

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

Doktori tézisek

**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

## Bevezető

Kísérleteink középpontjába a társadalmunkban egyre nagyobb arányban megjelenő, és a mortalitást növelő szívelégtelenséget helyeztük. Kialakulás szempontjából két fő típusát különíthetjük el a primer és a valamilyen metabolikus háttérrel rendelkező szekunder kardiomiopátiát. A primer csoportba tartozó dilatatív kardiomiopátia modellként, az Arber és mtrai által kifejlesztett transzgenikus egér modellt használtuk, amiből hiányzik a harántcsíktolt izom specifikus LIM protein (MLP). Ez a modell sok jellegében hasonlít a humán dilatatív kardiomiopátiára. Az MLP knock out egér modell (MLP-KO) jelentőségét az is hangsúlyozza, hogy az MLP mutációja által okozott Z-lemezben lezajló változás hasonlóságot mutat a humán folyamatokban megfigyelvekkel.

Szekunder kardiomiopátiaként a metabolikus szindróma által kiváltott szívelégtelenséget vizsgáltuk. A metabolikus szindróma egy összetett anyagcsere rendellenesség, ami jellemezhető elhízás, inzulin rezisztencia, magas vérnyomás és diszlipidémia együttes fennállásával. Az elmúlt pár évtizedben a betegség prevalenciája folyamatosan emelkedett. A szindróma növeli a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát, a szívelégtelenséget és a mortalitást. A metabolikus szindróma anyagcsereváltozásai, a diszlipidémia, az inzulinválasz hibája és a következményes hiperglikémia megzavarja a szívizomsejt metabolizmusát, ami kardiális funkciózavart okoz és végeredményként szívelégtelenséget. Az együtt jelenlévő érdiszfunkció, artéria koronária betegség és magas vérnyomás tovább súlyosbítja a szívdiszfunkciót. Metabolikus szindrómában, a  $Ca^{2+}_i$  szabályozásának átfogó leírása elég szűkös az irodalomban. A magas fruktóz tartalmú diéta indukált metabolikus változások a patkányokban megfelelő modellt biztosítanak a humán metabolikus szindróma vizsgálatához, mivel ugyanúgy megtalálható az inzulin rezisztencia, a diszlipidémia és a magas vérnyomás.

Általánosságban elfogadott, hogy szívelégtelenségben megváltozik a  $Ca^{2+}_i$  szabályozás, ami befolyásolja a kardiális teljesítményt. Csökkent szarkoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz

(SERCA2a) és ryanodin (Ry2) funkciót, foszfolambán (PLB) és  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő (NCX) expresszió változást mutattak ki humán és különböző kísérletes szívelégtelenség modellekben. Mindkét modellben a vizsgálatok izolált szívizomsejt kísérletekre korlátozódtak, amikkel a funkcionális és a  $\text{Ca}^{2+}_i$  háztartás értékelése korlátozott, ellentétben az in vivo és izolált szív kísérletekkel, melyek sokkal jobban közelítenek a valós fiziológias környezethez. Ugyanakkor ezeken túl keveset tudunk a szívelégtelenségben lezajló  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályozás korai változásairól, és a kardiális diszfunkció kialakulásának és a betegség időbeni kapcsolatáról.

## **Célkitűzések**

Kísérleteink fő célja az MLP-KO egér szívek és a metabolikus szindróma indukált kardiomiopátiában szenvedő patkány szívek  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázisának vizsgálata, és annak kapcsolata a hemodinamikai teljesítménnyel izolált szív kísérletekben. Az MLP-KO szívek esetében vizsgáltuk, hogy adaptív mechanizmusok képesek-e idővel ellensúlyozni a kardiomiopátia tüneteit, ezért kísérleteinkben 3 és 9 hónapos egerek szíveit vizsgáltuk, hogy lássuk a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis és a kardiális funkció változásait az idő előrehaladtával. A metabolikus szindróma kísérleti modelljében, a fruktóz táplált patkányban kialakuló szív diszfunkció korai stádiumában határoztuk meg a  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis változásait.

