE, Sugden PH, Poole-Wilson PA. (1995) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J*, 73(6):496-9.

- Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. (1995) Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest*, 95:888-894.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260:3440-50.
- Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. (2012) *Cardiology*. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers, 122(1):23-35.
- Gupta MP, Samant SA, Smith SH, Shroff SG. (2008) HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. *J Biol Chem*, 283(15):10135-46.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyawa M. (1988) Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol*, 396:233-253.
- Harvey PA, Leinwand AL (2010) Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*, 194 (3):355.
- Hasenfuss G. (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*, 37(2):279-89.
- Helmes M, Trombitás K, Granzier H. (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 79(3):619-26.
- Herron TJ, McDonald KS. (2002) Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ Res*, 90(11):1150-2.
- Hosey MM, Chien AJ, Puri TS. (1996) Structure and regulation of L-type calcium channels: a current assessment of the properties and roles of channel subunits. *Trends Cardiovasc Med*, 6:265–273.
- Howarth FC, Jacobson M, Qureshi MA, Shafiullah M, Hameed RS, Zilahi E, Al Haj A, Nowotny N, Adeghate E. (2008) Altered gene expression may underlie prolonged duration of the QT interval and ventricular action potential in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem*, 328(1-2):57-65.
- Huang J, Xian H, Bacaner M. (1990) Arachidonic acid and metabolites modulate calcium currents in single ventricular myocytes. *Circulation* 82(III):III-525.
- Huang KP. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12:425-432.
- Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, Young LH, Johnson RS, Giordano FJ (2004) Cardiac myocyte-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J*, 18:1138–1140.
- Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. (1990) Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39:1420–1424.
- Isenberg G. (2001) How can overexpression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger compensate the negative inotropic effects of downregulated SERCA? *Cardiovasc Res*, 49:1-6.

- Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GYH (2000) ABC of heart failure: Pathophysiology. *BMJ*, 320:167-170.
- Jeffry D, Roufogalis BD, Katz S. (1981) The effect of calmodulin on the phosphoprotein intermediate of  $Mg^{2+}$ -dependent  $Ca^{2+}$ -stimulated adenosine triphosphatase in human erythrocyte membranes. *Biochem J*, 194:481-486.
- Jessup M, et al. (2009) Focused update: ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. *Circulation*, 119:1977.
- Kakkar R, Kalra J, Mantha V, Prasad K. (1995) Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 151:113–119.
- Khullar M, Al-Shudiefat AA, Ludke A, Binopal G, Singal PK. (2010) Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol*, 88(3):233-40.
- Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. (1995) Differential Changes in Cardiac Phospholamban and Sarcoplasmic Reticular  $Ca^{2+}$ -ATPase Protein Levels. Effects on  $Ca^{2+}$  Transport and Mechanics in Compensated Pressure-Overload Hypertrophy and Congestive Heart Failure. *Circ Res*, 77:759-764.
- Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111:943–955.
- Koss KL, Grupp IL, Kranias EG. (1997) The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol*, 92:17–24.
- Koss KL, Kranias EG. (1996) Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res*, (79):1059-63.
- Kumar R, Yong QC, Thomas CM, Baker KM. (2012) Review: Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(5): R510–R517
- Laczy B. (2009) Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *AJP – Heart*, 296(1): H13-H28.
- Leier CV, Binkley PF, Cody RJ. (1990) Alpha-adrenergic component of the sympathetic nervous system in congestive heart failure. *Circulation*, (2):168-76.
- Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. (2000) Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278:H769-79.
- Ligeti L, Szenczi O, Prestia CM, Szabó C, Horváth K, Marcsek ZL, van Stiphout RG, van Riel NA, Op den Buijs J, Van der Vusse GJ, Ivanics T. (2007) Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Med*, 17:1035-43.
- Lim H, Zhu YZ. (2006) Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci*, 63(22):2584-96.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. (2003) What Is the Role of  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Heart Failure? *Circulation Research*, 93:896-906.