## **Módszerek**

### **Kísérleti állatok**

#### **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 vad típusú korazonos egereket használtunk. Az SPF 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.

### **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. A kontroll egyedeket a gyártó által ajánlott kontroll táppal etettük, amiben a fehérje, szénhidrát és zsíradék arányát a kísérleti táphoz állították. Az állatokat 12 órás fény-sötétség mellett tartottuk, és szabad hozzáférést biztosítottunk az ételhez és a folyadékhoz. 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 nyomásmérő segítségével. Vérmintát vettünk a vér triglicerid szint meghatározásához.

A patkányok diabetikus állapotának meghatározásához az állatok egy részét (kontroll: n=4, fruktóz etetett: 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 gyomorszondán keresztül. Ezt követően 30 percenként meghatároztuk a vércukorszintet.

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

Az állatokat 40 mg/ttkg intraperitoneálisan adott pentobarbitállal altattuk el. A szíveket eltávolítottuk és Langendorff féle perfúziós szerkezetre rögzítettük. A perfúziót módosított

Krebs-Henseleit oldattal végeztük. Az oldatot 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> elegyével buborékolattuk. 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 segítségével mértük.

A Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> koncentráció becslésére Indo-1 AM festéket használtunk. A szíveket 6,25 μM Indo-1 AM-mel töltöttük fel perisztaltikus pumpa segítségével, amit az aortakanülhöz csatlakoztattunk. Majd a szíveket higanygőz lámpából származó 355 nm-es fényel világítottuk meg. A kardiomiocitákból származó fluoreszcens fényjeleket 400 nm-en (Ca<sup>2+</sup> kötött forma) és 506 nm-en (szabad Ca<sup>2+</sup>) mértük.

Az Indo-1 töltés után a perfúziós oldathoz probenecidet adtunk megelőzendő a festék kimosódását a szivizomsejtekből. 15 perces festék kimosási időtartamot követően a jeleket alap állapotban rögzítettük. Ezt követően izoproterenolt (5 nM) adagoltuk a perfúziós áramlatba, majd 5 perces egyensúlyi periódust követően rögzítettük a mért paramétereket. Az izoproterenol infúzió leállítása után 20 perces nyugalmi időszakot követően SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS, 5 μM) adagolását kezdtük el, majd a hatás kialakulása után ismét rögzítettük a paramétereket. Izoproterenol adagolását csak az MLP-KO kísérletekben végeztük. A fényjeleket és a hemodinamikai paramétereket rögzítettük a megfelelő időpontokban, majd off-line kiértékeljük.

## Echokardiográfia

A metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia kísérletekben echokardiográfias méréseket is kivitelezünk. A transztorakális echokardiográfiát egy magas frekvenciájú lineáris transzducerrel (5-15 MHz) felszerelt SONOS 5500 ultrahang készülékkel végeztük a 6 hetes táplálási periódus végén, 40 mg/kg i.p. pentobarbitállal kivitelezett altatásban. B módban a bal kamra hosszszelvényi felvételei alapján számítottuk a végdiasztolés térfogatot (EDV) és a végszisztolés térfogatot (ESV). Mértük a bal kamrai területet (LVA) és a bal kamrai hosszszelvényt (LVL), és a következő képlet alapján számítottuk az EDV-t és ESV-t:  $EDV = 8(LVAd)^2/3\pi LVLd$  és  $ESV = 8(LVAs)^2/3\pi LVLs$ , ahol a d, a diasztolét, az s, a szisztolét jelöli.

Meghatároztuk az ejekciós frakciót:  $100(\text{EDV-ESV})/\text{EDV}$ . A diasztolés bal kamrai falvastagságot a papilláris izomzat magasságában rögzített keresztmetszeti 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:  $100(\text{LVIDD-LVIDS})/\text{LVIDD}$ .