- Lombardi G, Di Somma C, Marzullo P, Cerbone G, Colao A. (2000) Growth hormone and cardiac function. *Ann Endocrinol (Paris)*, 61(1):16-21.
- Lopaschuk GD, Tahiliani AG, Vadlamudi RVSV, Katz S, McNeill JH. (1984) The effect of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. The possible involvement of long chain acyl-carnitines. *Can J Physiol Pharmacol*, 61:439–448.
- Lorenzen-Schmidt I, Stuyvers BD, Keurster HEDJ, Date M, Hoshijima M, Chien KR, McCulloch AD, Omens JH. (2005) Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 39:241-250.
- Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, et al. (1997) Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem*, 272:27484–27491.
- MacLennan DH, Kranias EG. (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:566-77.
- Marks AR. (2000) Cardiac intracellular calcium release channels. Role in heart failure. *Circ Res*, 87:8-11.
- Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. (2006) American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113(14):1807-16.
- Martínez-Azorín F. (2004) Cyclopiazonic acid reduces the coupling factor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase acting on Ca<sup>2+</sup> binding. *FEBS Lett*, 576:73-6.
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. (1995) Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 92(4):778-84.
- Mikala G, Mershon JL, Schwartz A. (1996) Voltage-gated calcium channels. *Biomembranes*, 6:221-248.
- Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J, Kranias EG, Giles WR, Chien KR. (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*, 99:313-322.
- Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, Chrisco MA, Murphy RT, Lurie PR, Schwartz RJ, Elliott PM, Vatta M, McKenna W, Towbin JA, Bowles NE. (2003) Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab*, 80:207–215.

- Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Rüegg JC. (1985) The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett*, 189(2):221-4.
- Netticadan T, Temsah RM, Kent A, Elimban V, Dhalla NS. (2001) Depressed levels of Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes*, 50:2133-8.
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science*, 250:562-565.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316:440-443
- Odermatt A, Kurzydłowski K, MacLennan DH. (1996) The V<sub>max</sub> of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem*, 271: 14206-14213.
- Op den Buijs J, Juloski AL, Ivanics T, Ligeti L, van der Vusse GJ, van Riel NA. (2004) Identification of a switching model of calcium cycling in isolated rat hearts. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2:841-4.
- Op den Buijs J, Ligeti L, Ivanics T, Miklos Z, Van der Vusse GJ, Van Riel NAW. (2008) Mathematical modelling of the calcium–left ventricular pressure relationship in the intact diabetic rat heart. *Acta Physiol*, 193:205-217
- Op den Buijs J, Miklos Z, van Riel NAW, Prestia CM, Szenczi O, Tóth A, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T. (2005) Beta-Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. *Life Sci*, 76:1083-98.
- Opie LH. (2004) *Heart Physiology (From cell to circulation)* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004: 224-240, 267, 485-518.
- Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, et al. (1996) Prognostic impact of big endothelin –1 plasma concentrations compared with invasive haemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 27:633-641.
- Paul M, Ali Poyan Mehr AP, Kreutz R. (2006) *Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems*. *Physiol Rev*, 86(3):747-803.
- Perez DM, Doze VA. (2011) Cardiac and neuroprotection regulated by α<sub>1</sub>-adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res*, 31(2): 98–110.
- Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. (2008) Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res*, 77:265-73.
- Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. (1999) Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 85:38-46.
- Pillai JB, Chen M, Rajamohan SB, Samant S, Pillai VB, Gupta M, Gupta MP. (2008) Activation of SIRT1, a class III histone deacetylase, contributes to fructose feeding-mediated induction of the alpha-myosin heavy chain expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(3):H1388-97.