## Adatfeldolgozás és kiértékelés

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

## Az SR $\text{Ca}^{2+}_i$ transzporterek kinetikus paramétereinek számítása

Egy a csoportunk által korábban publikált matematikai modellt (Ligeti 2007, op den Buijs 2004, 2005) használtunk a metabolikus szindróma kardiális eltéréseinek vizsgálatában, hogy meghatározzuk a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályzó fehérjék kinetikus paramétereit.

Minden adatsorból reprezentatív, azonos végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  szinttel rendelkező tranzienseket választottunk. A  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensekre illesztett modellegyenlet alapján becsültük meg a  $\text{Ca}^{2+}_i$ -homeosztázis egyes kulcsenzimeit jellemző kinetikai paramétereit. A modell

alkalmazásával a következő jellemzők értékeit kaptuk meg: a RyR2 maximális konduktanciája ( $k_{RyR2}$ ), a RyR2 kapuzási tulajdonságait tükröző  $t_{0.5}$  idő, a SERCA2a maximális transzportsebessége ( $V_{max}$ ) és Michaelis-Menten állandója ( $k_m$ -je).

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

Az MLP-KO kísérletekben a bal kamrákból vett szövetmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Meghatároztuk a  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  kicserélő (NCX), a ryanodin csatorna (RyR2), szarkoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz (SERCA2a) és a foszfolambán (PLB) mRNS szintjeit.

## **Western blot analízis**

Mindkét kísérletsorozatban a bal kamrai szövetmintákat porrá törtük folyékony nitrogénben és jég hideg Tris-EDTA pufferben oldottuk fel, és meghatároztuk a  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  kicserélő (NCX), a ryanodin csatorna (RyR2), a szarkoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPáz (SERCA2a) és a foszfolambán (PLB) fehérje szintjeit. A denzitometriás értékeket 3-5 egyedi kísérletből vettük és átlagoltuk. A GAPDH expresszióját használtuk belső kontrollként.

# Eredmények

## MLP-KO egér kísérletek

### 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 sem különbözött a kontroll és az MLP-KO csoport között.

### 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. Ugyanakkor a 3 hónapos MLP-KO egér szívek luzitrop funkciója ( $-dP/dt_{max}$ ) elmaradt az azonos korú kontroll szívekhez képest. 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.

$\beta$ -adrenerg stimuláció (5 nM izoproterenol) hatására megemelkedett a szívfrekvencia, és  $+dP/dt_{max}$  és  $-dP/dt_{max}$  (P: bal kamrai nyomás), 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.



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%). 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.

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

### **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. Izoproterenol hatására minden csoportban emelkedett a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$ , a  $Ca^{2+}_i$  emelkedés maximális sebessége ( $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ) és a  $Ca^{2+}_i$  csökkenés maximális sebessége ( $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ ), ugyanakkor a csoportok között nem volt szignifikáns különbség.

A CPS adagolás minden csoportban megemelte a végdiasztolés  $Ca^{2+}_i$  szintet, 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. 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.

### **$Ca^{2+}$ szabályzásban résztvevő fehérjék mRNS és protein szintje**

A főszerepet játszó  $Ca^{2+}_i$  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.

A  $Ca^{2+}_i$  szekvesztráló mechanizmusok közül az NCX transzporter mRNS expressziója, valamint protein szintje minden csoportban hasonló volt.

A SERCA2a mRNS szintje 3 hónapos MLP-KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az azonos korú kontrollokban. 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. A 3 hónapos MLP-KO szívekben alacsonyabb volt a SERCA2a protein szintje, mint az azonos korú kontroll szívekben. Ez 9 hónapos korra szintén kiegyenlítődt, és bár a 3 és 9 hónapos MLP-KO csoporton belül a különbség jelentős volt, de nem 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.

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.