- Qi MY, Feng Y, Dai DZ, Li N, Cheng YS, Dai Y. (2010) CPU86017, a berberine derivative, attenuates cardiac failure through normalizing calcium leakage and downregulated phospholamban and exerting antioxidant activity. *Acta Pharmacol Sin*, 31(2):165-74.
- Raskin AM, Hoshijima M, Swanson E, McCulloch AD, Omens JH. (2009) Hypertrophic gene expression induced by chronic stretch of excised mouse heart muscle. *Mol Cell Biomech*, 6(3):145-59.
- Ren J, Samson WK, Sowers JR. (1999) Insulin-like growth factor 1 as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol*, 31:2049–2061.
- Rios E, Pizarro G. (1988) Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *News Physiol Sci*, 3:223-228.
- Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross JJ, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998) Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Nat Acad Sci*, 95:7000-7005.
- Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. (1996) Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, 94(11):2837-42.
- Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. (1999) Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 2):H474-80.
- Schram K, De Girolamo S, Madani S, Munoz D, Thong F, Sweeney G. (2010) Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell Mol Biol Lett*, 15:551–563.
- Schrier RW, Abraham WT (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*, 341: 577-584.
- Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin LJ, Lompré AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. (1981) Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J Mol Cell Cardiol*, 13:1071–1075.
- Schwinger RH, Münch G, Bölek B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 31(3):479-91.
- Sharma R, Coats A, Anker SD. (2000) The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin –1. *Intern J Cardiol*, 72:175-186.
- Shimoni Y, Ewart HS, Severson D. (1998) Type I and II models of diabetes produce different modifications of K<sup>+</sup> currents in rat heart: role of insulin. *J Physiol*, 507(2):485-496.
- Sommer JR. (1995) Comparative anatomy: in praise of a powerful approach to elucidate mechanisms translating cardiac excitation into purposeful contraction. *J Mol Cell Cardiol*, 27:19-35.

- Su Z, Yao A, Zubair I, Sugishita K, Ritter M, Li F, HunterJJ, Chien KR, Barry WH. (2001) Effects of deletion of muscle LIM protein on myocyte function. *Am J Physiol-Heart C*, 280(6):H2665-H2673.
- Sutko JL, Publicover NG, Moss RL. (2001) Titin: an elastic link between length and active force production in myocardium. *Circulation*, 104(14):1585-7.
- Takizawa T, Arai M, Yoguchi A, Tomaru K, Kurabayashi M, Nagai R. (1999) Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using in vivo direct gene transfer into living myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 31:2167-74.
- Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, Naylor M, Konno T, Gorham JM, Wolf CM, Kim JB, Schmitt JP, Molkentin JD, Norris RA, Tager AM, Hoffman SR, Markwald RR, Seidman CE, Seidman JG (2010) Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- $\beta$ . *Clin Invest*, 120(10):3520-9.
- Ter Horst P, Smits JF, Blankesteyn WM. (2011) The Wnt/Frizzled pathway as a therapeutic target for cardiac hypertrophy: where do we stand? *Acta Physiol (Oxf)*, 110-117.
- Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. (2009) The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, 332(1-2):145-59.
- Treinys R, Jurevicius J. (2008) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)*, 44(7):491-9.
- Tsutsui H, Kinugawa S. (2011) Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*, 48(1):68–71.
- Unger T, Li J. (2004) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1:S7-10.
- Unsöld B, Schotola H, Jacobshagen C, Seidler T, Sossalla S, Emons J, Klede S, Knöll R, Guan K, El-Armouche A, Linke WA, Kögler H, Hasenfuss G. (2012) Age-dependent changes in contractile function and passive elastic properties of myocardium from mice lacking muscle LIM protein (MLP). *Eur J Heart Fail*, 14(4):430-7.
- Van den Bosch BJC, van den Burg CMM, Schoonderwoerd K, Lindsey PJ, Scholte HR, de Coo RFM, van Rooij E, Rockman HA, Doevendans PA, Smeets HJM (2005) Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res*, 65:411-418.
- Van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PML, Hasenfuss G, Stienen GLM. (2003) The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 57:505-514.
- Wagner J, Keizer J. (1994) Effects of rapid buffers on Ca<sup>2+</sup> diffusion and Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Biophys J*, 67(1):447-56.
- Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Sari FR, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Laksmanan AP, Soetikno V, Kodama M,