## **Metabolikus szindróma indukált kardiomiopátia**

### **Általános adatok**

A fruktóz etetett patkányok testtömege nem tért el a kontroll állatokétól, ugyanakkor a szív-tömeg meghaladta a normál tápon tartott állatok szív-tömegét. Ezért a szívhipertrofiát jelző szív-tömeg/testtömeg arány magasabb volt metabolikus szindrómában. Az artériás középnyomás és a szérum triglicerid szintje szintén magasabb volt 6 hetes fruktóz táplálás után. Ugyanakkor az éhomi vércukor szint nem különbözött a csoportok között. Az orális glükóztolerancia teszt (oGTT) felfedte az inzulinrezisztencia meglétét: a vércukor emelkedés nagyobb volt az érintett csoportban, és két óra elteltével nem tért vissza az éhomi szintre, ellentétben a kontroll csoporttal.

## Echokardiográfiai eredmények

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

## Hemodinamikai funkció

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

## Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ homeosztázis

Alapállapotban nem volt eltérés a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  szint és a  $+d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  tekintetében a két csoport között. Ugyanakkor a  $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  és a  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziens lecsengés félidejének ( $DT_{50}$ ) változása az SR  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztrációjának csökkenésére utal a metabolikus szindrómában szenvedő állatoknál. A csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdó csökkenéséhez vezetett. CPS adagolás hatására emelkedett a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  szint, ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdó, a  $DT_{50}$ ,  $+d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  és a  $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  csökkent a kontroll szinthez képest mindkét csoportban. A  $\text{Ca}^{2+}_i$  homeosztázis sokkal érzékenyebb volt a SERCA2a gátlásra a fruktóz etetett patkányokban. Ezt támasztja alá az az eredmény, hogy a végdiasztolés  $\text{Ca}^{2+}_i$  szint jobban emelkedett, a  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziens amplitúdó, a  $DT_{50}$ , a  $+d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  és  $-d\text{Ca}^{2+}_i/dt_{\max}$  kifejezettebben csökkent a metabolikus szindrómában

szenvedő patkányokban. A CPS indukált változások megjelennek mind a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályzásban, mind a hemodinamikai paraméterek változásában az érintett szívekben.

A  $\text{Ca}^{2+}_i$  tranziensekre illesztett modell egyenlet alapján becstültük meg az SR  $\text{Ca}^{2+}$  transzportereinek kinetikus paramétereit (RyR2:  $k_{ch}$  és  $t_{0.5}$ , SERCA2a:  $V_{max}$  és  $k_m$ ). 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. A RyR2  $t_{0.5}$ -je mindkét csoportban hasonló volt és CPS hatására sem változott. 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 CPS hatására nyugalmi állapotban a  $V_{max}$  értékében észlelt különbség eltűnt. 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.

### **A $\text{Ca}^{2+}_i$ homeosztázisban résztvevő enzimek protein expressziója**

A  $\text{Ca}^{2+}_i$  felszabadító RyR2 csatorna expressziója hasonló volt a kontroll értékhez. 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.

## 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 érvényesülését. 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 az 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 a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szekvesztráció csökken, ami a SERCA2a diszfunkciójának következménye. A SERCA2a funkció csökkenése a metabolikus szindróma anyagcsere-elváltozásainak és az oxidatív stressz következményeként jöhet létre. A  $\text{Ca}^{2+}_i$  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 a  $\text{Ca}^{2+}_i$  szabályozást. Ennek az állapotnak a fenntartása a rezervkapacitás felhasználásával jár, ami igen sérülékennyé teszi a szívet a további terhelésre.

## Saját publikációk

### Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

**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. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 342:251-260. (IF: 2.168)

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)

### Egyéb lektorált tudományos kölemények

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. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 250(1):115-124 (IF: 1.763)

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. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 449:518-525. (IF: 3.564)

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. *Biochemical Pharmacology*, 69:725-732 (IF: 3.617)