- Aizawa Y. (2010) Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev*, 6(4):280-90.
- Wier WG, Balke CW. (1999) Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res*, 85(9):770-6.
  - Wolff SP, Dean RT (1987) Glucose auto-oxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*, 245:243–250.
  - Yamamoto R, Akazawa H, Ito K, Toko H, Sano M, Yasuda N, Qin Y, Kudo Y, Sugaya T, Chien KR, Komuro I. (2007) Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice. *Circ J*, 71(12):1958-64.
  - Yokoe S, Asahi M, Takeda T, Otsu K, Taniguchi N, Miyoshi E, Suzuki K. (2010) Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy. *Glycobiology*, 20(10):1217-26
  - Yokoham T, Vaca L, Rosen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. (1993) Cellular basis for the negative inotropic effects of tumour necrosis factor alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*, 92: 2303-2312.
  - Zheng B, Wen JK, Han M. (2008) hhLIM is a novel F-actin binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling. *FEBS J*, 275(7):1568-78.
  - Zolk O, Caroni P, Böhm M. (2000) Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, 101(23):2674-7.

## 11. Saját publikációk

### 11.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kemecsei P**, Miklós Zs, Bíró T, Marincsák R, Tóth BI, Komlódi-Pásztor E, Barnucz E, Mirk É, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T. (2010) Hearts of surviving MLP-KO mice show transient changes of intracellular calcium handling. *Mol Cell Biochem*, 342:251-260. (**IF: 2.168**)
2. Miklós Zs, **Kemecsei P**, Bíró T, Marincsák R, Tóth BI, Op den Buijs J, Benis É, Drozgyik A, Ivanics T. (2012) Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*, 205(3):381-93 (**IF: 3.09**)

### 11.2. Egyéb lektorált tudományos közlemények

1. Miklós Zs, Ivanics T, Roemen THM, Van der Vusse GJ, Dézsi L, Szekeres M, **Kemecsei P**, Tóth A, Ligeti L. (2003) Time related changes in calcium handling in the isolated ischemic and reperfused rat heart. *Mol Cell Biochem*, 250(1):115-124 (**IF: 1.763**)
2. Szenczi O, **Kemecsei P**, Miklós Zs, Ligeti L, Snoeckx LHEH, van Riel NAW, op den Buijs J, Van der Vusse GJ, Ivanics T. (2005) In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart. *Pflugers Arch - Eur J Phy*, 449:518-525. (**IF: 3.564**)
3. Szenczi O, **Kemecsei P**, Holthuijsen MFJ, van Riel NAW, van der Vusse GJ, Pacher P, Szabó Cs, Kollai M, Ligeti L, Ivanics T. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol*, 69:725-732 (**IF: 3.617**)

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Klinikai Kísérleti Kutató és Humán Élettani Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának a sok segítséget és folyamatos támogatást a hosszú évek alatt, amíg az intézet köveit koptattam.

Köszönettel tartozom Dr. Monos Emil professzor úrnak, aki az intézet egykori tanszékvezetőjeként, és a PhD-program vezetőjeként is a tudományos diákkörös munkámat elindította. Hálás vagyok Dr. Kollai Márk professzor úrnak, intézetünk előző tanszékvezetőjének, hogy PhD hallgatói pályámat támogatta és segítette kutatócsoportunk munkáját. Dr. Benyó Zoltán professzor úrnak, aki mindig készségesen állt mellettünk.

Sok köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Ivanics Tamásnak, aki mindig bátorított és összefogta munkámat az évek során. Köszönöm Dr. Ligeti Lászlónak, aki éleslátásával és humorával kitűnően irányította csapatunkat. Nagyon hálás vagyok Dr. Miklós Zsuzsának, aki segítsége nélkül nem sajátíthattam volna el a kutatói munka alapjait, akihez mindig fordulhattam kérdéseimmel, és aki mindig odafigyelt a munkámra.

Köszönöm Nagy Zoltánné és Nagyné Fábíán Judit kitartó és lelkiismeretes munkáját a kísérletek elvégzésében.

Köszönöm Dr. Nádasy Györgynek, és Dr. Zsembery Ákosnak, hogy elolvasták dolgozatomat, és bírálataikkal segítették végső formába rendezését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm édesapámnak, testvéremnek és barátaimnak, akik lelkesítése nélkül nem tudtam volna elkészíteni. a dolgozatot